BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN DƯỢC LIỆU

BỘ Y TẾ



TRẦN THỊ THU HIỀN

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)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN DƯỢC LIỆU BỘ Y TẾ



TRẦN THỊ THU HIỀN

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)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC CHUYEN NGÀNH: DƯỢC LIỆU – DƯỢC HỌC CỖ TRUYỀN MÃ SỐ: 9720206

Người hướng dẫn khoa học: 1. TS. Lê Thị Kim Vân 2. PGS. TS. Nguyễn Quốc Huy

HÀ NỘI, NĂM 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của TS. Lê Thị Kim Vân và PGS. TS. Nguyễn Quốc Huy. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án này là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào khác.

Tác giả

Trần Thị Thu Hiền

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành bản luận án này, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô giáo, các nhà khoa học thuộc nhiều lĩnh vực cùng đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới TS. Lê Thị Kim Vân, PGS. TS. Nguyễn Quốc Huy đã trực tiếp hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo tận tình cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu khoa học.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo, các Khoa, Phòng và các thầy cô và anh chị em đồng nghiệp tại Viện Dược liệu; nhóm Nghiên cứu Ung thư học Thực nghiệm, bộ môn Sinh học Tế bào, khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội; Viện Nghiên cứu tế bào gốc và công nghệ gen Vinmec, Viện Hóa sinh biển thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ, tạo điều kiện để giúp tôi trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới PGS. TS. Nguyễn Thượng Dong, PGS. TS. Phan Minh Giang, PGS. TS. Hoàng Việt Dũng, PGS. TS. Bùi Thanh Tùng, TS. Bùi Hữu Tài, TS. Nguyễn Văn Tài, TS. Lê Thành Nghị, TS. Lê Thị Xoan, TS. Nguyễn Thị Hà, TS. Nguyễn Tuấn Hiệp đã có những đóng góp quý báu giúp tôi trong quá trình nghiên cứu thực nghiệm và hoàn thiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn lãnh đạo Học viện Y-Dược học cổ truyền Việt Nam và các đồng nghiệp tại Học viện Y-Dược học cổ truyền Việt Nam, nơi tôi công tác, đã động viên tinh thần và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án này.

Cuối cùng xin cảm ơn sâu sắc tới những người thân yêu trong gia đình; cảm ơn những bạn bè thân thiết đã dành cho tôi những tình cảm, sự động viên, giúp đỡ trong suốt thời gian qua.

Luận án này là một phần nghiên cứu của nhiệm vụ khoa học công nghệ cấp Bộ Y tế do Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo - Bộ Y tế là đơn vị chủ quản (theo quyết định số 2721/QĐ-BYT ký ngày 28/6/2019 và hợp đồng số 09/HĐ-K2ĐT ký ngày 18/9/2019).

Xin trân trọng cảm ơn tất cả những giúp đỡ quý báu này!

MỤC LỤC

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT
DANH MỤC BẢNG
DANH MỤC HÌNH
ĐẶT VẤN ĐỂ 1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN 3
1.1. TỔNG QUAN VỀ THỰC VẬT 3
1.1.1. Vị trí phân loại 3
1.1.2. Đặc điểm thực vật loài củ dòm 3
1.1.3. Phân bố của loài củ dòm 4
1.2. THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CÂY CỦ DÒM 6
1.2.1. Alcaloid
1.2.2. Các nhóm hợp chất khác 11
1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC, CÔNG DỤNG VÀ ĐỘC TÍNH CỦA CỦ DÒM 13
1.3.1. Tác dụng sinh học 13
1.3.2. Độc tính của củ dòm 21
1.3.3. Công dụng 22
1.4. MỤC TIÊU PHÂN TỬ TRONG PHÁT TRIỀN THUỐC ĐIỀU TRỊ UNG THƯ
1.4.1. Tổng quan về một số mục tiêu phân tử trong nghiên cứu và phát triển thuốc
điều trị ung thư 23
1.4.2. Aurora kinase và vai trò trong ung thư
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 37
2.1. ĐỔI TƯỢNG NGHIÊN CỨU 37
2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu 37
2.1.2. Một số dòng tế bào ung thư thí nghiệm
2.1.3. Hóa chất, dung môi 38
2.1.4. Máy móc, thiết bị và dụng cụ nghiên cứu 39
2.2. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU 40
2.3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU41
2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 41
2.4.1. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của một số hợp chất từ thân lá
cây củ dòm
2.4.2. 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
2.4.3. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào của một số hợp chất đã phân lập và bước
đâu nghiên cứu cơ chê kháng ung thư của oxostephanin 48

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 61
3.1. CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẦU TRÚC CỦA MỘT SỐ HỢP
CHẤT TỪ THÂN LÁ CÂY CỦ DÒM 61
3.1.1. Chiết xuất, phân lập một số hợp chất từ thân lá cây củ dòm 61
3.1.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được 62
3.2. BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU XÂY DỤNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VÀ
PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỂ THEO DÕI HÀM LƯỢNG OXOSTEPHANIN
TRONG DƯỢC LIỆU THEO THỜI GIAN THU HÁI 84
3.2.1. Phân lập và sơ bộ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin
3.2.2. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng oxostephanin trong thân
lá cây củ dòm 88
3.2.3. Đánh giá sự thay đổi hàm lượng oxostephanin theo thời gian thu hái . 98
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 99
3.3.2. Nghiên cứu cơ chế tác dụng gây độc tế bào của oxostephanin 105
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN 123
4.1. VỀ CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẦU TRÚC CÁC HỢP CHẤT
TỪ THÂN LÁ CÂY CỦ DÒM 123
4.2. VỀ 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 130
4.2.1. Về phân lập và sơ bộ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin 130
4.2.2. Về xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng 133
4.2.3. Về sự thay đổi hàm lượng oxostephanin theo thời gian thu hái 135
4.3. VỀ 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 138
4.3.1. Tác dụng gây độc tế bào của một số hợp chất đã phân lập 138
4.3.2. Cơ chế tác dụng gây độc tế bào của oxostephanin 142
4.4. VỀ ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN 146
KÉT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 148
DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ
TÀI LIỆU THAM KHẢO

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
¹ H-NMR	Proton Nuclear Magnetic	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
	Resonance Spectroscopy	proton
¹³ C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
	Resonance Spectroscopy	carbon 13
$[\alpha]_D$		Góc quay cực riêng
AchE	Acetycholinesterase	
BchE	Butyrylcholinesterase	
BuOH	Butanol	
cDNA	Complementary	Acid deoxyribonucleic bổ sung
	Deoxyribonucleic Acide	
CFU	Colony-forming units	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
CFU-EC	Colony Units of Endothelial Cells	Đơn vị hình thành khuẩn lạc của tế bào nội mô
CFU-F	Colony Units of Fibroblasts	Đơn vị hình thành khuẩn lạc của nguyên bào sợi
CI	Cell Index	Chỉ số tế bào
COSY	1H–1H Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác hai chiều ¹ H- ¹ H
DD		Dung dịch
DÐVN		Dược điển Việt Nam
DEPT	Distortionless Enhancement by	Phổ DEPT
	Polarisation Transfer	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle	
	Medium	
DMSO	Dimethyl sulfoxid (CH3)2SO	
EBM	Eagle's Basal Medium	
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic	
	Acide	
ESI-MS	Electrospray Ionisation - Mass	Phổ khối ion hóa phun mù điện
	Spectrometry	tử
EtOAc	Ethyl acetate	

EtOH	Ethanol	
FBS	Fetal Bovine Serum	Huyết thanh thai bò
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2	Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi-2
H358		Dòng tế bào ung thư biểu mô cuống phổi phế nang
HeLa	Human cervical carcinoma	Tế bào ung thư cổ tử cung ở người
HepG2	Human hepatocellular carcinoma	Tế bào ung thư gan ở người
hFBs	Human dermal fibroblasts	Tế bào nguyên bào sợi da của người
HGF	Hepatocyte growth factor	Yếu tố tăng trưởng tế bào gan
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond	Phổ tương quan dị hạt nhân đa
	Connectivity	liên kết
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-ESI-MS	High-Resolution Electron Spray Ionization Mass Strectrometry	Phổ khối phân giải cao ion hoá phun mù điên tử
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
hUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	Tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người
KHV		Kính hiển vi
KLPT		Khối lượng phân tử
IC ₅₀	Half-maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối đa 50%
J		Hằng số tương tác (đơn vị là Hz)
LD_{50}	Median Lethal Dose	Liều gây chết 50%
MCF7	Human breast carcinoma	Tế bào ung thư biểu mô tuyến vú đa kháng thuốc
MDA-MB-231	Hormone-independent breast cancer cell line	Dòng tế bào ung thư vú độc lập với nội tiết tố
MDA	Hormone-independent breast cancer	Ung thư vú độc lập với nội tiết tố

MeOH	Methanol		
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu	
mRNA	Messenger Ribonucleic Acide	Acid ribonucleic thông tin	
MS	Mass Spectrometry	Khối phổ	
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4- sulfophenyl)-2H-tetrazolium		
m/z	Mass to charge ratio	Tỉ lệ khối lượng/điện tích	
N87		Tế bào ung thư biểu mô dạ dày	
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân	
NOESY	Nuclear Overhauser Effect		
	Spectroscopy		
NST		Nhiễm sắc thể	
NXB		Nhà xuất bản	
OD	Optical Density	Mật độ quang học	
Oxo	Oxostephanin		
OVCAR-8	Human ovarian cancer cell line	Dòng tế bào ung thư buồng trứng	
PBS	Phosphate Buffered Saline		
PMS	Phenazine methosulfate		
RNA	Ribonucleic Acide	Acid ribonucleic	
RPMI	Roswell Park Memorial Institute		
RT-qPCR	Reverse Transcription-	Phản ứng chuỗi polymerase	
	quantitative Polymerase Chain	phiên mã ngược định lượng	
	Reaction		
SD1	Stedieltin A		
SD2	Stedieltin B		
SD3	Oxostephanin		
SD4	Oxostephanosin		
SD5	Oxocrebanin		
SKC		Sắc ký cột	
SKÐ		Sắc ký đồ	

SKLM		Sắc ký lớp mỏng
SRB	Sulforhodamine B	
STT		Số thứ tự
TCA	Trichloracetic Acide	
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TLTK		Tài liệu tham khảo
UC-MSCs	Umbilical Cord-derived	Tế bào gốc trung mô có nguồn
	Mesenchymal Stem Cells	gốc từ dây rốn
UV	Ultra violet	Phổ tử ngoại
VEGF	Vascular Endothelial Growth	Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch
	Factor	máu
VX-680	Tozasertib	Dẫn chất aminopyrazol
		quinazolin ức chế không chọn
		loc Aurora kinase
v/v	Volume / volume	Thể tích / thể tích
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
δ		Độ dịch chuyển hóa học (đơn vị
		là ppm)

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Một số tác dụng khác của alcaloid trong củ dòm	21
Bảng 1.2. Kết quả đánh giá độc tính cấp của củ dòm	22
Bảng 1.3. Một số mục tiêu phân tử trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ung	
thư hiện nay và thuốc đại diện	26
Bảng 1.4. Sự biểu hiện quá mức hay khuếch đại gen Aurora kinase ở nhiều loại ung	
thư khác nhau	. 34
Bång 1.5. Một số chất ức chế Aurora kinase	36
Bảng 2.1. Dải nồng độ thử nghiệm của các hợp chất	48
Bảng 2.2. Trình tự các mồi đặc hiệu được sử dụng cho RT-qPCR	56
Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD1 và chất tham khảo oxostephanin	. 64
Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD2 và chất tham khảo oxostephanin	67
Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD3 và hợp chất tham khảo	69
Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD4 và hợp chất tham khảo	70
Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD5 và hợp chất tham khảo	72
Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD6 và hợp chất tham khảo	73
Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD7 và hợp chất tham khảo	75
Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD8 và hợp chất tham khảo	77
Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD9 và hợp chất tham khảo	78
Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD10 và hợp chất tham khảo	79
Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD11 và hợp chất tham khảo	80
Bảng 3.12. Các hợp chất phân lập được từ thân lá cây củ dòm	83
Bảng 3.13. Gradient nồng độ pha động C	87
Bảng 3.14. Tỷ lệ (%) diện tích pic của oxostephanin khi chạy HPLC bằng các pha	
động khác nhau	87
Bảng 3.15. Kết quả khảo sát số lần chiết	90
Bảng 3.16. Kết quả hàm lượng oxostephanin trong dược liệu thu được qua các lần	
chiết	91
Bảng 3.17. Kết quả hàm lượng oxostephanin với lượng dung môi khác nhau	. 91
Bảng 3.18. Kết quả khảo sát thời gian chiết	92
Bảng 3.19. Kết quả độ phù hợp hệ thống	93
Bảng 3.20. Kết quả khảo sát độ tuyến tính	94
Bảng 3.21. Kết quả độ lặp lại giữa các ngày phân tích	95
Bảng 3.22. Kết quả độ thu hồi của oxostephanin	97
Bảng 3.23. Kết quả định lượng oxostephanin trong mẫu dược liệu thu hái tại Bắc	
Giang	98

Bảng 3.24. Đánh giá hàm lượng oxostephanin trong một số mẫu thân lá củ dòm thu	
hái tại Quản Bạ - Hà Giang và vườn giống Ba Vì - Hà Nội	99
Bảng 3.25. IC50 của các hợp chất trên các dòng tế bào ung thư trong thử nghiệm	
MTS (μM) 1	104
Bảng 3.26. Giá trị IC ₅₀ của oxostephanin và VX-680 đối với tế bào ung thư OVCAR-	
8 với thời gian ủ khác nhau 1	107

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh của loài S. dielsiana Y. C. Wu	4
Hình 1.2. Một số đặc điểm hình thái loài Stephania dielsiana Y. C. Wu	. 5
Hình 1.3. Cấu trúc các alcaloid phân lập được từ loài củ dòm	10
Hình 1.4. Cấu trúc các alcaloid phân lập được từ loài củ dòm (tiếp)	11
Hình 1.5. Cấu trúc các hợp chất khác phân lập được từ loài củ dòm	12
Hình 1.6. Tác dụng ức chế sự phát triển các dòng tế bào ung thư của phân đoạn ch	ıính
chiết từ củ dòm (SM2) – In vitro	13
Hình 1.7. Tác dụng ức chế sự phát triển các dòng tế bào ung thư của oxostephanin -	– In
vitro	15
Hình 1.8. Cấu trúc của Aurora kinase A, B và C	28
Hình 1.9. Sự phân bố của Aurora kinase A và B trong nguyên phân	29
Hình 1.10. Aurora kinase B điều hoà sự phân tách nhiễm sắc thể (A) và kiểm soát t	thoi
vô sắc (B)	31
Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu	42
Hình 2.2. Các dòng tế bào ung thư (a) MCF7, (b) HeLa, (c) OVCAR-8, (d) N87,	(e)
HepG2 sau 48h nuôi cấy	49
Hình 3.1. Tóm tắt quá trình chiết xuất, phân lập các hợp chất trong thân lá cây củ d	lòm
	63
Hình 3.2. A) Cấu trúc oxoaporphin; B) Cấu trúc của hợp chất SD1; C) Tương tác HM	BC
chính của hợp chất SD1	66
Hình 3.3. Cấu trúc và tương tác HMBC chính của hợp chất SD2	68
Hình 3.4. Cấu trúc của hợp chất SD3	70
Hình 3.5. Cấu trúc của hợp chất SD4	71
Hình 3.6. Cấu trúc của hợp chất SD5	73
Hình 3.7. Cấu trúc và tương tác HMBC chính của hợp chất SD6	74
Hình 3.8. Cấu trúc của hợp chất SD7	76
Hình 3.9. Cấu trúc của hợp chất SD8	78
Hình 3.10. Cấu trúc của hợp chất SD9	79
Hình 3.11. Cấu trúc của hợp chất SD10	80
Hình 3.12. Cấu trúc của hợp chất SD11	82
Hình 3.13. Quy trình phân lập oxostephanin	86
Hình 3.14. Sắc ký đồ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin	88
Hình 3.15. Phổ hấp thụ tử ngoại của oxostephanin	. 89
Hình 3.16. Sắc ký đồ dung dịch thử khi chạy pha động A (MeOH : acid formic 0,1%	
(tỷ lệ 35:65, v/v))	. 90

Hình 3.17. Sắc ký đồ thẩm định độ đặc hiệu	. 94
Hình 3.18. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng	5
độ của oxostephanin	. 95
Hình 3.19. Sắc ký đồ HPLC của oxostephanin ở nồng độ 0,002441 $\mu g/ml$. 97
Hình 3.20. Hình thái tế bào Hela	100
Hình 3.21. Hình thái tế bào HepG2	100
Hình 3.22. Hình thái tế bào MCF7	100
Hình 3.23. Hình thái tế bào N87	100
Hình 3.24. Hình thái tế bào OVCAR-8	101
Hình 3.25. Hình thái các dòng tế bào thử nghiệm dưới tác dụng của SD1, SD2, SD3,	,
SD4 và SD5 tại thời điểm 48h (VK 10X, Zoom 5,6)	103
Hình 3.26. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 theo thời gian thực lên tế bào)
OVCAR-8	106
Hình 3.27. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 lên thời gian nhân đôi của tế	
bào OVCAR-8	108
Hình 3.28. Hình ảnh nhân tế bào sau khi ủ với oxostephanin và VX-680 trong 48	>
giờ	108
Hình 3.29. Kích thước trung bình của vùng nhân tế bào sau khi ủ với oxostephanin	L
và VX-680 trong 48 giờ	109
Hình 3.30. Oxostephanin gây ra quá trình apoptosis của tế bào OVCAR-8	110
Hình 3.31. Phân tích định lượng phần trăm apoptosis trong các tế bào được xử lý	7
bằng oxostephanin và VX-680	110
Hình 3.32. Khả năng hình thành và phát triển của khối u OVCAR-8 sau khi ủ với	i
oxostephanin và VX-680	111
Hình 3.33. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 lên thể tích tương đối của khối	Ĺ
u	111
Hình 3.34. Hình thái của khối u được xử lý trong hai điều kiện	112
Hình 3.35. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 lên quá trình phosphoryl hoá	i
của H3S10ph	113
Hình 3.36. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 lên sự phân bố của Aurora	ι
kinase B	114
Hình 3.37. Sự biểu hiện của Aurora A và Aurora B đã giảm ở mức mRNA sau khi	i
xử lý bằng oxostephanin và VX-680	114
Hình 3.38. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 đến sự biểu hiện của Aurora	ı
kinase B trong tế bào nguyên phân	115

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 116
Hình 3.40. Khả năng sống sót của các tế bào UC-MSCs, hUVECs và hFBs được xử
lý với các nồng độ oxostephanin khác nhau sau 24, 48 và 72 giờ ủ 116
Hình 3.41. Đường cong ức chế tăng trưởng đáp ứng liều đối với oxostephanin của
ba loại tế bào 117
Hình 3.42. Hình 3.42. Oxostephanin ảnh hưởng đến sự hình thành và hình thái khuẩn
lạc ở tế bào hUVECs và hFBs 117
Hình 3.43. Ảnh hưởng của oxostephanin lên số lượng khuẩn lạc được hình thành ở
tế bào hUVECs và hFBs 118
Hình 3.44. Ảnh hưởng của oxostephanin lên sự bài tiết các yếu tố tăng trưởng ở tế
bào hUVECs và hFBs 119
Hình 3.45. Oxostephanin ức chế sự di chuyển của hUVECs và hFBs thể hiện qua
hình ảnh và độ che phủ vết thương (%) sau một thời gian di chuyển của tế bào 120
Hình 3.46. Ảnh hưởng của oxostephanin đến sự hình thành mạch của hUVECs 120
Hình 3.47. Định lượng sự hình thành mạch khi cấy hUVECs trên Matrigel với sự có
mặt của oxostephanin 121
Hình 3.48. Khả năng ức chế hình thành mạch của oxostephanin trên hUVECs so với
đối chứng (%) 122
Hình 4.1. Hình ảnh cây củ dòm qua một số thời điểm136

ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi *Stephania* Lour. thuộc họ Tiết dê (Menispermaceae) có khoảng trên 100 loài trên thế giới, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới, á nhiệt đới các nước châu Á. Một số loài trong chi *Stephania* Lour. đang là nguồn nguyên liệu chiết xuất một số hoạt chất làm thuốc như L-tetrahydropalmatin, cepharanthin, tetrandrin... Nhiều loài trong chi này được sử dụng làm thuốc phòng và chữa bệnh tùy theo kinh nghiệm của nhân dân từng địa phương.

Loài *Stephania dielsiana* Y.C. Wu có tên thường dùng là củ dòm, ngoài ra còn có các tên khác như bình vôi nhựa tím, cà tòm, củ gà ấp [1], [2] là một trong các loài thuộc chi *Stephania* Lour. đang được quan tâm nghiên cứu trong những năm gần đây. Đây là một loài có phân bố tương đối hẹp, chủ yếu gặp ở miền bắc Việt Nam [2] và một số vùng miền Nam Trung Quốc (như Quảng Tây, Vân Nam) [3]. Nghiên cứu của các tác giả Trung Quốc chủ yếu tập trung vào việc chiết xuất, phân lập các hợp chất từ củ [3], [4], [5], [6] mà chưa quan tâm đến phần thân lá của loài này.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về *Stephania dielsiana* Y.C. Wu đã xác định các đặc điểm thực vật [7]; phân lập và xác định cấu trúc của một số alcaloid có trong thân lá và củ của cây như L-tetrahydropalmatin, oxostephanin, dehydrocrebanin, thailandin, crebanin [8], [5], [10], [11]; 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 [12], [13], [14]. 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 [15], [16], [17], [18], tác dụng giải lo âu, an thần và chống trầm cảm [19], [20], [21], chống viêm giảm đau [22], [23], ức chế acetylcholinesterase [24].

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 [15]. Hàm lượng oxostephanin trong các mẫu thân lá cao hơn nhiều lần so với mẫu củ [13], [14]. 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. Ngược lại, theo kinh nghiệm dân gian thường chỉ thu hái củ khi cây từ 3 – 5 năm tuổi. Khi đó sẽ mất cả cây, thời gian nhân giống và phát triển cây mới cho đến khi thu hái kéo dài. Việc sử dụng thân lá thay cho củ đã được đồng bào dân tộc Dao, dân tộc Tày ... ứng dụng trong thực tế, góp phần bảo tồn cây củ dòm; nâng cao năng suất thu hái, hiệu quả kinh tế. 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 "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)" được tiến hành với các mục tiêu sau:

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

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ THỰC VẬT

1.1.1. Vị trí phân loại

Loài củ dòm có tên khoa học là *Stephania dielsiana* Y.C. Wu, ngoài ra còn có các tên gọi khác như bình vôi nhựa tím, củ tòm, củ gà ấp [1], [2].

Theo hệ thống phân loại của Takhtajan năm 1996 [25], chi *Stephania* Lour. có vị trí phân loại như sau:

Ngành Ngọc lan (Magnoliophyta)

Lóp Ngọc lan (Magnoliopsida),

Phân lớp Hoàng liên (Ranunculidae),

Bộ Hoàng liên (Ranunculales),

Họ Tiết dê (Menispermaceae)

Chi Stephania Lour.

1.1.2. Đặc điểm thực vật loài củ dòm

Dây leo nhỏ, yếu, sống nhiều năm. Rễ củ to. Thân leo cuốn dài khoảng 3 m. Thân non màu tím hồng nhạt. Cành non màu nâu nhạt, khi già chuyển màu nâu xám. Toàn cây không lông, có nhựa màu đỏ. Củ dạng thay đổi, vỏ xù xì có những nốt sần dọc dài, màu nâu xám, nâu nhạt hay màu đất, ruột củ màu hồng, lát cắt có nhiều xơ [26].

Lá đơn màu xanh, mép nguyên, mọc so le, có cuống dài 4,5-8,5 cm. Phiến lá hình tam giác tròn, 9-13 x 8-13,5 cm. Mép lá hơi lượn sóng có răng tù rất thưa ở ngọn; ngọn lá nhọn; gốc bằng hoặc hơi lõm; gân chính xếp chân vịt, xuất phát từ chỗ đính của cuống lá. Gân 9-12 chiếc, tỏa tròn xuất phất từ đỉnh của cuống lá. Cuống lá đính vào 1/5 đến 1/3 phiến lá tính từ gốc [26]. Ngọn non, cuống lá và cuống cụm hoa có màu tím hồng [1].

Hoa đơn tính khác gốc. Cụm hoa đực xim tán kép, cuống cụm hoa dài 1,3-2 cm, gồm 8-12 tán kép, ở gốc tán có lá bắc nhỏ dài 0,8-1,2 cm, mỏng, màu vàng xanh, hình mác đầu nhọn, mép lá màu vàng nhạt có răng cưa, mỗi tán lại gồm 7-11 tán nhỏ, cuống tán rất ngắn. Hoa đực nhỏ, lá đài 6, rời, xếp thành 2 vòng 3, kích thước đều nhau, hình tim, đỉnh nhọn, sống giữa cánh đài có gân màu xanh nâu, có các gân nhỏ màu nâu từ sống giữa tỏa ra 2 bên, mép bên cụp vào trong; cánh hoa 3, rời, đều nhau, xếp xen kẽ lá đài, hình trứng ngược, màu đỏ cam, có các vân màu nâu, dày, nạc, mép cuốn vào bên trong; bộ nhị 6, chỉ nhị dính liền nhau, bao phấn 6, xếp thành vòng tròn trên 1 mặt phẳng [26]. Cột nhị ngắn, bao phấn 6, dính thành đĩa 6 ô [27].

Cụm hoa cái xim tán kép gần dạng đầu, 7-8 đầu nhỏ, cuống rất ngắn [2]. Hoa cái nhỏ, đài 1, màu vàng xanh đậm dần về phía gốc, có các vân màu đỏ, hình mác rộng nhọn đầu, mép dưới cuốn vào trong; cánh hoa 2, rời xếp lệch về 1 phía, màu vàng nhạt, hình trứng ngược, dày, nạc, dài 0,6-1 mm. Bầu hình trứng ngược, cuống ngắn, núm nhụy chia 5 thùy. Quả hình trứng ngược, dài 0,8-1,2cm, khi chín có màu đỏ tươi. Hạt hình móng ngựa (kích thước 6-8mm, 3-5mm) có lỗ nhỏ ở giữa hình trái xoan, trên lưng có 4 hàng gai, mỗi hàng có 13-17 gai. Ra hoa vào tháng 3, có quả vào tháng 5 [26]. Một số đặc điểm hình thái của củ dòm được trình bày trong **hình 1.1** và **hình 1.2**.



1. Lá, 2-3. Hạt [28]



1. Cành mang hoa quả, 2. Hoa đực,
3. Hoa cái, 4. Hạt [2]

Hình 1.1. Hình ảnh của loài S. dielsiana Y. C. Wu

1.1.3. Phân bố của loài củ dòm

Chi *Stephania* Lour. có khoảng 107 loài phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới, á nhiệt đới các nước châu Á như: Trung Quốc (43 loài), Thái Lan (18 loài), Indonesia (17 loài), Việt Nam (23 loài), các nước châu Phi (12 loài), Malaysia (11 loài), Ấn Độ (11 loài), Philippin (8 loài), Papua New Guinea (8 loài), Australia (7 loài), Myanma (5 loài), Đài Loan (5 loài), khu vực Hymalaya (3 loài), Campuchia (3 loài), Nhật Bản (2 loài), Sri Lanka (2 loài), Lào (2 loài), Đông Timor (1 loài), Quần đảo Solomon (1 loài), Banglades (1 loài), Nepal (1 loài)... [29], [30], [31], [32], [33], [34], [35], [36].





Ců





Cụm hoa đực



Cụm hoa cái





Quả xanh Hạt Hình 1.2. Một số đặc điểm hình thái loài *Stephania dielsiana* Y. C. Wu [26]

Ở Việt Nam, theo các tài liệu tham khảo, chi *Stephania* Lour. có 23 loài, các loài bình vôi thường mọc hoang từ vùng núi cao đến vùng đồng bằng, ven biển, có loài mọc ngay trên bãi cát hoặc gò hoang vùng ven biển (*S. pierei* Diels.). Chúng phân bố rộng khắp trên cả 3 miền, từ miền Bắc (Cao Bằng, Lạng Sơn, Quảng Ninh, Hải Phòng, Hà Nội, Hà Tây, Hòa Bình, Yên Bái, Lào Cai, Thái Nguyên, Tuyên Quang, Phú Thọ, Hà Giang, Sơn La, Nam Định, Ninh Bình) đến miền Trung (Thanh Hóa, Nghệ An, Lâm Đồng, Đắc Lắc, Ninh Thuận, Quảng Nam, Đà Nẵng, Thừa Thiên Huế, Bình Định, Phú Yên) và miền Nam (An Giang, Đồng Nai, Sông Bé, Bà Rịa-Vũng Tàu).

Loài củ dòm (*S. dielsiana*) phân bố tương đối hẹp ở Việt Nam, chủ yếu gặp ở các tỉnh miền Bắc như Lào Cai, Yên Bái, Bắc Kạn, Thái Nguyên, Sơn La, Hòa Bình, Phú Thọ, Hà Nội (Hà Tây cũ), Bắc Giang, Bắc Ninh, Quảng Ninh [2], [27], [28], [37], [38], [39], [40].

Tóm lại, củ dòm là một loài bình vôi có nhựa đỏ thuộc chi *Stephania* Lour. phân bố tương đối hẹp ở miền bắc Việt Nam và một số tỉnh phía nam Trung Quốc, hiện đang được xếp vào danh mục VU (sắp nguy cấp) trong Sách đỏ Việt Nam. Cần tiếp tục các nghiên cứu sâu hơn để vừa đảm bảo bảo tồn cây thuốc, vừa phát hiện và chứng minh được tác dụng của các thành phần có hoạt tính sinh học trong cây củ dòm.

1.2. THÀNH PHÀN HOÁ HỌC CÂY CỦ DÒM

1.2.1. Alcaloid

Alcaloid là thành phần chính trong củ và thân lá của cây củ dòm (*Stephania dielsiana* Y.C. Wu). Các nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam đã chiết xuất phân lập được từ loài *S. dielsiana* 27 alcaloid trong đó chiếm tỷ lệ lớn chất là các alcaloid nhóm aporphin (20/27), ngoài ra còn có các alcaloid nhóm morphinan, protoberberin và benzylisoquinolin (**hình 1.3** và **hình 1.4**).

Năm 2009, Zhang Yi và cộng sự đã phân lập và nhận dạng được 12 alcaloid từ loài *Stephania dielsiana* Y.C.Wu là sinoacutin (1), stephanin (2), ayuthianin (3), dehydrostephanin (4), cephamorphinanin (5), aknadinin (6), liriodenin (7), sinomenin (8), L-tetrahydropalmatin (9), (-) corydalmin (10), oxocrebanin (11), nor-canelillin (12) [3].



Hình 1.3. Cấu trúc các alcaloid phân lập được từ loài củ dòm



Hình 1.4. Cấu trúc các alcaloid phân lập được từ loài củ dòm (tiếp)

Năm 2011, Yecheng Deng và cộng sự đã phân lập được hai alcaloid từ loài *Stephania dielsiana* Y.C.Wu là stephanin (**2**) và crebanin (**13**) [5].

Năm 2018, De-Xiong Zhou và cộng sự đã phân lập được 17 alcaloid nhóm aporphin bao gồm stephanin (2), ayuthianin (3), dehydrostephanin (4), liriodenin (7), oxocrebanin (11), crebanin (13), dehydrocrebanin (14), stesakin (15), isolaurelin (16), oxoputerin (17), (+)-*O*-methylbulbocapnin (18), 8demethyldehydrocrebanin (19), vireakin (20), dehydroisolaurelin (21), sukhodianin (22), crebanin *N*-oxid (23), và dehydroroemerin (24) [4].

Các nghiên cứu của Đào Đức Thiện và cộng sự năm 2018 [41], của J. Knockleby và cộng sự năm 2020 [42] đều sử dụng nguyên liệu là thân lá loài *S. dielsiana* thu hái ở Việt Nam và đều phân lập được 7 alcaloid là stephanin (2), tetrahydropalmatin (9), crebanin (13), *O*-methylbulbocapnin (18), oxostephanin (25), palmatin (26) và thailandin (27).

Ở Việt Nam, năm 2009, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Quốc Huy đã phân lập và nhận dạng được ba alcaloid từ củ của loài củ dòm là: L-tetrahydropalmatin (9), dehydrocrebanin (14) và oxostephanin (25) [8].

Từ thân lá củ dòm, nghiên cứu của Nguyễn Quốc Huy, Phạm Thanh Kỳ đã phân lập và xác định cấu trúc của oxostephanin (**25**) [9]; Nguyễn Vũ Minh và cộng sự đã phân lập và xác định cấu trúc của thailandin (**27**) [10].

1.2.2. Các nhóm hợp chất khác

Năm 2009, Zhang Yi và cộng sự đã phân lập và nhận dạng được bốn lignan gồm gomisin A (**28**), gomisin B (**29**), schisandrin C (**30**), 6-O-benzoyl-gomisin (**31**), một oligopeptid asterinin B (**32**) và một sterol β -sitosterol (**33**) từ rễ loài *S*. *dielsiana* [3].

Năm 2018, Yan Liang và cộng sự đã phân lập được 2 flavonoid là rutin (34), quercetin (35) và các sterol là β -sitosterol (33), stigmasterol (36) và α -spinasterol (37) từ phân đoạn không alcaloid của cây củ dòm [6].

Cấu trúc của các hợp chất khác phân lập từ củ dòm được trình bày trong hình 1.5.



Hình 1.5. Cấu trúc các hợp chất khác phân lập được từ loài củ dòm

Tóm tại, từ củ của loài củ dòm, các nhà khoa học trên thế giới và ở Việt Nam đã chiết xuất, phân lập 25 alcaloid và 10 hợp chất phi alcaloid; trong khi đó từ thân lá loài củ dòm mới có công bố về phân lập 7 alcaloid và chưa có công bố về các hợp chất khác trong thân lá. Trong số 7 alcaloid đã được phân lập từ thân lá củ dòm có 5 hợp chất gặp cả trong củ và thân lá là stephanin, L-tetrahydropalmatin, crebanin, *O*-methylbulbocapnin, oxostephanin; 2 hợp chất mới được tìm thấy trong thân lá, chưa gặp trong củ là palmatin và thailandin.

Như vậy, các công bố về thành phần hoá học của phần củ và phần thân lá loài củ dòm có sự khác biệt đáng kể, cần thiết phải có thêm các nghiên cứu sâu hơn về thành phần hoá học cũng như tác dụng sinh học của các hợp chất có trong thân lá của loài này.

1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC, CÔNG DỤNG VÀ ĐỘC TÍNH CỦA CỦ DÒM 1.3.1. Tác dụng sinh học

1.3.1.1. Tác dụng trên các dòng tế bào ung thư

 Tác dụng trên các dòng tế bào ung thư của phân đoạn chiết xuất từ cây củ dòm

Phân đoạn SM2 (phân đoạn dichloromethan và ethylacetat) từ củ loài *S. dielsiana* đã được Nguyễn Quốc Huy và cộng sự [17] đánh giá có tác dụng ức chế tốt sự tăng trưởng của 6 dòng tế bào ung thư: tế bào ung thư dạ dày (N87), tế bào ung thư buồng trứng (OVCAR-8), tế bào ung thư vú (MDA-MB-231), tế bào ung thư cổ tử cung HeLa, tế bào ung thư gan (HepG2), tế bào ung thư biểu mô cuống phổi và phế nang ở người (H358) với IC₅₀ lần lượt là 10,27; 12,21; 18,24; 22,84; 26,18; 30,09 μ g/ml (**hình 1.6**). Trong khi đó phân đoạn SM1 (phân đoạn n-hexan) chỉ có tác dụng ức chế yếu trên ba dòng tế bào ung thư N87, HepG2, HeLa với IC₅₀ tương ứng là 35,73; 87,2; 94,6 μ g/ml. Phân đoạn SM3 (phân đoạn nước) không có tác dụng trên 6 dòng tế bào ung thư thử nghiệm.



Hình 1.6. Tác dụng ức chế sự phát triển các dòng tế bào ung thư của phân đoạn chính chiết từ củ dòm (SM2) – *In vitro [17]*

Phân đoạn SM2 từ củ loài nghiên cứu tiếp tục được đem thử nghiệm *in vivo* sử dụng mô hình gây khối u rắn Sarcoma180 trên chuột nhắt trắng chủng Swiss; đã làm giảm tốc độ tăng trưởng (tỷ lệ gây thoái lui khối u dưới tác dụng là 35,7 %) và thể tích khối u Sarcom180 so với chuột đối chứng (giảm 32,6 %). Phân đoạn SM2 không ảnh hưởng nhiều đến khả năng sống của chuột thí nghiệm. Tỷ lệ gây chết của SM2 là 6,7 %, thấp hơn nhiều so với đối chứng ung thư không điều trị (10,0 %) và đối chứng dương 6MP (Mercaptopurine) (70,0 %) [16].

Năm 2020, James Knockleby và cộng sự [42] đã phân lập được 7 hợp chất alcaloid từ lá của cây củ dòm và tiến hành thử tác dụng gây độc tế bào trên một số dòng tế bào ung thư (HeLa, MDA-MB-231, MDA-MB-468 và MCF7) và hai dòng tế bào non-cancer (184B5 và MCF10A) của các phân đoạn dịch chiết, cũng như các hợp chất phân lập được. Kết quả cho thấy:

- Phân đoạn MB2L (phân đoạn methanol) có tác dụng gây độc với các dòng tế bào ung thư (HeLa, MDA-MB-231, MDA-MB-468 và MCF7) với IC₅₀ lần lượt là 6,1; 7,8; 3,8; 5,9 μ g/mL.

 Phân đoạn MB2L-CH (phân đoạn dicloromethan) có tác dụng gây độc không chọn lọc với hầu hết các dòng tế bào thử nghiệm: các dòng tế bào ung thư (HeLa, MDA-MB231, MDA-MB-468 và MCF7) và hai dòng tế bào non-cancer (184B5 và MCF10A).

- Phân đoạn MB2L-B (phân đoạn butanol) có tác dụng gây độc chọn lọc cao trên các dòng tế bào ung thư (HeLa, MDA-MB-231, MDA-MB-468 và MCF7) với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 0,57–14,35 μg/mL.

- Phân đoạn MB2L-H (phân đoạn n-hexan) không thể hiện tác dụng.

Tác dụng trên các dòng tế bào ung thư của các hợp chất chiết xuất, phân lập được từ cây củ dòm

Các hợp chất phân lập từ củ dòm cũng có tác dụng gây độc tế bào ung thư, đặc biệt là các chất oxostephanin, dehydrocrebanin, thailandin, stephanin, crebanin, palmatin, cụ thể như sau:

* Oxostephanin

Các nguyên cứu của Nguyễn Quốc Huy và cộng sự [15], [18], từ phân đoạn SM2 (phân đoạn dichloromethan và ethylacetat) chiết xuất từ củ loài *S. dielsiana*, 3 hợp chất tinh khiết đã được phân lập, trong đó oxostephanin thể hiện tác dụng ức chế

trên 05 dòng tế bào ung thư thử nghiệm: dòng tế bào ung thư buồng trứng (OVCAR-8), ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư gan (HepG2), ung thư vú (MDA-MB-231) và ung thư cuống phổi phế nang (H358) với giá trị IC₅₀ theo thứ tự: $0,34 \pm 0,02$; $0,66 \pm 0,06$; $0,7 \pm 0,05$; $1,02 \pm 0,04$ và $1,84 \pm 0,02$ (µg/ml) với chất đối chiếu là Taxol [15]. Nghiên cứu cũng cho thấy oxostephanin có tác dụng ức chế yếu đối với dòng tế bào ung thư dạ dày N87 với IC₅₀ = $28,35 \pm 0,07$ µg/ml (**hình 1.7**).



Hình 1.7. Tác dụng ức chế sự phát triển các dòng tế bào ung thư của oxostephanin – *In vitro* [15]

Oxostephanin kích thích quá trình apoptosis (kích thích tế bào chết theo chương trình) ở tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8, sau 24h xử lý tế bào với nồng độ 1 µg/ml, tỷ lệ apoptosis tăng lên 6,5 lần [18].

Trong một nghiên cứu ở Thái Lan, oxostephanin đã được phân lập từ loài *Stephania venosa* (Blume) Spreng và đã thử tác dụng kháng một số dòng ung thư cho kết quả oxostephanin có tác dụng trên 2 dòng tế bào ung thư thử nghiệm, đã xác định IC₅₀ của oxostephanin trên 2 dòng tế bào ung thư vú (BC - Breast cancer) và MOLT-3 (Acute lymphoblastic leukemia) với IC₅₀ lần lượt là 0,24 và 0,71 µg/ml [43].

Năm 2018, Đào Đức Thiện và cộng sự cũng đã đánh giá tác dụng gây độc trên 2 dòng tế bào ung thư vú ở người (human breast cancer cell line – BT474) và tế bào ung thư ruột kết ở người (human colon cancer cell line – HCT116) của 7 alcaloid phân lập được từ loài *S. dielsiana* là tetrahydropalmatin, stephanin, crebanin, O-methylbulbocapnin, oxostephanin, palmatin và thailandin; chất đối chiếu được sử dụng là Docetaxel. Kết quả cho thấy oxostephanin thể hiện khả năng gây độc trung bình trên cả hai dòng tế bào ung thư thử nghiệm với IC₅₀ lần lượt là 9,53 và 8,54 μ g/ml [41].

Nghiên cứu năm 2020 của James Knockleby và cộng sự với 7 alcaloid phân lập từ thân lá loài S. dielsiana Y.C. Wu cho kết quả oxostephanin có tác dụng mạnh nhất, ức chế một số dòng tế bào ung thư bao gồm HeLa, MDA-MB231, MDA-MB-468, MCF-7 và các dòng tế bào không ung thư 184B5 và MCF10A, với giá trị IC₅₀ tương ứng là $1,76 \pm 0,20$; $2,67 \pm 0,29$; $2,26 \pm 0,54$; $4,35 \pm 1,20$; $1,66 \pm 0,56$; $2,49 \pm 0,11 \mu M$ [42]. Nghiên cứu trên dòng tế bào HeLa cũng đã chỉ ra oxostephanin gây dừng chu trình tế bào ở pha G2/M hoặc gây ra thể đa bội. Dữ liệu từ Western blot cho thấy khi xử lý tế bào, quá trình phosphoryl hóa Aurora A, B và C đã giảm, như vậy oxostephanin ức chế sự tự phosphoryl hóa của cả ba Aurora kinase. Nghiên cứu in silico chỉ ra oxostephanin sẽ tương tác với vùng liên kết ATP của Aurora A (cấu trúc tinh thể 400U) khi gắn chặt vào toàn bộ cấu trúc của Aurora A, được "khóa" trong vùng kỵ nước, nơi nó sẽ tương tác với dư lượng fluorophenyl Leu-210. Ngoài ra, oxostephanin cũng có khả năng hình thành liên kết hydro với Glu-211 và Ala-213, hai acid amin tương tác với adenin của ATP. Điều này cho thấy rằng oxostephanin sẽ chiếm phần lớn không gian giống như một phân tử ATP và do đó, cạnh tranh hiệu quả với nó để liên kết với thụ thể. Tương tự, oxostephanin cũng tương tác với thụ thể liên kết ATP ky nước của Aurora kinase B.

* Dehydrocrebanin

Dehydrocrebanin được chiết xuất từ phân đoạn SM2 của củ loài *S. dielsiana* và được đánh giá có tác dụng gây độc trên 2 dòng tế bào ung thư là ung thư buồng trứng OVCAR-8 và ung thư vú (MDA-MB-231), với giá trị IC₅₀ lần lượt là 1,38 ± 0,05 và 5,00 ± 0,03 µg/ml. Dehydrocrebanin thể hiện tác dụng gây độc trung bình đến yếu trên tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư gan (HepG2) và ung thư cuống phổi phế nang (H358) với giá trị IC₅₀ theo thứ tự là 30,50 ± 0,07; 8,90 ± 0,09; $37,91 \pm 0,1 \mu$ g/ml [15].

* Thailandin

Trong nghiên cứu về loài *S. venosa* ở Thái Lan năm 2011, thailandin đã được chiết xuất phân lập và đánh giá tác dụng kháng các tế bào ung thư phổi (A549) mạnh với IC₅₀ là 0,30 μ g/ml; gây độc rất thấp trên tế bào phổi phôi thai bình thường (MRC-5) [43].

Nghiên cứu năm 2018 của Đào Đức Thiện và cộng sự [41] cho thấy thailandin thể hiện khả năng gây độc mạnh trên cả hai dòng tế bào ung thư thử nghiệm là tế bào ung thư vú ở người (human breast cancer cell line – BT474) và tế bào ung thư ruột kết ở người (human colon cancer cell line – HCT116) với IC₅₀ lần lượt là 1,89 và 2,76 μ g/ml.

James Knockleby và cộng sự [42] chứng minh thailandin thể hiện độc tính tế bào đáng kể đối với các dòng tế bào ung thư và không ung thư thực nghiệm với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 0,78 đến 7,11 μ M, trong đó đặc biệt có hiệu quả trên dòng tế bào ung thư MDA-MB-468 và MCF7 với IC₅₀ lần lượt là 0,78 ± 0,12 và 1,99 ± 1,36 μ M. Đây được coi là một hợp chất kháng ung thư tiềm năng.

* Stephanin

Stephanin gây độc với dòng tế bào ung thư vú BT474 và ung thư ruột kết HCT116 với IC₅₀ lần lượt là 1,55 và 6,14 µg/ml [93], gây độc trên các dòng tế bào ung thư HeLa, MDA-MB231, MDA-MB-468, MCF-7 và các dòng tế bào không ung thư 184B5 và MCF10A với IC₅₀ tương ứng là 3,33 \pm 0,23; 5,66 \pm 0,16; 7,14 \pm 2,11; 6,49 \pm 0,43; 6,25 \pm 0,14 và 7,19 \pm 0,33 µM [42].

* Crebanin

Nghiên cứu của Nantapap và cộng sự năm 2010 cho thấy crebanin gây độc với 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm là tế bào tạo hồng cầu nhạy cảm với adriamycin (K562), tế bào tạo hồng cầu kháng adriamycin (K562/Adr) với sự biểu hiện của ABCB1/MDR1 P-glycoprotein, ung thư phổi tế bào nhỏ nhạy cảm với adriamycin (GLC4) và ung thư phổi tế bào nhỏ kháng adriamycin GLC4/ Adr với sự thể hiện của ABCC1/MRP1 với IC₅₀ trong khoảng từ 7,17 – 10,31 µg/ml [44]. Nghiên cứu này cũng chứng minh crebanin ngăn chặn pha G0/G1 trong chu trình tế bào.

Cũng nghiên cứu về crebanin chiết xuất từ loài *S. venosa*, Wongsirisin và cộng sự đã chỉ ra hợp chất này có tác dụng ức chế đáng kể sự tăng sinh của các tế bào bạch cầu ở người (HL-60, U937 và K562), tế bào sarcoma sợi ở người (HT1080) và dòng tế bào ung thư cổ tử cung (KB-3-1 và KB-V1), trong đó tế bào HL-60 nhạy cảm nhất với crebanin. Ngược lại, crebanin gây ra ít độc tính hơn nhiều trong các tế bào nguyên bào sợi bình thường của con người. Crebanin gây ra quá trình chết theo chương trình, đi kèm với sự gia tăng phân cắt caspa se-3, -8, -9 và poly(ADP-ribose) polymerase

(PARP), và được cho là do sự gia tăng mức độ protein Bax/Bcl. Crebanin cũng làm giảm khả năng tạo màng của ty thể [45].

Ngoài ra crebanin gây độc mạnh trên dòng tế bào ung thư vú BT474 với IC₅₀ = 1,58 μ g/ml [41], gây độc yếu trên các dòng tế bào ung thư HeLa, MDA-MB231, MDA-MB-468, MCF-7 và các dòng tế bào không ung thư 184B5 và MCF10A với IC₅₀ từ 17 - 48 μ M [42].

* Oxocrebanin

Oxocrebanin được chứng minh là alcaloid có hoạt tính chống ung thư vú ở *S. hainanensis*. Nó thể hiện hiệu quả ức chế tốt nhất trên tế bào MCF-7 với IC₅₀ là 16,66 µmol/l, và chỉ có tác dụng yếu đối với sự tăng sinh của tế bào MCF-10A. Oxocrebanin ức chế Topo I và II α trong hệ thống không tế bào và trong tế bào MCF-7. Thử nghiệm tháo cuộn DNA cho rằng oxocrebanin xen kẽ với DNA như một chất ức chế xúc tác. Oxocrebanin điều chỉnh mức độ Topo I và II α và các protein liên quan đến tổn thương DNA. Oxocrebanin dẫn đến ngăn cản quá trình nguyên phân, và những tác động này xảy ra thông qua cả hai con đường phụ thuộc p53 và không phụ thuộc p53. Oxocrebanin gây ra hiện tượng autophagy, hình thái α -tubulin bất thường và kích thích động lực tăng cường của vi mạch [46].

* O-methylbulbocapnin

Tác dụng gây độc của *O*-methylbulbocapnin trên các dòng tế bào K562, K562/Adr, GLC4 và GLC4/Adr yếu hơn so với crebanin với IC₅₀ trong khoảng từ $8,73 - 14,18 \mu$ g/ml song cơ chế tác dụng là tương tự do đều ngăn chặn pha G0/G1 của chu trình tế bào [44]. *O*-methylbulbocapnin làm nhạy cảm dòng tế bào ung thư biểu mô buồng trứng ở người SKOV3 với cisplatin thông qua việc ức chế tín hiệu Akt/NF-κB và điều chỉnh giảm các sản phẩm gen qua trung gian NF-κB [47].

1.3.1.2. Tác dụng giảm đau, chống viêm

Dịch chiết nước từ củ loài củ dòm với liều tương đương 2,5g và 5g dược liệu/kg thể trọng chuột có tác dụng giảm đau ngoại biên theo kiểu aspirin và thể hiện tác dụng chống viêm sau 24 giờ. Với liều thí nghiệm 5g/kg thể trọng, củ loài *S. dielsiana* có tác dụng làm giảm u hạt, tác dụng gần tương tự tác dụng chống viêm của prednisolon với liều 5mg/kg [22].

Phân đoạn dichloromethan từ củ là phân đoạn giàu oxostephanin, với mức liều tương đương 9 g/kg chuột đã làm giảm được 52,4% tổng số cơn đau quặn so với lô

chứng; làm tăng ngưỡng đau của chuột cống lên 111,5%, so với indomethacin là 125,9%; làm giảm khối lượng u hạt ướt 21,55% và giảm khối lượng u hạt khô là 30,8% [23].

Oxocrebanin là một alcaloid được báo cáo có trong củ dòm đã được chứng minh tác dụng chống viêm đáng kể bằng cách ức chế tiết NO. Oxocrebanin cũng ức chế đáng kể sự biểu hiện của prostaglandin E2, yếu tố hoại tử khối u- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, cảm ứng nitric oxide synthase, và biểu hiện protein cyclooxygenase (COX)-2 bằng cách bất hoạt yếu tố hạt nhân κ B, c-Jun NH₂- kinase tận cùng, kinase 1/2 điều chỉnh tín hiệu ngoại bào và các con đường truyền tín hiệu viêm phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. Phân tích docking phân tử cho thấy thêm rằng oxocrebanin có ái lực cao hơn với protein COX-2 so với các phối tử gốc [48].

Một số alcaloid khác như crebanin, *O*-methylbulbocapnin cũng đã được chứng minh tác dụng giảm đáp ứng trong phản ứng viêm [49], [50].

1.3.1.3. Tác dụng an thần, gây ngủ, giải lo âu, chống trầm cảm

Củ dòm có tác dụng kéo dài thời gian ngủ khi phối hợp với thiopentan lên 3 lần với liều 1,25 g/kg chuột và 8 lần với liều 2,5 g/kg chuột so với lô chỉ dùng thiopentan. Ở liều 2,5g củ dòm/kg chuột, củ dòm có tác dụng làm giảm hoạt động của chuột đến 78,8 % và tác dụng này có tính phụ thuộc liều. Tăng đến liều 10g củ dòm/kg, chuột gần như nằm im, không hoạt động [51].

Dịch chiết nước toàn phần và cắn alcaloid toàn phần loài *S. dielsiana* ở mức liều 30 mg/kg thể hiện tác dụng tương đương với diazepam liều 2 mg/kg trên cả số lần di chuyển vào tay mở và thời gian lưu lại tay này trong mô hình đánh giá tác dụng giải lo âu EPM ở chuột bình thường. Liên quan đến tác dụng chống lo âu toàn thể, clomipramin (25 mg/kg) và *S. dielsiana* (17,5 mg/kg) làm tăng có ý nghĩa thời gian tiềm tàng của đáp ứng chạy trốn mà không làm thay đổi đáp ứng né tránh so với lô chứng [19].

L-tetrahydropalmatin là một alcaloid tìm thấy trong củ của loài nghiên cứu đã được chứng minh các tác dụng giảm đau, an thần gây ngủ (và tăng cường tác dụng thuốc gây ngủ), tăng cường quá trình ức chế trong các tế bào thần kinh ở vỏ bán cầu đại não và thể lưới thân não [40], [52], [53]. Tuy nhiên hàm lượng L-tetrahydropalmatin trong củ dòm chỉ khoảng 0,40%, tương đối thấp hơn so với các loài bình vôi khác như *S. brachyandra* (khoảng 3,69%) và *S. sinica* (khoảng 2,43%)

[26] cho thấy đây không phải là nguồn nguyên liệu tiềm năng để chiết xuất Ltetrahydropalmatin.

1.3.1.4. Tác dụng diệt ký sinh trùng sốt rét

Năm 2020, James Knockleby và cộng sự đã chiết xuất và đánh giá tác dụng diệt ký sinh trùng sốt rét của các phân đoạn dịch chiết từ thân lá loài *S. dielsiana*, kết quả cho thấy: phân đoạn MB2L-CH (phân đoạn dicloromethan) và MB2L-B (phân đoạn butanol) có hoạt tính tương tự nhau với giá trị IC₅₀ tương ứng trong khoảng 4,5 - 7,9 µg/mL và 5,8 - 7,1 µg/mL đối với *Plasmodium falciparum* chủng 3D7 nhạy cảm với chloroquin và W2 kháng chloroquin. Phân đoạn MB2L (phân đoạn methanol) và MB2L-H (phân đoạn n-hexan) không thể hiện tác dụng [42].

Nghiên cứu này cũng cho thấy thailandin hoạt động mạnh nhất so với các alcaloid trong cùng nghiên cứu trên cả hai chủng *P. falciparum* với IC₅₀ là 0,22 μ M đối với 3D7 (chủng nhạy cảm với cloroquin) và 0,24 μ M đối với W2 (chủng kháng cloroquin). Stephanin thể hiện tác dụng trên chủng *P. falciparum* nhạy cảm với cloroquin 3D7 tốt hơn so với chủng kháng cloroquin W2 (IC₅₀ tương ứng là 0,69 μ M và 1,32 μ M); tác dụng của crebanin trên 2 chủng *P. falciparum* 3D7 và W2 kém hơn so với stephanin.

Ngoài ra một số alcaloid khác như dehydrocrebanin, dehydrostephanin cũng được chứng minh có tác dụng ức chế sự phát triển của *P. falciparum* với IC₅₀ lần lượt là 70 và 40 ng/ml [54] hay dehydroroemerin có tác dụng tốt trên *P. falciparum* chủng kháng cloroquin W2 với IC₅₀ = 0,36 μ M [55].

1.3.1.5. Tác dụng kháng khuẩn

Hoạt tính của cao chiết MeOH từ củ loài *S.dielsiana* chống lại 10 vi khuẩn gây bệnh được xác định bằng phương pháp đĩa thạch, và kết quả cho thấy cao chiết MeOH thể hiện sự ức chế cao đối với năm vi khuẩn gram dương: *Micrococcus lysodeikticus, Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis* và *Staphylococcus aureus*, với các giá trị MIC tương ứng là 1,875, 0,625, 1,875, 1,25 và 3,75 g/l. Cao chiết cũng có tác dụng ức chế đối với bốn vi khuẩn gram âm *Escherichia coli, Proteus vulgaris, Salmonella typhi* và *Shigella dysenteriae*, với các giá trị MIC tương ứng là 7,5, 5, 2,5 và 1,25 g/l, nhưng khả năng ức chế vi khuẩn gram âm *Pseudomonas aeruginosa* thấp [5]. Thailandin ức chế *Mycobacterium tuberculosis* với MIC = 6,25 mg/ml và có tác dụng tốt trên các vi khuẩn Gram dương như *Streptococcus pneumoniae* và *S. aureus* [43].

STT	Alcaloid	Tác dụng	TLTK
1.	(-)corydalmin	Úc chế AChE	[56]
2.	Crebanin	Tăng cường trí nhớ trong thử nghiệm,	[50],
		ức chế AChE, chống loạn nhịp tim	[57]
3.	Liriodenin	Kháng ký sinh trùng Leismania (IC50	[58]
		$= 26,16 \mu M$)	
		Kháng ký sinh trùng Plasmodium	
		<i>falciparum</i> (IC ₅₀ = 15 μ M)	
4.	Palmatin	Úc chế AChE và butyrylcholinesterase	[56],
		(BChE)	[59],
			[60]
5.	L-	Úc chế thần kinh vận động, ức chế	[61],
	tetrahydropalmatin	trung tâm điều nhiệt và làm giãn các	[62],
		mạch ngoại vi, giảm triệu chứng tăng	[63],
		cường đáp ứng thức ăn và vận động,	[64],
		giảm huyết áp của mèo và thỏ, làm	[65]
		tăng tần số và biên độ hô hấp (chữa hen	
		hay nấc), chống co giật, cai nghiện	
		oxycodon.	
6.	Sinoacutin	Giãn cơ	[66]

1.3.1.6. Một số tác dụng khác của alcaloid trong củ dòm Bảng 1.1. Một số tác dụng khác của alcaloid trong củ dòm

1.3.2. Độc tính của củ dòm

1.3.2.1. Độc tính cấp

Dịch chiết nước của củ dòm (*S. dielsiana* Y. C. Wu) khi dùng theo đường uống trên chuột nhắt trắng đã xác định LD_{50} là 22,2 (18,5 – 26,6) g/kg TTC [26]. Kết quả đánh giá độc tính cấp của *S. dielsiana* được thể hiện trong **bảng 1.2**.

Tình trạng chung và dấu hiệu ngộ độc:

Nhóm 1. Sau khi uống thuốc, chuột giảm hoạt động, nằm yên, sau 2 - 3 giờ trở dậy ăn uống và hoạt động bình thường.

Nhóm 2. Sau khi uống thuốc, chuột giảm hoạt động, nằm yên trong khoảng 5 - 15 phút sau đó có biểu hiện co giật như: Giật mồm, giật nhẹ từng cơn, không đứng thẳng được, đuôi dựng ngược.

 - Với các chuột bị chết có biểu hiện: Giật tung người, lăn lộn, vật vã, xoay tròn người 10 - 20 phút rồi chết, một số con trào máu ở miệng.

- Với những chuột còn sống: Thỉnh thoảng giật nhẹ từng cơn, sau khoảng 3 4 giờ thì dậy ăn uống và hoạt động trở lại.

Nhóm 3,4,5,6. Biểu hiện ở chuột sống và chết tương tự như ở nhóm 2 song với mức độ nặng hơn và tăng dần lên (thời gian lăn lộn, vật vã, xoay tròn người ngắn từ 2 - 5 phút; cơn co giật với mức độ nặng hơn; thời gian trở lại hoạt động bình thường lâu hơn).

Nhóm	Liều dùng (g/kg chuột)	Số chuột thí nghiệm	Số chuột chết	% chết thực tế
1.	15,0	8	0	0,0
2.	20,0	8	4	50,0
3.	25,0	7	4	57,1
4.	30,0	7	4	57,1
5.	35,0	7	6	85,6
6.	40,0	7	7	100,0

Bảng 1.2. Kết quả đánh giá độc tính cấp của củ dòm

1.3.2.2. Độc tính bán trường diễn

Thỏ uống dịch chiết củ dòm (*S. dielsiana* Y.C.Wu.) liên tục trong một tháng với mức liều tương đương 1g bột dược liệu/ kg thỏ/ ngày chưa nhận thấy sự khác nhau có ý nghĩa về các chỉ số huyết học và một số chỉ số sinh hoá so với nhóm chứng. Riêng chỉ số ALT ở nhóm thử giảm đáng kể, nhưng so với nhóm chứng kết quả khác nhau không có ý nghĩa thống kê (P > 0,05) [26].

1.3.3. Công dụng

Nhân dân thường dùng củ dòm *(Stephania dielsiana* Y. C. Wu.) làm thuốc chữa đau đầu, sốt rét, phù thũng, đau lưng, chân tay mỏi nhức, đau bụng [67], [68].

Rễ củ dòm dùng làm thuốc kiện vị, chỉ thống; trị phù thũng, giải độc, đau xương khớp. Rễ củ có hoạt chất có tác dụng an thần, giảm đau [2].

Theo Võ Văn Chi [38], [69], rễ củ dòm dùng uống, chữa đau lưng, mỏi nhức chân, đau lưng, đau bụng, lại giúp ngủ rất say. Còn dùng đắp chỗ sưng bắp chuối, nhọt cứng, apxe do viêm. Người ta thường giã lẫn với muối và gừng. Nhân dân ở Bắc Thái, Hà Tây thường dùng củ thái nhỏ nấu nước uống, chữa kiết lỵ ra máu, đau bụng kinh niên và đau dạ dày.

Theo kết quả điều tra tri thức sử dụng loài nghiên cứu làm thuốc ở Ba Vì (Hà Nội) [26], chủ yếu người dân sử dụng củ loài củ dòm để chữa bệnh (FV = 100%) với cách dùng là sắc uống (FV = 100%). Trong đó, người dân cũng sử dụng thân và lá loài nghiên cứu để chữa bệnh (với độ tin cậy FV = 85% và 80%), thường trong các bài thuốc chữa các chứng bệnh: tê thấp đau nhức (FV = 100%); đau dạ dày (FV = 96,67%); thần kinh suy nhược (FV = 16,67%); chữa bệnh thận (FV = 11,67); chữa mất ngủ (FV = 5%).

Như vậy, cả củ và thân lá của cây củ dòm đã được chứng minh có các tác dụng sinh học phong phú, trong đó đáng chú ý là các tác dụng kháng ung thư, giảm đau, chống viêm, an thần gây ngủ, diệt ký sinh trùng sốt rét, kháng khuẩn. Các tác dụng đó có được khi dùng dịch chiết, cao phân đoạn và các hợp chất tinh khiết phân lập từ loài này. Trong số các hợp chất đã công bố, oxostephanin thể hiện tác dụng gây độc tương đối mạnh trên một số dòng tế bào ung thư thực nghiệm, là một chất có tiềm năng trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ung thư. Cần tiếp tục đánh giá tác dụng sinh học của các hợp chất phân lập từ thân lá cây củ dòm nhằm tìm kiếm các chất mới theo hướng điều trị ung thư cũng như bước đầu làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của hợp chất oxostephanin.

1.4. MỤC TIÊU PHÂN TỬ TRONG PHÁT TRIỄN THUỐC ĐIỀU TRỊ UNG THƯ

1.4.1. Tổng quan về một số mục tiêu phân tử trong nghiên cứu và phát triển thuốc điều trị ung thư

1.4.1.1. Khái niệm mục tiêu phân tử

Ung thư vẫn tồn tại như là một nguyên nhân chính dẫn tới tử vong trên toàn thế giới, chiếm gần 10 triệu ca tử vong vào năm 2020 [70]. Mặc dù trong những năm qua, phép trị liệu hóa học đã cứu giúp mạng sống của hàng ngàn người, việc

sử dụng các hợp chất đó trên lâm sàng còn rất nhiều hạn chế vì độc tính cao, thiếu tính chọn lọc trên các khối u, và hiệu lực điều trị thấp. Thêm vào đó, hầu hết các thuốc ung thư thường dùng đều có cùng cơ chế tác dụng, vì vậy hiện tượng kháng thuốc trở thành một trong những thử thách lớn. Nhằm tìm ra những thuốc điều trị ung thư mới hiệu quả hơn, chọn lọc hơn và ít tác dụng phụ hơn, các nhà khoa học hiện nay đã và đang đi theo một phương pháp nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ung thư mới đầy triển vọng, đó là phương pháp nghiên cứu phát triển thuốc mới dựa trên mục tiêu phân tử (target-based drug discovery).

Mục tiêu phân tử hay mục tiêu sinh học của thuốc là những phân tử hoặc quá trình sinh học (*biochemical process*) trong cơ thể có vai trò quyết định đối với cơ chế bệnh sinh. Ví dụ: ADN, protein, enzym, receptor, kênh ion,... [71].

Cơ chế tác dụng của các thuốc điều trị nhắm đích thường là ức chế, khoá hoặc làm mất vai trò của mục tiêu phân tử trong chuỗi sinh học tế bào.

Mục tiêu phân tử chính là đích tác dụng của thuốc.

1.4.1.2. Các mục tiêu phân tử hiện nay trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ung thư

Hiện nay, ngăn cản sự tạo mạch và sự di căn của khối u vẫn đang là một trong những hướng nghiên cứu chính trong thiết kế các thuốc điều trị ung thư. Những hiểu biết cặn kẽ trên cơ sở sinh học về mối quan hệ mật thiết giữa sự tạo mạch và sự di căn của khối u đã mở đường cho việc khám phá ra hàng loạt mục tiêu phân tử, những chất đóng vai trò then chốt trong các quá trình đó. Trong đó, đặc biệt quan trọng là nhóm các yếu tố phát triển, bao gồm: yếu tố phát triển nguyên bào sợi (FGF), yếu tố phát triển có nguồn gốc tiểu cầu (PDGF), yếu tố phát triển nội mô thành mạch (VEGF). Các yếu tố phát triển và các receptor tyrosine kinase tương ứng đang trở thành một nhóm mục tiêu quan trọng giúp ngăn cản sự sinh sản của các tế bào nội mô, thành phần cấu tạo chính của các mạch máu. Một nhóm mục tiêu nữa liên quan đến sự tạo mạch và sự di căn đã được xác định là các protein kinase kim loại và các phân tử bám dính tế bào.

Đồng thời, những hiểu biết về bệnh sinh ung thư đã dẫn đến việc nhận biết rất nhiều mục tiêu phân tử đóng vai trò nòng cốt trong cơ chế di truyền tính trạng. Thành tựu nổi bật nhất có thể thấy là những nghiên cứu về các protein kinase. Các protein kinase đại diện cho nhóm protein lớn nhất do có khoảng 2% các gen trong
nhân mã hóa chúng. Trên cơ sở những hiểu biết về sự sắp xếp thứ tự bộ gen người, các nhà nghiên cứu đã xác định có khoảng 518 protein kinase được mã hoá. Chúng xúc tác cho sự vận chuyển γ-phosphat từ ATP (Adenin triphosphat) hoặc GTP (Guanosin-5'-triphosphat) cho nhóm protein alcol (chứa serin hoặc threonin) và/hoặc nhóm protein phenol (chứa tyrosin) [72]. Các protein kinase được chia làm 2 nhóm lớn dựa trên tính đặc hiệu xúc tác [73]. Nhóm thứ nhất là serin/threonin kinase, gồm phân nhóm protein kinase A, B, C, các MAP kinase (Mitogen-activated protein kinase – protein kinase được hoạt hoá bởi các yếu tố phân bào), các activin và các protein định dạng xương (BMP), các Aurora kinase, PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 - protein kinase-1 phu thuộc protein 3-phosphoinositid), mTOR (Mammalian target of rapamycin – mục tiêu cơ học của rapamycin ở đông vật có vú) và một số kinase khác [74]. Các serin/threonin kinase xúc tác cho phản ứng chuyển nhóm phosphat từ ATP tới phần serin hoặc threonin của protein đích. Nhóm các kinase này đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát các điểm kiểm tra của chu trình tế bào và tham gia vào điều hòa sự chết của tế bào theo chương trình. Nhóm thứ hai là tyrosin kinase, gồm các kinase xúc tác chuyển nhóm phosphat từ ATP đến phần tyrosin của protein đích. Các tyrosin kinase đóng vai trò nòng cốt trong các con đường di truyền tính trạng, điều hòa rất nhiều chức năng khác nhau của tế bào [75], [76]. Một số enzym trong nhóm protein kinase này như HER-2 (Human epidermal growth factor - yếu tố tăng trưởng biểu bì), Flk-1/KDR (VEGFR-2) (Vascular endothelial growth factor receptor - thụ thể của yếu tố phát triển nội mô thành mach), Bcr-Abl (enzym gây ung thư máu dòng tuỷ dung hợp Bcr-Abelson kinase), EGFR (Epidermal growth factor receptor – thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì), Scr kinase và Aurora kinase đang thu hút được sự quan tâm lớn của các nhà nghiên cứu thuốc kháng ung thư.

Chu kỳ tế bào và sự chết của tế bào theo chương trình (*apoptosis*) cũng là mối quan tâm đặc biệt của các bác sĩ chuyên khoa ung thư trong những năm gần đây. Hàng loạt các protein tham gia điều hoà các quá trình này chính là những phân tử đóng vai trò then chốt trong sự hình thành khối u. Một số kinase khác hiện đang được ứng dụng trong nghiên cứu thuốc điều trị ung thư như: các kinase phụ thuộc cyclin (*CDK*), Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2 – u lympho tế bào B)

oncoprotein, sản phẩm của gen ức chế ung thư p53, survivin protein, các tín hiệu dẫn truyền và các yếu tố hoạt hóa sự sao chép (*STAT*).

Cụ thể, tóm tắt một số mục tiêu phân tử dùng trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ung thư hiện nay cùng các thuốc đại diện được nghiên cứu dựa trên các mục tiêu phân tử tương ứng được trình bày trong **bảng 1.3**.

Mục tiêu	Thuốc đại diện
Tyrosin kinase	Gleevec, Lapatinib, Icotinib, Ibrutinib, Idelalisib
Serin/threonin kinase	Flavopiridol, Apitolisib, Dactolisib, Everolimus,
	Temsirolimus
Histon deacetylase	Belinostat, Entinostat
Angiogenesis (các mục tiêu	Endostatin, Marimastat
phân tử liên quan đến sự tạo	
mạch)	
Điều hòa chu trình tế bào:	Bortezomib, Carfilzomib, Ibrutinib, Idelalisib,
CDKs, p53, p21,	17-hydroxystaurosporine
Điều hòa sự chết của tế bào	PAC-1, Venetoclax
theo chương trình: Bcl-2,	
Caspase	
Telomerases	Telomestatin, 2,6-diaminoanthraquinone BSU-
	1051, Fluorenones
Ras và các protein farnesyl	SCH44342, L-778.123 (đang thử lâm sàng)
transferase	
Proteasome	Carfilzomib, Bortezomib

Bảng 1.3. Một số mục tiêu phân tử trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ung thư hiện nay và thuốc đại diện [77], [78], [79]

1.4.2. Aurora kinase và vai trò trong ung thư

1.4.2.1. Aurora kinase

Quá trình phân chia tế bào là một trong những dấu hiệu đặc trưng của cơ thể, và được kiểm soát chặt chẽ bởi rất nhiều loại protein. Trong mạng lưới protein điều hòa đó, Aurora kinase là một thành phần quan trọng, đóng vai trò thiết yếu trong quá trình phân bào. Chúng liên quan đến việc điều hoà hoạt động của một số điểm kiểm soát, sự sắp xếp của các nhiễm sắc thể ở kỳ giữa và sự định hướng các nhiễm sắc thể khi phân ly về hai cực. Hoạt động của Aurora kinase được điều hoà rất chính xác, chủ yếu là bởi quá trình phosphoryl hoá và phân huỷ. Sự mất kiểm soát trong điều hoà hoạt động của Aurora kinase có thể dẫn đến bất thường trong nguyên phân, ảnh hưởng đến sự bền vững di truyền, làm mất chức năng của trung tử trong hình thành thoi vô sắc, sự sắp xếp của nhiễm sắc thể bị rối loạn, và ảnh hưởng đến quá trình phân chia tế bào chất [80]. Sự điều hoà tăng trong cả mức độ biểu hiện và hoạt động của Aurora kinase được tìm thấy trong rất nhiều loại ung thư ở người. Các Aurora kinase được đặc biệt chú ý từ khi chúng được xác định là các gen gây ung thư thực sự.

Aurora kinase là enzym thuộc họ kinase serine/threonin, có tính bảo thủ cao ở các loài sinh vật. Aurora kinase đầu tiên được tìm thấy là ở Drosophila [80]. Bởi những đột biến của enzym này gây sai hỏng trong quá trình phân tách của trung thể, làm ảnh hưởng đến quá trình hình thành hai cực của thoi vô sắc, vì vậy nó được gọi là Aurora (có nghĩa là Bắc Cực). Sau đó, các enzym có cấu trúc đồng đẳng cũng đã được tìm thấy ở những loài khác nhau. *Saccharomyces cerevisae* cũng có một loại Aurora kinase là Ipl1, ở giun tròn [81], Drosophila [82], và Xenopus [83], có hai loại Aurora kinase là A và B. Đặc biệt, hệ gen của động vật có vú chứa các gen mã cho đầy đủ ba loại Aurora kinase là A, B và C. Từ những sự khác biệt này có thể nhận thấy cấu trúc của các loại Aurora có sự rẽ nhánh khi tiến hóa. Hơn nữa, từ cây phát sinh chủng loại cũng cho thấy rằng họ Aurora ở động vật có xương sống có liên quan đến nhau và xuất phát từ cùng một tổ tiên chung. Aurora A bắt nguồn từ sự rẽ nhánh giữa động vật máu lạnh và lớp thú, trong khi đó Aurora B và C có thể được suy đoán là hình thành từ một gen chung Aurora B/C ở động vật máu lạnh [84].

* Cấu trúc Aurora kinase

Enzym Aurora chia làm ba loại là Aurora A, B và C, có kích thước phân tử khác nhau từ 309 – 403, và giữa các loài cũng có sự khác nhau về cấu trúc. Ví dụ, độ tương đồng về cấu trúc enzym Aurora A giữa người và động vật gặm nhấm là 82%, của Aurora B là 84% và Aurora C là 78% [85]. Các cấu trúc chung của Aurora gồm một vùng đầu N dài 39-129, một vùng thực hiện chức năng phosphoryl hóa và vùng đầu C ngắn có kích thước 15-20 acid amin (**Hình 1.8**).

Đầu N của Aurora A-C có trình tự bảo thủ kém, đây là vùng quyết định sự tương tác giữa protein – protein. Vùng KEN motif bảo thủ được tìm thấy ở Aurora A và B, có chiều dài khoảng 11-18 axit amin. Vùng KEN này hoạt động như một tín hiệu nhận biết phụ thuộc Cdh1 (Cdh1- dependant) kích thích hoạt động APC/C. Ở người, cấu trúc đầu C của Aurora B có độ tương đồng với Aurora A và C lần lượt là 73% và 53%, thể hiện tính bảo thủ cao. So sánh cấu trúc tinh thể, người ta cũng nhận thấy Aurora B và C có quan hệ khá gần gũi với nhau [85].

Các loại Aurora kinase có một số biến đổi trong trình tự acid amin của chúng và điều này rất quan trọng cho sự tương tác của chúng với các cơ chất đặc biệt. Ngoài ra, sự biến đổi này cũng quy định sự phân bố khác nhau bên trong tế bào. Vị trí hoạt động gắn ATP trong tất cả các Aurora kinase được cấu tạo bởi 26 tiểu phần giống nhau, và 3 biến thể là Leu215, Thr217, R220 đặc hiệu với Aurora A. Aurora A, B và C có cùng trình tự nhận dạng ở vị trí hoạt động của chúng [86].



Hình 1.8. Cấu trúc của Aurora kinase A, B và C [85] *Vi trí phân bố*

Mặc dù có rất nhiều điểm tương đồng về thành phần và cấu trúc, nhưng Aurora kinase lại phân bố rất khác nhau trong tế bào. Aurora A phân bố quanh trung thể, bắt đầu xuất hiện ở vị trí trung thể nhân đôi từ cuối pha S đến đầu G2. Từ kỳ giữa đến kỳ sau, Aurora A tập trung ở các sợi vô sắc, gần phía hai cực của thoi phân bào (**Hình 1.9**). Sự biểu hiện của Aurora A đạt đỉnh ở G2/M, sau đó giảm khi tế bào thoát khỏi nguyên phân và đi vào G1 trong chu trình tiếp theo.

Sự biểu hiện Aurora B cũng đạt đỉnh ở G2/M, và hoạt động mạnh mẽ nhất khi tế bào chuyển từ kỳ giữa sang kỳ sau. Aurora B luôn duy trì trong nhân và di chuyển đến tâm động từ kỳ đầu đến kỳ giữa. Khi bắt đầu kỳ sau, Aurora B thay đổi vị trí dần dần đến tập trung lại tại thể giữa của tế bào ở kỳ sau, cho đến khi phân chia tế bào chất kết thúc (**Hình 1.9**). Hơn nữa, Aurora B là một thành viên của phức hệ protein hành khách (CPC – Chromosomal passenger complex) cùng với INCENP, Survivin và Borealin. Phức hệ này liên kết chặt chẽ với nhau, tồn tại và đặc trưng bởi sự thay đổi vị trí trong nguyên phân, di chuyển chính xác từ vị trí này sang vị trí khác tại những thời điểm cụ thể.



Hình 1.9. Sự phân bố của Aurora A và B trong nguyên phân [87] Aurora A (màu đỏ); Aurora B (màu xanh lá cây); DNA (màu xanh dương)

a-Kỳ trung gian; b-Kỳ đầu; c-Kỳ giữa; d-Kỳ sau; e-Cytokinesis

Hiện nay vẫn chưa có nhiều công bố về sự phân bố cũng như chức năng của Aurora C. Aurora C phần lớn biểu hiện trong tinh hoàn, khi tế bào giảm phân tạo tinh trùng và hoạt động cùng với INCENP trong tinh bào. Ngoài ra Aurora C còn biểu hiện với nồng độ thấp ở một số mô khác trong cơ thể. Những nghiên cứu ban đầu cho rằng Aurora C bắt đầu biểu hiện và tập trung ở trung thể từ kỳ sau và duy trì ở đó cho đến khi tế bào chất phân chia [105]. Tuy nhiên, gần đây người ta phát hiện thấy sự phân bố của Aurora C trong phân bào giống với Aurora B, như là một thành viên của CPC [89]. Sự biểu hiện này liên quan chặt chẽ đến hoạt động chức năng của Aurora C, cho thấy vai trò quan trọng của nó trong chu trình tế bào.

* Chức năng của Aurora kinase

Do sự phân bố của các loại Aurora kinase trong tế bào khác nhau nên chức năng của chúng cũng thể hiện rất khác nhau trong nguyên phân.

* Aurora A

- Điều hoà quá trình sắp xếp của thoi phân bào: ở G2, Aurora ban đầu phân bố ở xung quanh vùng hình thành trung thể, giúp hình thành và phát triển của trung thể. Cuối G2, Aurora A ở trạng thái hoạt động sẽ lôi kéo các protein nguyên liệu cho quá trình phát triển của trung thể như γ -tubulin, phức hệ TACC/MAP215, centrosomin, đồng thời đảm bảo sự sắp xếp thoi phân bào diễn ra chính xác [80].

- Điều hoà quá trình phân tách trung thể ở pha chuyển G2-M [90].

- Liên quan đến điểm kiểm soát G2/M: Aurora A phosphoryl hóa CDC25B, một enzym phosphatase đóng vai trò hoạt hóa phức hệ Cdk1-cyclin B1, thúc đẩy tế bào đi vào nguyên phân. Sự ức chế Aurora A bởi các ARNi sẽ làm tế bào bị bắt giữ ở G2-M và gây apoptosis [91].

* Aurora B

Aurora B cùng với các thành viên của CPC tham gia kiểm soát nhiều hoạt động trong phân chia nhân và phân chia tế bào chất. Phức hệ này giúp sửa chữa sai sót trong việc liên kết giữa kinetochore và sợi vô sắc, đảm bảo sự phân tách hai nhiễm sắc tử một cách chính xác, thúc đẩy sự co ngắn của sợi vô sắc ở kỳ sau và tham gia vào cytokinesis.

- Aurora B điều hoà quá trình đóng xoắn nhiễm sắc thể

Chức năng này được thể hiện khi Aurora B phosphoryl hoá Histone H3 ở vị trí Serine 10, Serine 28 (H3PS10 và H3PS28), và trong nhiều loại CENP-A ở vị trí Ser7. H3PS10 hiện nay được sử dụng rộng rãi trong các phản ứng để kiểm tra hoạt tính Aurora B trong ống nghiệm (kinase assay), và là một trong những

công cụ quan trọng trong nghiên cứu tìm ra các chất ức chế hoạt động của Aurora kinase. Ngoài ra, H3PS10 ở tế bào động vật có liên quan đến sự di chuyển của họ protein HP-1 đến vị trí chất nhiễm sắc trong quá trình hình thành và sắp xếp vùng dị nhiễm sắc [92].

- Aurora B điều hòa sự phân tách nhiễm sắc thể

Sau khi màng nhân biến mất ở kỳ đầu, sợi vô sắc phát triển từ hai cực sẽ liên kết với kinetochore của hai nhiễm sắc tử chị em, hình thành thoi phân bào. Sai sót trong quá trình này như hiện tượng merotelic (một số sợi vô sắc ở một trong hai nhiễm sắc tử xuất phát từ cùng một cực với nhiễm sắc tử kia) hay syntelic (cả hai nhiễm sắc tử chị em của một cặp nhiễm sắc thể cùng đính với sợi vô sắc từ một cực) xảy ra khá thường xuyên. Tế bào cần được sửa chữa mới có thể tiếp tục đi đến kỳ sau. Ở đây, Aurora B thực hiện hai chức năng chính là sửa chữa, giữ vững và kiểm soát thoi vô sắc.



Hình 1.10. Aurora kinase B điều hòa sự phân tách nhiễm sắc thể (A) và kiểm soát thoi vô sắc (B) [80]

+ Sửa chữa và giữ vững: Aurora B được hoạt hóa mạnh khi có sự liên kết bất thường của các nhiễm sắc tử với sợi thoi vô sắc. Khi Aurora B hoạt hóa, nó sẽ phosphoryl hóa một số protein thành phần của kinetochore tham gia vào quá

trình sửa chữa sự đính sai của các nhiễm sắc thể. Mặt khác, trong điều kiện bình thường, khi các nhiễm sắc thể đều liên kết chính xác với các vi ống của thoi vô sắc, Aurora B góp phần làm bền các mối liên kết thông qua sự phosphoryl hóa MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) để ức chế sự depolymer hóa của các sợi vô sắc (**Hình 1.10.A**) [80].

+ Kiểm soát thoi vô sắc: các protein có chức năng kiểm tra sẽ di chuyển đến vị trí các kinetochore nếu nó không được gắn với dây vô sắc, từ đó ức chế hoạt động của APC/C, ngăn cản tế bào đi vào kỳ sau. Ở đây, chính Aurora B đảm nhiệm chức năng thu hút các protein kiểm tra đi đến kinetochore (**Hình 1.10.B**) [80].

- Điều hòa quá trình phân chia tế bào chất

Aurora B đóng vai trò thiết yếu trong quá trình phân chia tế bào chất. Ở giun tròn, ức chế Aurora B sẽ gây ra hiện tượng đa bội do tế bào chất không được phân chia trong giai đoạn phôi. Aurora B kết hợp với Rho, một nhân tố điều hòa điển hình trong phân chia tế bào chất, điều khiển quá trình cytokinesis. Đồng thời, Aurora B cũng kích hoạt Rho bằng cách biến đổi MgcRacGAP để tạo thành RhoGAP, đóng vai trò quan trọng trong quá trình hoàn thành phân chia.

* Aurora C

Aurora C có liên quan đến quá trình sinh tinh và sinh trứng ở động vật có vú. Một số công bố cho rằng nó còn có thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng của tế bào ở tất cả các mô khi biểu hiện ở nồng độ thấp [93]. Đặc biệt, Aurora C được tìm thấy là có khả năng đồng kết tủa miễn dịch với Aurora B. Điều này chứng tỏ Aurora C có thể tương tác với INCENP và Survivin để hoạt động chức năng, đồng thời cũng có khả năng phosphoryl hóa histon H3 giống Aurora B. Một nghiên cứu gần đây cho thấy Aurora C có thể đảm nhận nhiệm vụ hoạt động của Aurora B trong nguyên phân khi vắng mặt kinase này [94].

1.4.2.2. Vai trò của Aurora kinase trong sự hình thành ung thư

Aurora kinase thể hiện vai trò vô cùng quan trọng trong nguyên phân. Vì vậy sự biểu hiện bất thường của chúng có thể dẫn tới sự chuyển dạng tế bào, gây ung thư. Ở một số mô, cơ quan trong cơ thể, sự biểu hiện quá mức của Aurora kinase dẫn đến sự bất ổn di truyền, gây đa bội làm số lượng ADN tăng lên do nhiễm sắc thể được nhân đôi và phân tách nhưng quá trình cytokinesis không xảy ra được. Nhiều nghiên cứu cho thấy gen Aurora A còn được biết đến như một gen gây ung thư [86].

* Aurora A

Gen Aurora A nằm ở vị trí 20q13.2, ban đầu được đặt tên là BTAK (Breast Tumor Activated Kinase) do sự biểu hiện quá mức mARN của chúng đóng vai trò thiết yếu trong hình thành khối u ung thư vú ở người. Một số nghiên cứu cho thấy sự biểu hiện quá mức này có thể làm chuyển dạng NIH-3T3 và rat1, gây khối u trên chuột nude. Từ đó, Aurora trở thành một hướng nghiên cứu mới đầy tiềm năng. Zhou cùng đồng nghiệp đã chứng minh sự khuếch đại gen Aurora A trong nhiều loại ung thư khác nhau (**Bảng 1.4**).

Cơ chế hoạt động của Aurora A liên quan đến ung thư hiện nay cũng được tập trung nghiên cứu. Meraldi và cộng sự đã chứng minh rằng sự khuếch đại gen Aurora A làm cản trở sự hoạt động của điểm kiểm soát thoi phân bào, do đó tế bào không hoàn thành cytokinesis và hình thành dạng tứ bội. Ngoài ra, Aurora A còn cần thiết cho sự chuyển dạng tế bào. Trong tế bào phôi ếch, Aurora A thể hiện chức năng tăng cường sự dịch mã của Mos, là một gen gây ung thư, hoặc hoạt động cùng với tín hiệu Ras để kích hoạt con đường MAPK (Mitogen-activated protein kinase).

Sự biểu hiện bất thường của Aurora còn có liên quan chặt chẽ với hoạt động của p53 trong quá trình hình thành khối u. Aurora A phosphoryl hóa p53, điều khiển sự bền vững của protein này. Ngược lại, p53 tác động đến GAdd45a, mà phân tử này lại tương tác và ức chế Aurora A. Ngoài ra, một số nghiên cứu còn cho thấy p53 có thể trực tiếp ức chế Aurora A bằng cách bám vào vùng xúc tác. Vậy sự ảnh hưởng của Aurora A khi biểu hiện quá mức đến việc hình thành thể tứ bội, hay sự khuếch đại nhiễm sắc thể là phụ thuộc vào trạng thái của p53 trong tế bào [95].

* Aurora B

Gen Aurora B nằm ở vị trí 17p13.1 trên nhiễm sắc thể. Nhiều báo cáo cho thấy sự biểu hiện bất thường của Aurora B cũng góp phần hình thành khối u [86]. Điều này là dễ hiểu do chức năng vô cùng quan trọng của nó trong nguyên phân. Vì vậy gen Aurora B cũng được coi là một gen gây ung thư. Nghiên cứu trên dòng tế bào buồng trứng chuột chuyển dạng CHO (Chinese hamster ovary) cho thấy rằng biểu hiện quá mức Aurora B gây tế bào dị bội và tăng khả năng xâm lấn và phát triển của khối u thực nghiệm [96]. Katayama và các đồng nghiệp là những

người đầu tiên chứng minh được sự biểu hiện quá mức Aurora B trong ung thư ruột kết. Phát hiện này đã thu hút sự tập trung nghiên cứu của các nhà khoa học.

Hiện nay, sự biểu hiện Aurora B bất thường cũng được tìm thấy ở nhiều loại ung thư như ung thư vòm họng, ung thư phổi không tế bào nhỏ (**Bảng 1.4**).

* Aurora C

Gen Aurora C nằm ở vị trí 19q13.43, một vùng thường xảy ra đột biến đảo hoặc mất đoạn trong một số loại ung thư nhất định [93]. Aurora C cũng được coi là một gen gây khối u do sự biểu hiện quá mức của Aurora C được tìm thấy ở một số loại ung thư như ung thư gan, ung thư vú và ung thư cổ tử cung. Một nghiên cứu gần đây của Jabbar Khan và cộng sự trên dòng tế bào NIH-3T3 đã chứng minh rằng sự biểu hiện quá mức Aurora C gây ra sự khuếch đại trung thể, đa nhân và chuyển dạng tế bào. Ngoài ra sự biểu bất thường của Aurora C còn thúc đẩy quá trình hình thành khối u khi thí nghiệm trên chuột nude [97].

Aurora kinase	Loại ung thư	Dòng tế bào
Aurora A	Ung thư vú	BT474; MDA-MB-231
	Ung thư buồng trứng	2774; SK-OV3
	Ung thư ruột kết	HCT116; HT29; SW480
	Ung thư tuyến tụy	DU145; PC3
	Bạch cầu ác tính	HL60; K562
	Ung thư thần kinh	HTB10
	Ung thư cổ tử cung	SW756
Aurora B	Ung thư phổi không tế bào nhỏ	
	Ung thư biểu mô tuyến giáp	ARO; Cal 62; KAT-4
	Ung thư vòm họng	OSCC
Aurora C	Ung thư gan	HepG2; HUH7
	Ung thư vú	MDA-MB-453
	Ung thư cổ tử cung	HeLa

Bảng 1.4. Sự biểu hiện quá mức hay khuếch đại gen Aurora kinase ở nhiều loại ung thư khác nhau [98], [99], [100]

1.4.2.3. VX-680 - chất ức chế Aurora kinase

Trong số hơn 500 loại enzym kinase đã được xác định trong tế bào, Aurora kinase được coi như một đích đến vô cùng quan trọng trong điều trị ung thư bởi chức năng quan trọng của nó trong phân bào. Cơ chế tác động của các chất ức chế Aurora chủ yếu theo hai hướng là ngăn cản tương tác protein-protein giữa Aurora và cơ chất hoặc ức chế hoạt tính của enzym thông qua cạnh tranh vị trí liên kết xúc tác ATP. Theo đó, các nhà khoa học đã công bố ba chất ức chế Aurora kinase điển hình đầu tiên, đó là ZM447439 [101], Hesperadin [102] và VX-680 [103]. Ba chất này đều gây ra kiểu hình tế bào giống nhau khi xử lý tế bào trên *in vitro*. Đặc biệt, chúng đều ức chế sự phosphoryl hóa H3 ở serin 10, từ đó ức chế phân bào, xảy ra hiện tượng mitotic slippage. Ngoài ra gần đây, nhiều nghiên cứu đã tìm ra một số chất ức chế Aurora kinase như MLN8054, PHA-739358, MLN8237 và AZD1152, hiện đang trong pha I và II của nghiên cứu [104]. Đặc điểm của ZM447439, Hesperadin, VX-680 được trình bày trong **bảng 1.5**.

Trong đó, VX-680, cũng được biết đến là MK-0457, là phân tử thuộc nhóm 4,6 di-amino pyrimidine có công thức phân tử là C₂₃H₂₈N₈OS, khối lượng phân tử là 464,59 g/mol. VX-680 được phát triển dưới sự kết hợp giữa hai hãng dược phẩm Vertex và Merk. Cơ chế tác động của VX-680 là có ái lực cạnh tranh với vị trí liên kết ATP nằm trên cả ba loại Aurora kinase mà không có cấu trúc tương tự trên các loại enzym kinase khác [104]. Theo đó, trong nhiều công bố cho thấy VX-680 có khả năng ức chế cả ba loại Aurora A, B và C. Trong nguyên phân, kiểu hình tế bào xuất hiện sau khi điều trị với VX-680 cho thấy nó chủ yếu ức chế Aurora B làm ngăn cản sự phosphoryl hóa H3, gây đa bội hóa và đưa tế bào đến apoptosis. Sự tác động lên Aurora A thể hiện ở việc thoi vô sắc có sự bất thường về số cực [104]. Cơ chế ảnh hưởng lên Aurora C vẫn chưa được xác định rõ.

VX-680 đang được nghiên cứu phát triển và thử nghiệm trên người. Pha I được tiến hành vào năm 2004, và đến năm 2007, pha II được thực hiện, cho kết quả rất khả quan. Do đó VX-680 có thể được sử dụng như một chứng dương để đánh giá tác dụng kháng ung thư của các hợp chất trong nghiên cứu phát triển thuốc mới.

Tóm lại, nghiên cứu phát triển thuốc mới dựa trên mục tiêu phân tử là một trong những phương pháp có triển vọng với mong muốn tìm được những thuốc

hiệu quả hơn, chọn lọc hơn và ít tác dụng phụ hơn. Một số mục tiêu phân tử đáng quan tâm có thể kể đến như các protein kinase (trong đó có các Aurora kinase), các yếu tố tăng trưởng, các chất điều hoà sự chết theo chương trình của tế bào, các mục tiêu phân tử liên quan đến sự tạo mạch, ... Một hợp chất kháng ung thư có thể tác động lên một hoặc nhiều mục tiêu phân tử trong chuỗi sinh học tế bào. Việc nghiên cứu chứng minh tác dụng gây độc tế bào ung thư của các hợp chất kháng ung thư nói chung và các hợp chất phân lập từ tự nhiên nói riêng thông qua ức chế, khoá hoặc làm mất vai trò của mục tiêu phân tử là việc làm cần thiết góp phần làm rõ cơ chế cũng như nâng cao giá trị của các hợp chất này.

Chất	Công thức cấu tạo	Cơ chế/Tiềm năng
Hesperadin (Boehringer Ingelheim)		 Úc chế Aurora B với IC₅₀ là 250 nM. Úc chế H3PS10 ở 20-100 nM.
	Nhóm idolinon	
ZM447439 (AstraZeneca)	H ₃ C ⁻⁰ ++N H ₃ C ⁻⁰ ++N Dẫn xuất quinazolin	 Chất cạnh tranh ATP. Úc chế Aurora A và B với IC₅₀ khoảng 100 nM.
VX-680 (Vertex)	HN HN H H H H H H H H H H H H H H H H H	 Úc chế Aurora A, B và C <i>in vitro</i> với Ki lần lượt là 0,6; 18 và 4,6 nM (*)

Bảng 1.5. Một số chất ức chế Aurora kinase [87]

(*) Ki: hằng số ức chế (inhibition constants)

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỔI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. 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 dòm thu hái tại xã Tản Lĩnh – Ba Vì (Hà Nội) tháng 10/2019 được cung cấp bởi công ty Cổ phần Dược liệu Indochina. Mẫu nghiên cứu được ThS. Nghiêm Đức Trọng (Bộ môn Thực vật – Trường Đại học Dược Hà Nội) 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. Mẫu nghiên cứu sau khi thu hái được phơi khô (tỷ lệ dược liệu khô/ tươi = 1/8,5; hàm ẩm 5,6%) và bảo quản trong túi nilon trước khi tiến hành nghiên cứu.

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. Thực hiện trồng trọt và chăm sóc theo khuyến cáo của vườn giống gốc. 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. Các mẫu được ký hiệu D1 – D9 theo thứ tự thu hái. Ngoài ra mẫu đánh giá hàm lượng còn được thu hái tại Quản 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).

2.1.2. Một số dòng tế bào ung thư thí nghiệm

2.1.2.1. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào

Các dòng tế bào ung thư HeLa (tế bào ung thư cổ tử cung ở người); HepG2 (tế bào ung thư gan ở người; OVCAR-8 (tế bào ung thư biểu mô tuyến buồng trứng); MCF7 (tế bào ung thư biểu mô tuyến vú đa kháng thuốc); N87 (tế bào ung thư biểu mô dạ dày). Các dòng tế bào ung thư được cung cấp bởi trung tâm lưu giữ giống nuôi cấy Hoa Kỳ (ATCC), được lưu trữ trong nito lỏng, tại nhóm Nghiên cứu Ung thư học Thực nghiệm, Bộ môn Sinh học Tế bào, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.1.2.2. Nghiên cứu cơ chế tác dụng kháng ung thư

Tế bào OVCAR-8 và HeLa (Aurora B-GFP) được nhân nuôi trong môi trường DMEM (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Tế bào nguyên bào sợi da của người (hFBs) được nuôi trong môi trường DMEM/F12 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Môi trường được bổ sung 10% huyết thanh bê (FBS) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.), 100 đơn vị/ml penicillin và 100 μg/ml streptomycin (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người (hUVECs) được nuôi cấy trong môi trường EBM-2 (Lonza Group, Ltd.).

Tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn (UC-MSCs) được nuôi cấy trên bề mặt của các bình nuôi cấy được tráng bởi CELLstart ™ CTS ™ (CELLstart) trong máy khuếch tán môi trường StemMACS ™ MSC (StemMACS) (Miltenyi Biotec).

Tất cả các tế bào được nuôi cấy trong tủ ấm ở 37°C với 5% CO₂.

Các tế bào hUVECs, hFBs và UC-MSCs do Viện nghiên cứu tế bào gốc và công nghệ gen Vinmec cung cấp, và chúng không phải là các dòng tế bào bất tử. Các quy trình phân lập tế bào đã được Hội đồng Đạo đức của Bệnh viện Quốc tế Vinmec phê duyệt (Quyết định số 40/2020/QĐ-Vinmec ngày 24/12/2020 đối với hUVECs và UC-MSCs; Quyết định số 311/2018/QĐ-Vinmec ngày 11/9/2018 đối với hFBs). Tế bào HeLa (Aurora B-GFP) được cung cấp bởi Giáo sư Stefan Dimitrov – Viện Albert Bonniot (nay là Viện Khoa học sinh học nâng cao) [105], [106].

2.1.3. Hóa chất, dung môi

Các hóa chất, dung môi và thuốc thử đạt tiêu chuẩn phân tích theo quy định của Dược điển Việt Nam V (*n*-butanol, cloroform, ethanol, ethylacetat, *n*-hexan, methanol, kali dihydrophosphat, triethylamin, acid formic...), methanol (HPLC, Merck KGaA, Đức), nước cất hai lần, dung môi đo phổ (DMSO-*d*₆; CDCl₃, MeOD), chất chuẩn nội tetramethylsilan (TMS).

Chất so sánh dùng trong xây dựng, thẩm định phương pháp định lượng và đánh giá sự thay đổi hàm lượng hoạt chất theo thời gian thu hái là oxostephanin được luận án phân lập từ thân lá cây củ dòm, độ tinh khiết 98,5% (theo diện tích pic trên sắc ký đồ HPLC).

Các hoá chất sử dụng trong nghiên cứu tác dụng độc tế bào: DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Prolabo, Mỹ); FBS (Fetal Bovine Serum) (Invitrogen, Mỹ); Môi trường nuôi cấy RPMI 1640, Môi trường nuôi cấy DMEM low glucose, PBS (Phosphate Buffered Saline), Penicilin/Streptomycin, Trypan Blue, Trypsin – EDTA (Gibco, Mỹ); Nitơ lỏng (Việt Nam); acid acetic (Thermo Fisher Scientific, Mỹ)

2.1.4. Máy móc, thiết bị và dụng cụ nghiên cứu

2.1.4.1. Nghiên cứu hóa học

- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): AVANCE III HD 500 (MA, Hoa Kỳ) của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

 Máy đo phổ khối lượng ion hóa phun mù điện tử phân giải cao (HR-ESI-MS): Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system (Emeryville, CA, Hoa Kỳ) của Viện Hóa Sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Máy đo phổ khối lượng ion hóa phun mù điện tử ESI-MS: Agilent 1260 series LC-MS single quadrupole của Viện Hóa Sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Sắc ký cột (CC) sử dụng silica gel 65-250 hoặc 230-400 mesh (Sorbent Technologies, Atlanta, USA), gel polyme xốp (Diaion HP-20, 20-60 mesh, Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan), Sephadex LH-20 (Supelco, PA, USA), octadecyl silica (ODS, 50 μm, Cosmosil 140 C18-OPN, Nacalai Tesque) và RP-18 (30-50 μm, YMC*GEL, Fuji Silysia Chemical).

- Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên silica gel 60 F254 (1.05554.0001, Merck, Darmstadt, Đức) và các tấm RP-18 F254S (1.15685.0001, Merck, Darmstadt, Đức), quan sát dưới ánh sáng UV 254 nm và 365 nm.

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (Shimadzu, model: L20155518195)
gồm bơm LC-20AD, detector DAD-20A UV/Vis, hệ thống tiêm mẫu tự động SIL
20A; cột pha đảo Supelco C18 (5µm, 250 x 4,6mm)

- Bộ lọc dung môi (màng lọc 0,45 μm)
- Máy lọc hút chân không (Gast Manufacturing, INC, Mỹ)
- Cân phân tích 5 số METTLER TOLEDO (Model MS204)
- Cân phân tích 4 số Precisa XT 220A
- Máy đo pH (Eutech, Singapore)

- Tủ sấy (Memmert ULM 500, Đức)
- Máy siêu âm (Sonirex Bandelin, Đức)
- Máy cất nước hai lần (Hamilton, Anh)

- Dụng cụ, vật tư tiêu hao: cột sắc ký thuỷ tinh, cốc có mỏ, bình nón, bình định mức các dung tích và các dụng cụ, vật tư thường dùng tại các phòng thí nghiệm.

2.1.4.2. Nghiên cứu tác dụng sinh học

- CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)

- Bể ổn nhiệt (Thermo Fisher Scientific, Mỹ)
- Buồng đếm tế bào (Neubauer, Đức)
- Kính hiển vi soi ngược Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Đức)
- Máy ly tâm Universal 320 (Hettich, Đức)
- Pipetman (Gilson, Pháp)
- Tủ lạnh -20⁰C (Panasonic, Nhật Bản)
- Tủ an toàn sinh học (Esco, Mỹ)
- Elisa SpectraMAX Plus 384 (Molecular Device, Mỹ)
- Cân điện tử độ chính xác 0,0001 gam (Nhật Bản)
- Máy Screen master Hospitex Diagnostics (Italy)
- Máy Vet abcTM Animal Blood Counter
- Hệ thống máy xCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, Mỹ)
- Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad, Nhật Bản); Tủ ấm 5% CO₂ (Shell Lab, Mỹ)

- Dụng cụ, vật tư tiêu hao: Đĩa nuôi cấy 96 giếng; Đĩa nuôi cấy tế bào 35, 100 mm; Chai nuôi cấy tế bào T75; Ông Cryo (ống cất tế bào 1,8ml); Ông ly tâm (2ml, 15ml, 50 ml); Ông Eppendorf 1,5mL (Corning, Mỹ); Lame, lamelle (Sail Brand, Trung Quốc); Đầu tip, Pipette điện (Eppendof, Đức); E-plate (ACEA Biosciences, Mỹ); Kim đầu tù cho chuột uống thuốc; Cốc chia vạch, bom kim tiêm 1ml; Pipette (1ml, 25ml) (Việt Nam)

2.2. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Các nghiên cứu về hoá học được thực hiện tại khoa Bào chế - Chế biến, khoa Hoá phân tích và tiêu chuẩn – Viện Dược liệu; Viện Hoá sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; bộ môn Thực vật – Dược liệu – Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam.

Các nghiên cứu về sinh học được thực hiện tại Bộ môn Sinh học tế bào – Khoa Sinh học – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội; Viện Nghiên cứu tế bào gốc và Công nghệ gen Vinmec.

2.3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Để đáp ứng được các mục tiêu đã đề ra, luận án tiến hành thực hiện 3 nội dung sau:

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

- Chiết xuất và phân lập một số hợp chất từ thân lá cây củ dòm
- Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất đã phân lập được

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

- Phân lập và sơ bộ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin từ thân lá cây củ dòm
- Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng oxostephanin trong thân lá cây củ dòm
- Đánh giá sự thay đổi hàm lượng oxostephanin theo thời gian thu hái

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

- 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.
 Sơ đồ thiết kế nghiên cứu được trình bày trong hình 2.1.

2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.4.1. Phương pháp chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của một số hợp chất từ thân lá cây củ dòm

2.4.1.1. Phương pháp chiết xuất và phân lập Chiết xuất



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

Dược liệu được ngâm ở nhiệt độ phòng với MeOH (3 ngày/lần \times 3 lần), tỉ lệ dược liệu/ dung môi = 1/7). Lọc và gộp các dịch chiết sau đó cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cắn MeOH.

Cắn MeOH trên đem hòa với HCl 10%, sau khi lắc cho tan hết thì chiết với ethyl acetat, lắc kỹ, tách phần ethyl acetat, chiết lặp lại thêm 3 lần rồi đem cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cắn ethyl acetat không chứa alcaloid (SDE-I). Phần dịch còn lại sau khi chiết bằng ethyl acetat thì đem trung hòa bằng NaOH đến dung dịch có pH 10. Sau đó thêm ethyl acetat, lắc đều trong vòng 30 – 60 phút, để yên phân lớp thì tách phần ethyl acetat. Tiến hành lặp lại 3 lần. Gộp dịch chiết ethyl acetat và cô cạn dưới áp suất giảm thu được cắn ethyl acetat chứa alcaloid (SDE-II). Tiến hành phân đoạn cặn SDE-II trên sắc ký cột mở bởi silica gel (0.040 – 0.063 mm), với hệ dung môi gradient rửa giải dichloromethan/methanol (100% dichloromethan \rightarrow 100% methanol) thì thu được các phân đoạn SDE1 – SDE5.

* Phân lập và tinh chế

Phân lập các hợp chất bằng sắc ký cột với các chất nhồi cột khác nhau (silica gel, RP-C₁₈, Sephadex LH-20, Diaion HP-20) và các hệ dung môi rửa giải khác nhau, hoặc phương pháp kết tinh trong dung môi thích hợp; theo dõi phân đoạn bằng TLC kết hợp soi UV ở hai bước sóng 254 và 365 nm hoặc dùng thuốc thử (Dragendorff, dung dịch H₂SO₄ 10% trong EtOH 96%); kiểm tra độ tinh khiết bằng TLC hoặc NMR.

2.4.1.2. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được

Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được xác định dựa trên các dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt (nhân một chiều: 1H-NMR, 13C-NMR và hai chiều: HMBC, HSQC, COSY, ROESY), phổ khối lượng (MS) kết hợp phân tích, so sánh, đối chiếu với các dữ liệu về cấu trúc đã công bố của các hợp chất (trường hợp chất phân lập được đã biết) hoặc các chất tương tự (trường hợp chất phân lập được là chất mới).

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

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

Nguyên liệu là thân lá cây củ dòm khô được nghiền nhỏ và ngâm với MeOH ở nhiệt độ phòng, sau 3 ngày tách dịch chiết ra, cô cạn trên máy cất chân không thu được cắn MeOH. Tiến hành lặp lại thêm hai lần chiết với dùng dung môi trên thì thu được cắn MeOH, ký hiệu là M.

Phân bố cắn M trên với nước cất, thêm HCl 10% đến môi trường acid với pH 4-5. Chiết phân bố dịch acid này 3 lần với dung môi ethyl acetat (tỷ lệ 1:1, v/v), tách và loại bỏ phần dịch chiết ethyl acetat. Thu gom phần dịch chiết nước rồi cất loại dung môi ethyl acetat còn tồn dư, thu được dịch nước trong môi trường acid, ký hiệu là Wa.

Dịch chiết nước Wa tiếp tục được trung hòa về môi trường kiềm tương đương pH 9-10 sử dụng NH4OH. Tiến hành chiết phân bố dịch nước trong môi trường kiềm hóa (ký hiệu là Wk) bằng dung môi petroleum ether, chloroform, ethyl acetat tách và cất loại bỏ phần dịch chiết petroleum ether và chloroform, thu được cặn chiết ethyl acetat chứa nhóm chất alcaloid đã được làm giàu và ký hiệu là Ek.

Tiến hành chiết phân bố cắn Ek lặp lại từ 3-5 lần bằng hỗn hợp dung môi MeOH và *n*-hexan thu được một phân đoạn làm giàu, sau khi tiến hành thu gom các phân đoạn chiết phân bố trên thu được cắn ký hiệu là EkO. Cuối cùng, kết tinh lại nhiều lần sản phẩm từ cắn EkO trong hỗn hợp MeOH và EtOH thu được sản phẩm tinh khiết. Sản phẩm này được cô quay chân không trong 2-3h, đóng lọ bảo quản.

Sản phẩm tinh khiết này được xác định là oxostephanin bằng phổ NMR, so sánh đối chiếu với tài liệu tham khảo. Sơ bộ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin dựa vào phần trăm diện tích pic trên sắc ký đồ khi sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao với một số pha động khác nhau. Hợp chất này được sử dụng làm chất so sánh cho nghiên cứu về thành phần hoá học tiếp theo.

2.4.2.2. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng oxostephanin trong thân lá cây củ dòm

Định lượng oxostephanin trong thân lá cây củ dòm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

* Xây dựng phương pháp định lượng

* Khảo sát điều kiện sắc ký

Tiến hành sắc ký với cột Supelco C18 (5 μm, 250 x 4,6 mm), tốc độ dòng 1 ml/phút và thể tích tiêm mẫu 10 μl, nhiệt độ cột là nhiệt độ phòng để khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại và hệ dung môi pha động.

- Khảo sát bước sóng phát hiện: Tiến hành sắc ký với chất so sánh oxostephanin bằng phương HPLC - DAD để tìm ra bước sóng hấp thụ cực đại của chất.

- Khảo sát thành phần và tỷ lệ pha động với các hệ dung môi ACN : nước và methanol : nước.

Các kết quả thu được với từng khảo sát được đánh giá, so sánh về thời gian lưu (t_R), độ phân giải (R_S), và hệ số đối xứng (A_S).

Yêu cầu

- Thời gian lưu (t_R) của chất cần phân tích nằm khoảng từ 10 - 20 phút.

- Pic chất phải tách rõ với pic chất xung quanh đánh giá thông qua hệ số phân giải ($R_s > 1,5$)

- Pic phải đối xứng đánh giá thông qua hệ số đối xứng ($A_s = 0.8 - 1.5$).

* Khảo sát phương pháp xử lý mẫu

- Chuẩn bị mẫu chuẩn:

Dung dịch gốc: Cân chính xác khoảng 1mg chất so sánh oxostephanin pha trong methanol trong bình định mức 1ml.

Dãy nồng độ chuẩn: Tiến hành pha dãy chuẩn trong bình định mức 1 ml với các nồng độ 100 đến 3,125 μ g/ml bằng cách pha loãng gấp đôi từ dung dịch mẹ.

Các dung dịch này được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C.

- Mẫu thử:

Sử dụng phương pháp siêu âm với dung môi chiết là methanol, tiến hành khảo sát các yếu tố của phương pháp xử lý mẫu bao gồm tỷ lệ dung môi/ dược liệu (với các tỷ lệ 100 : 1; 200 : 1 và 400 : 1), số lần chiết (chiết 1 lần, 2 lần, 3 lần; 4 lần) và thời gian chiết (mỗi lần 20 phút, 40 phút, 60 phút và 80 phút).

Cân chính xác khoảng 0,25 g được liệu cho vào bình nón, thêm MeOH, siêu âm trong 1 giờ. Lọc lấy dịch trong. Phần bã được thêm MeOH (thể tích khảo sát) và tiến hành như trên 1 hoặc 2 - 3 lần nữa (theo khảo sát). Gộp dịch lọc các lần vào bình định mức 100 ml, thêm MeOH đến vạch. Lọc qua màng lọc kích thước 0,45 µm và tiến hành tiêm sắc ký.

- Mẫu thử thêm chuẩn

Dung dịch thử được chuẩn bị như trên, thêm chính xác một lượng dung dịch chuẩn oxostephanin vào dung dịch thử đã chuẩn bị trước để được các dung dịch có nồng độ 80 %, 100 %, 120 % so với mẫu thử. Lọc qua màng lọc kích thước 0,45 µm và tiến hành tiêm sắc ký.

* Thẩm định phương pháp định lượng

Tiến hành thẩm định phương pháp định lượng theo "Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích" [107] và AOAC [108].

* Độ phù hợp hệ thống

Phân tích sắc ký lặp lại 6 lần mẫu chuẩn oxostephanin, có nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính, ghi lại sắc ký đồ.

Đánh giá tính thích hợp của hệ thống về thời gian lưu, diện tích pic, số đĩa lý thuyết, độ phân giải (R_s), hệ số đối xứng pic của oxostephanin.

Yêu cầu: RSD của thời gian lưu, diện tích pic $\leq 2,0\%$ nếu không có quy định khác.

* Độ đặc hiệu

Phân tích trong cùng điều kiện và so sánh đáp ứng của các mẫu sau: mẫu dung môi, mẫu chuẩn oxostephanin, mẫu thử thêm chuẩn oxostephanin, mẫu thử. *Yêu cầu*: Mẫu dung môi không xuất hiện pic của chất phân tích tại thời gian lưu của chất phân tích trong mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn. Mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn có thời gian lưu của chất phân tích giống nhau. Pic của mẫu thử và thử thêm chuẩn phải tách hoàn toàn với pic khác trong nền mẫu. Độ phân giải giữa các pic chính không nhỏ hơn 1,5.

* Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Tiến hành pha dãy chuẩn trong bình định mức 1 ml với các nồng độ 100 đến 3,125 μg/ml bằng cách pha loãng gấp đôi từ dung dịch mẹ. Tiến hành sắc ký trong cùng điều kiện, xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính và tính hệ số tương quan R.

Yêu cầu: Đường hồi quy có dạng đường thẳng và hệ số tương quan nằm trong khoảng $0,995 \le R \le 1$ (hoặc bình phương hệ số tương quan $0,99 \le R^2 \le 1$) và độ chệch (bias) tại các điểm đều không quá $\pm 15\%$.

* Độ chính xác (độ lặp lại, độ chụm trung gian):

 Độ lặp lại: Tiến hành phân tích độc lập 6 thử (kết hợp ở phần độ chính xác), tính kết quả dựa vào điểm chuẩn tiến hành trong cùng điều kiện. Xác định độ lặp lại bằng cách tính RSD giá trị các lần định lượng.

Độ chính xác trung gian: Tiến hành tương tự độ lặp lại ở 3 ngày khác nhau.
Dựa theo điểm chuẩn, tính nồng độ hoạt chất có trong các mẫu thử. Xác định độ
lặp lại trong ngày, khác ngày bằng cách tính toán độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) giữa giá trị các lần định lượng.

Yêu cầu: RSD hàm lượng của oxostephanin \leq 3,7%.

* Độ đúng

Thêm chính xác khoảng lượng dung dịch chuẩn oxostephanin vào mẫu thử sao cho tổng nồng độ sau khi thêm chuẩn tương ứng khoảng 80 %, 100 %, 120 % nồng độ định lượng oxostephanin trong mẫu thử.

Tại mỗi nồng độ làm 3 mẫu độc lập, tiến hành tương tự như mẫu thử, phân tích mẫu và ghi lại sắc ký đồ và tính độ thu hồi của OXO.

Yêu cầu: Phần trăm tìm lại của oxostephanin ở mỗi nồng độ phải trong khoảng 95,0 % - 105,0 %.

* Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Pha loãng dần mẫu chuẩn bằng dung môi pha mẫu, tiến hành phân tích các dung dịch pha loãng trên. Trên sắc ký đồ thu được, xác định đáp ứng pic (chiều cao) tương ứng với mỗi mức nồng độ. Xác định LOD của phương pháp dựa vào tỷ lệ đáp ứng so với nhiễu. Trong đó LOD là giá trị nồng độ mà ở đó có đáp ứng pic oxostephanin gấp khoảng 3 lần giá trị nhiễu đường nền. LOQ có đáp ứng pic oxostephanin gấp khoảng 10 lần giá trị nhiễu đường nền.

2.4.2.3. Định lượng oxostephanin trong các mẫu đánh giá sự thay đổi hàm lượng theo thời gian thu hái

Hàm lượng oxostephanin được tính theo công thức:

Hàm lượng oxostephanin (%) = $\frac{C \times V \times 100}{m \times (100 - x) \times 10^6} \times 100$

Với S = aC + b

Trong đó:

C (µg/ml): Nồng độ oxostephanin trong mẫu thử

m (g): Lượng cân mẫu thử

x (%): Hàm ẩm của mẫu thử

V (ml): thể tích mẫu thử

S (mAU.S): diện tích pic

a: độ dốc của đường chuẩn

b: giao điểm của đường chuẩn với trục tung

2.4.3. 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

2.4.3.1. Đánh giá tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư của một số hợp chất đã phân lập

Từ các chất đã chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc, tiến hành đánh giá tác dụng gây độc của các hợp chất **SD1**, **SD2**, **SD3**, **SD4** và **SD5** trên năm dòng tế bào HeLa, HepG2, OVCAR-8, MCF7, N87. Các hợp chất trên được pha trong dung môi DMSO 0,5% với dải nồng độ thử nghiệm của các hợp chất như **bảng 2.1.**

[CµM]	Dãy nồng độ thử (*) [CµM]					
Chất thử	C1	C2	C3	C4	C5	C6
SD1 (stedieltin A)	239	119,5	59,75	29,88	14,94	7,47
SD2 (stedieltin B)	563	281,5	140,75	70,38	35,19	17,6
SD3 (oxostephanin)	65,5	32,75	16,38	8,19	4,1	2,05
SD4 (oxostephanosin)	156,4	78,2	39,1	19,55	9,8	4,9
SD5 (oxocrebanin)	187	93,5	46,75	23,38	11,69	5,85

Bảng 2.1. Dải nồng độ thử nghiệm của các hợp chất

Tác dụng gây độc tế bào được đánh giá dựa trên ảnh hưởng của các hợp chất tới hình thái tế bào và bằng phương pháp nhuộm MTS [109], [110].

* Đánh giá ảnh hưởng của các hợp chất tới hình thái tế bào

Năm dòng tế bào HeLa, HepG2, OVCAR-8, MCF7, N87 được bảo quản trong điều kiện Nito lỏng sau khi được hoạt hoá và nuôi cấy trong môi trường cơ bản DMEM low glucose (1g Glucose/lít); RPMI - 1640 có bổ sung 10% FBS, 1% Penicillin/ streptomycin trong điều kiện 37^oC, 5% CO₂.

Sau 24h nuôi cấy, quan sát dưới kính hiển vi cho thấy tế bào bám dính tốt, khoẻ mạnh, chiếm 40-50% bề mặt đĩa nuôi cấy. Theo dõi, chăm sóc, thay môi trường 2 ngày một lần, có thể cấy chuyển khi mật độ đủ để tiến hành thí nghiệm.

Để định tính mức độ ảnh hưởng của các hợp chất lên từng dòng tế bào, sau 48h ủ thuốc thực hiện quan sát dưới kính hiển vi soi ngược, ghi lại hình ảnh, hình thái tế bào ở các thí nghiệm cũng như đối chứng để so sánh kết quả thu được.



Hình 2.2. Các dòng tế bào ung thư (a) MCF7, (b) HeLa, (c) OVCAR-8, (d) N87, (e) HepG2 sau 48h nuôi cấy

Dánh giá tác dụng gây độc tế bào bằng phương pháp nhuộm MTS
 * Nguyên tắc

Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Monks (1991) [111], [112].

MTS (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – 5 - (3-carboxymethoxyphenyl) – 2 - (4-sulfophenyl) - 2H - tetrazolium) khi có mặt PMS (phenazine methosulfate) được một loại enzym trong ty thể của tế bào sống chuyển hóa tạo ra một sản phẩm formazan tan trong môi trường nuôi cấy tế bào, hấp thụ ánh sáng tối đa ở bước sóng 490-500 nm trong đệm PBS. Hàm lượng của chất tạo ra tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống tham gia phản ứng, lượng formazan được định lượng bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 490 nm. Phương pháp MTS có tính tiện lợi cao do chỉ cần bổ sung thẳng chất vào môi trường nuôi cấy tế bào mà không cần

bất kỳ bước rửa hay chuẩn bị nào khác, hạn chế được các sai sót chủ quan do thao tác.

* Phương pháp tiến hành thí nghiệm

Phương pháp hoạt hoá và nhân nuôi các dòng tế bào

- Tế bào HeLa, HepG2, OVCAR-8, MCF-7, N87 ở trạng thái đông lạnh

- Rã đông ở 37°C sau đó ly tâm ở 1250 rpm/5 phút để thu cặn tế bào

- Cặn tế bào được đánh tan trong môi trường nuôi cấy cơ bản của tế bào (DMEM low glucose (1g Glucose/lít), RPMI 1640) có bổ sung 10% FBS, 1% Penicillin/ streptomycin sao cho khả năng phân tán của tế bào là tốt nhất.

- Huyền phù sẽ được chuyển vào dụng cụ nuôi cấy (đĩa nuôi cấy đường kính 10cm hoặc chai nuôi cấy 75cm²) có bổ sung thể tích môi trường phù hợp với mật độ tế bào và thời gian thí nghiệm. Sau đó tế bào sẽ được phát triển trong tủ ấm 37⁰C, 5% CO₂. Tuỳ vào từng loại tế bào để sử dụng dụng cụ và môi trường nuôi cấy phù hợp

- Thay môi trường cho tế bào thường xuyên từ 2-3 ngày một lần.

- Cấy chuyển hoặc thu tế bào khi mật độ tế bào đạt 60-70% bằng Trypsin - EDTA 1x.

- Xác định số lượng tế bào bằng buồng đếm tế bào Neubauer, Đức.

• Phương pháp thử độc tính tế bào MTS

Để thử độc tính của các chất trên dòng tế bào ung thư, nghiên cứu sử dụng bộ kit CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay của hãng Promega (gọi tắt là phương pháp MTS).

- Chuẩn bị tế bào: Khi tế bào khoẻ mạnh mọc khoảng 60-70% đĩa hoặc chai nuôi cấy. Thu tế bào bằng Trypsin-EDTA. Dùng pipet đa kênh để nạp tế bào vào trong các giếng của đĩa nuôi cấy 96 giếng với nồng độ 5.000 tế bào/180 μ l môi trường nuôi cấy, quan sát kiểm tra dưới KHV đảo chiều. Sau đó ủ trong 37°C, 5% CO₂ cho tế bào ổn định trong 24h trước khi tiến hành thử thuốc.

- Ủ với thuốc thử: Cho mẫu thử vào các giếng với dải nồng độ thí nghiệm, mỗi nồng độ được giảm từ $\frac{1}{2}$ nồng độ trước nó.

Nồng độ thí nghiệm được tính toán phù hợp với điều kiện thử nghiệm. Gõ nhẹ vào thành đĩa cho thuốc phân bố đều rồi rồi ủ trong 48h ở trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. - Nhuộm MTS: Sau 48h, thêm 20µl dung dịch nhuộm MTS. Gõ nhẹ đĩa và ủ trong 4h ở 37°C, 5% CO₂. Ở bước này, dung dịch cần được bọc kín để tránh ánh sáng.

- Đo mật độ quang học của dung dịch trong giếng bằng máy Elisa SpectraMAX Plus 384 ở bước sóng 490 nm.

Dựa vào giá trị mật độ quang học, xác định được % gây độc tế bào của mẫu thử (A), từ đó đánh giá được độ độc đối với tế bào của hợp chất. A được tính theo công thức:

A (%) =
$$(1 - \frac{T}{V_H}) \times 100$$

 V_H : giá trị trung bình của mật độ quang học ở các giếng thử với dung môi pha thuốc.

T: giá trị trung bình của mật độ quang học ở các giếng thử với thuốc.

Nếu A = 50% có nghĩa là thuốc có tác dụng gây độc và làm chết 50% tế bào. Nồng độ thuốc mà tại đó giá trị A đạt 50% gọi là liều gây chết 50% tế bào, ký hiệu là IC₅₀. Đây là giá trị để đánh giá độc tính của thuốc đối với tế bào.

* Chỉ tiêu nghiên cứu

- Các chỉ tiêu về hoạt hoá và nhân nuôi tế bào: môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy, hình thái các dòng tế bào, khả năng bám dính của tế bào, mật độ tế bào.

 Chỉ tiêu về tác dụng gây độc của các hợp chất: hình thái các dòng tế bào ở các nồng độ chất thử khác nhau.

- Chỉ tiêu về đo mật độ quang học: nồng độ formazan trong các giếng.

* Xử lý số liệu

Các thí nghiệm đánh giá tác dụng độc tế bào được thực hiện ít nhất 2 lần và lấy giá trị trung bình. Phân tích số liệu, xây dựng đồ thị, tỷ lệ % tế bào sống (A%) tương ứng với các nồng độ và giá trị IC₅₀ của từng chất được thực hiện trên phần mềm Microsoft Excel 2016.

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

Cơ chế tác dụng gây độc trên dòng tế bào OVCAR-8

Cơ chế tác dụng gây độc của oxostephanin trên dòng tế bào OVCAR-8 được so sánh với tác dụng của VX-680 sử dụng các phương pháp sau:

* Phương pháp theo dõi tế bào theo thời gian thực trên hệ thống xCelligence [113]

- Nguyên tắc

Trước đây, việc đo khả năng tăng sinh hay sự chết của tế bào dưới tác động của thuốc thử chỉ thể hiện được ở một thời điểm nhất định. Một công nghệ mới đã được phát triển do Roche Applied Science kết hợp với ACEA Biosciences, cho phép kiểm tra tế bào theo thời gian, sử dụng đĩa nuôi cấy tế bào chuyên dụng. Hệ thống máy xCELLigence có thể đo và định lượng khả năng bám đáy đĩa, sự sinh trưởng, cũng như sự chết của tế bào, hay bất kỳ một sự thay đổi nào về tính chất, từ đó đưa ra đồ thị biểu diễn chỉ số tế bào (CI – cell index) theo thời gian. Thiết bị trung tâm của hệ thống xCELLigence là mạng lưới cảm biến điện gắn ở dưới đáy của đĩa 96 giếng (E-plate 96). Việc đo điện trở của những điện cực cảm biến này cho phép phát hiện và theo dõi những thay đổi của tế bào, tất cả đều ảnh hưởng đến điện trở của điện cực. Ngoài ra, giá trị điện trở còn phụ thuộc vào diện tích bám của tế bào lên điện cực. Số lượng tế bào càng lớn, tế bào bám càng khỏe, càng trải dài ra bề mặt đĩa thì giá trị điện trở càng cao.

- Tiến hành

Thử nghiệm tăng sinh được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống thông minh (ACEA Biosciences; Agilent Technologies, Inc.). Môi trường (100 μ l/giếng) được thêm vào mỗi 96 giếng của đĩa E (ACEA Biosciences; Agilent Technologies, Inc.) để đọc nền trong 15 phút. Trong khi chờ đợi, các tế bào được tiếp tục nuôi trong môi trường, và huyền phù tế bào 80 μ l được thêm vào để tạo ra mật độ tế bào là 3x10³ tế bào/180 μ l/ giếng. Sau khi ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, đĩa E được đặt vào trạm RTCA SP trong tủ ấm. Sau 24 giờ, các tế bào được theo dõi trong khoảng thời gian 30 phút từ thời điểm cấy cho đến khi kết thúc thí nghiệm với tổng thời gian 30 phút từ thời điểm cấy cho đến khi kết thúc thí nghiệm với tổng thời gian > 200 h. Điện trở được đo bằng phần mềm tích hợp RTCA của hệ thống xcELLigence dưới dạng một tham số không thứ nguyên gọi là chỉ số tế bào (CI).

- Chỉ tiêu nghiên cứu

Giá trị CI chuẩn hóa được sử dụng để đánh giá khả năng sống sót (số lượng, hình thái tế bào) để lấy giá trị IC₅₀, thời gian nhân đôi của tế bào.

* Phương pháp miễn dịch huỳnh quang

- Tiến hành

Các tế bào được nuôi trên các tấm coverglass trong 24 giờ trước khi được xử lý bằng oxostephanin (5 μ M) hoặc VX-680 (0,2 μ M) có hoặc không có paclitaxel (0,035 μ M; Millipore, Sigma) và ủ trong 15 giờ trong tủ ấm ở 37°C với 5% CO₂. Paclitaxel được sử dụng để đồng bộ hóa các tế bào với pha M trong chu kỳ tế bào, nhằm thu được các tế bào đang phân chia.

Sau đó, các tế bào được cố định bằng paraformaldehyd 4% và sucrose 2% trong 15 phút ở 37°C, được làm thấm bằng cách đục màng với 0,2% Triton X-100 trong 10 phút, sử dụng BSA 5 mg/ml để che phủ các liên kết không đặc hiệu và bộc lộ các liên kết đặc hiệu trên tế bào (bước này thực hiện trong 15 phút ở nhiệt độ phòng). Ủ mẫu tế bào với kháng thể sơ cấp, là kháng thể thỏ đa dòng kháng histon H3 phosphoryl hóa tại Ser10 (ab183626, Abcam), ở độ pha loãng 1: 500 trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, bọc bạc tránh ánh sáng. RAb H3PS10 sẽ gắn đặc hiệu với vị trí histone H3 bị phosphoryl hóa trong tế bào. Aurora B được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng của chuột (36-5200, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), ở độ pha loãng 1: 250. Nhuộm DNA với 5 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), tránh sáng. Hình ảnh được thu thập bằng kính hiển vi huỳnh quang quét Laser ZEISS 510 (LSM) với vật kính 40X hoặc 63X (carl Zeiss AG).

Để đánh giá ảnh hưởng của chất thử lên sự định vị sai của Aurora kinase B trên NST, tế bào được sử dụng là HeLa biểu hiện ổn định Aurora kinase B (Aurora B-GFP), các tế bào được nuôi cấy trên coverglass Lab-Tek (Nalge Nunc International). Sau 24 giờ sử dụng các hợp chất ở nồng độ oxostephanin (5 μ M) hoặc VX-680 (0,2 μ M), các tế bào được quan sát thấy mà không cần cố định.

Với kiểm tra hình thái nhân tế bào, các tế bào được ủ với oxostephanin (5 μ M) hoặc VX-680 (0,2 μ M) trong 48 giờ. Sau đó, các tế bào được cố định bằng paraformaldehyd 4% và sucrose 2% trong 15 phút ở 37°C, được thấm với 0,2% Triton X-100 trong 10 phút và nhuộm bằng 5 μ g/ml Hoechst 33342. Sau khi ủ

trong 15 phút, các tế bào được được thu thập, rửa bằng nước muối đệm photphat (PBS; Millipore, Sigma), và quan sát bằng kính hiển vi LSM. Hình ảnh được phân tích bằng LSM Image Browser (Carl Zeiss AG).

- Chỉ tiêu nghiên cứu

Tín hiệu huỳnh quang được phân tích để đánh giá ảnh hưởng lên hình thái và thể tích nhân tế bào OVCAR-8 sau khi được xử lý bằng oxostephanin và VX-680, so sánh với đối chứng.

Sự biểu hiện và hoạt động của Aurora kinase trong tế bào OVCAR-8 sau khi ủ với thuốc thử được đánh giá thông qua sự điều hoà quá trình phosphoryl hoá protein histone H3 ở serine 10 (H3S10ph). Trong đó sự định vị sai của Aurora kinase B trên NST ở tế bào nguyên phân được đánh giá thông qua tín hiệu huỳnh quang trên tế bào HeLa biểu hiện ổn định Aurora kinase B.

* Quá trình chết theo chương trình apoptosis

- Nguyên tắc:

Annexin-V là một protein liên kết phospholipid và nó liên kết đặc biệt với các phân tử phosphatidyl-serine tích điện âm tiếp xúc trên bề mặt của tế bào apoptotic. Tế bào dương tính với Annexin-V khi có sự biểu hiện của các phân tử phosphatidyl-serine trên bề mặt tế bào là dấu hiệu của quá trình apoptosis và được đánh giá thông qua hình ảnh miễn dịch huỳnh quang.

- Tiến hành

Thử nghiệm apoptosis được thực hiện bằng cách sử dụng kit apoptosis Alexa Fluor 488 Annexin V (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Sau khi xử lý các tế bào với 5 μ M oxostephanin hoặc 0,2 μ M VX-680 trong 48 giờ, các tế bào được thu hoạch và chuẩn bị cho phân tích apoptosis.

Các tế bào được rửa sạch bằng PBS, sau đó được phân tán trong đệm liên kết Annexin để có được mật độ 10⁶ tế bào/ml. Sau đó, dung dịch tế bào được ủ với 5 µl Alexa Fluor® 488-Annexin V và 100 µl PI trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, 400 µl đệm liên kết Annexin được trộn nhẹ nhàng vào dung dịch và dung dịch tế bào được phân tích trên Hệ thống FAcS Canto II (BD Biosciences). Để có hình ảnh biểu hiện của dấu hiệu apoptotic, sau 24 giờ xử lý với các hợp chất, các tế bào được ủ với Alexa Fluor® 488-Annexin V trong 30 phút và được quan sát dưới kính hiển vi LSM.

- Chỉ tiêu nghiên cứu

Sự biểu hiện của phân tử phosphatidyl-serine trên bề mặt tế bào và tỷ lệ tế bào được xử lý với thuốc thử dương tính với Annexin-V, so sánh với đối chứng.

* Phân tích khối u đa bào

- Tiến hành

Các khối u đa bào hình cầu của OVCAR-8 được tạo ra bằng phương pháp thả treo như đã mô tả trong công bố trước đây [114]. Tổng cộng 15 µl môi trường chứa $5x10^3$ tế bào đã được thêm vào mỗi vòng tròn trên nắp ngược của đĩa 96 giếng để tạo ra một hình cầu. Sau đó úp ngược nắp lên đĩa đã phủ agarose 1,5% (w/v) vô trùng chứa 200 µl môi trường hoàn chỉnh. Sau 48 giờ ủ trong buồng được làm ẩm với 5% CO₂ ở 37°C, các khối u được chuyển từ nắp vào từng giếng của đĩa phủ agarose và tiếp tục được nuôi cấy trong DMEM (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) có bổ sung FBS 10 % (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Các khối u được xử lý bằng oxostephanin trong hai điều kiện: i) Hợp chất được thêm vào chế phẩm tế bào trước khi thực hiện thả treo; và ii) hợp chất được thêm vào sau khi chuyển các khối u đã hình thành vào giếng nuôi cấy. Hai nồng độ oxostephanin ở 5 và 1 μ M được sử dụng trong cả hai điều kiện. Hình ảnh thu được bằng kính hiển vi Axiovert 40CFL (Carl Zeiss AG) với máy ảnh Powershot G9. Những hình ảnh này được phân tích bằng phần mềm Axio phiên bản 4.5 (Carl Zeiss AG) để xác định đường kính khối u.

Thể tích xấp xỉ (V) của mỗi khối u được tính như sau:

 $V = (4/3) \ge \pi \ge (D1/2) \ge (D2/2)^2$

Trong đó D1 và D2 lần lượt là đường kính dài nhất và ngắn nhất [115].

- Chỉ tiêu nghiên cứu

Khả năng hình thành, thể tích, hình thái và tính chất của khối u hình thành khi có sự hiện diện của thuốc thử, so sánh với đối chứng.

* Tách chiết RNA và phiên mã ngược - PCR định lượng (RT-qPCR)

- Tiến hành

RNA tổng số được chiết xuất từ các dòng tế bào bằng bộ kit RNeasy Mini (Qiagen GmbH) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tổng cộng 1 μg RNA tổng số từ mỗi mẫu được chuyển đổi thành cDNA bằng cách sử dụng bộ tổng hợp M-MLV cDNA (Enzynomics, Inc.). Phản ứng được thực hiện ở 25°C trong 10 phút, 42°C trong 60 phút, 95°C trong 5 phút và được giữ ở 4°C trên máy tuần hoàn nhiệt SimpliAmpTM (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Các sản phẩm cDNA từ mỗi mẫu được sử dụng để thực hiện qPCR. Tổng cộng 1 μl cDNA pha loãng năm lần được sử dụng cho qPCR và thuốc thử được trộn với PCR sau đó sử dụng bộ kit SensiFAST SYBR® Lo-ROX (Bioline Pty Ltd, Meridian Bioscience, Inc.). Các đoạn mồi được sử dụng được liệt kê trong **Bảng 2.2**.

			Kích		
Gen	Số hiệu	Trình tự mồi	thước	TLTK	
			(bp)		
Aurora	NM_198433.3	Fw 5'-TTccAGGAGGAccAcTcTcTGT-3'	69	[116]	
A		Rv 5'-TGcATccGAccTTcAA TcATT-3'			
Aurora	NM_001313950.2	Fw 5'-cGcAGAGAGATcGAAATccAG-3'	85	[117]	
В		Rv 5'-AGATecTecGGTeATAAAA-3'			
VEGF	NM_001025366.3	Fw 5'-AGGAGGAGGGGGGAGAATcATcAc-3'	90	[118]	
		Rv 5'-ATGTccAccAGGGTcTcGATTG-3'			
β-actin	NM_001101.5	Fw 5'-AcAGAGccTcGccTTTG-3'	110	[119]	
		Rv 5'-ccTTGcAcATGccGGAG-3'			
Fw: forward; Rv: reverse					

Bảng 2.2. Trình tự các mồi đặc hiệu được sử dụng cho RT-qPCR

β-actin mRNA được sử dụng như một gen kiểm soát nội bộ để chuẩn hóa dữ liệu. RT-qPCR được thực hiện cho lần kích hoạt đầu tiên ở 95°C trong 20 giây, tiếp theo là 40 chu kỳ ở 95°C trong 10 giây, 63°C trong 30 giây và 70°C trong 1 giây. Đường cong nóng chảy được phân tích bằng cách sử dụng cài đặt mặc định của thiết bị. Các xét nghiệm được thực hiện ba lần trên hệ thống Light Cycle® 96 (chẩn đoán Roche). Phương pháp DDCq [120] được sử dụng để định lượng biểu hiện mRNA.

- Chỉ tiêu nghiên cứu

Ånh hưởng của oxostephanin lên sự biểu hiện của Aurora kinase A và Aurora kinase B ở mức độ mRNA trên dòng tế bào OVCAR-8.

Ngoài ra phương pháp này cũng được dùng để đánh giá ảnh hưởng của oxostephanin lên sự biểu hiện của Aurora kinase A và Aurora kinase B ở mức độ mRNA trên các dòng tế bào thường trong thí nghiệm tiếp theo.

* Tác dụng của oxostephanin trên các dòng tế bào thường

Oxostephanin tiếp tục được nghiên cứu trên các dòng tế bào không ung thư để đánh giá hợp chất này có hay không có khả năng gây độc trên các dòng tế bào này, nếu có thì cơ chế gây độc ra sao, khả năng gây độc đó có liên quan gì đến tác dụng kháng ung thư của hợp chất không. Nghiên cứu được tiến hành trên các tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người (hUVECs), tế bào gốc trung mô có nguồn gốc từ dây rốn (UC-MSCs) và tế bào nguyên bào sợi da của người (hFBs) sử dụng các phương pháp sau:

* Thử nghiệm khả năng sống của tế bào

- Nguyên tắc

Khả năng sống của các tế bào hUVECs, UC-MSCs, hFBs dưới ảnh hưởng của oxostephanin được đánh giá bằng cách sử dụng xét nghiệm sulforhodamine B (SRB). Phép thử SRB được phát triển bởi Philip Skehan và cộng sự năm 1990 để đánh giá độc tính của chất nghiên cứu và khả năng phát triển của tế bào trong ứng dụng sàng lọc thuốc ở qui mô lớn [121]. Nguyên tắc của phép thử là khả năng nhuộm màu của SRB lên protein, SRB nhuộm bằng cách phá vỡ màng tế bào, những mảnh vỡ tế bào không bị nhuộm, do đó không ảnh hưởng đến số liệu thực nghiệm.

Phương pháp SRB dựa trên khả năng liên kết tĩnh điện và sự phụ thuộc vào pH của các dư lượng amino acid của các protein. Dưới các điều kiện môi trường acid nhẹ, SRB liên kết với các dư lượng amino acid trên các protein của các tế bào đã được cố định bằng trichloroacetic acid (TCA) và sử dụng base yếu như Tris-base để hòa tan và đo mật độ quang của dịch chiết từ tế bào để định lượng.

- Tiến hành

Các tế bào được nhân nuôi với mật độ $3x10^3$ tế bào/giếng trong các đĩa 96 giếng và được ủ với oxostephanin trong 24, 48 và 72 giờ ở các nồng độ khác nhau pha loãng 5 lần từ nồng độ từ mức cao nhất là 25 đến 5, 1, 0,2 và 0,04 µM. Sau đó, môi trường được loại bỏ, và các tế bào được nhuộm với SRB 4% (Millipore, Sigma) trong 10 phút ở nhiệt độ phòng sau khi cố định với TCA 10% (Millipore, Sigma) trong 1 giờ ở 4°C. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 540 nm bằng đầu đọc vi tấm (BioTech Power Wave XS; BioTek Instruments, Inc.).

- Chỉ tiêu nghiên cứu

Ånh hưởng của oxostephanin lên khả năng sống sót của tế bào từ đó xác định giá trị IC_{50} .

* Thử nghiệm hình thành khuẩn lạc

- Tiến hành

Các tế bào hUVECs và hFBs được cấy vào đĩa sáu giếng ở mật độ 1×10^3 tế bào/giếng và được xử lý bằng oxostephanin ở bốn nồng độ khác nhau (25, 5, 1 và 0,2 µM) trong 24 giờ. Môi trường được làm mới, và các tế bào sau đó được ủ trong tủ ấm được làm ẩm với 5% CO₂ ở 37°C trong 10 ngày nữa. Sau đó, các tế bào được nhuộm bằng Giemsa (Millipore, Sigma) trong 5 phút ở nhiệt độ phòng sau khi cố định với metanol 70% trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sự hình thành các đơn vị khuẩn lạc của tế bào nội mô (CFU-ECs) và nguyên bào sợi (CFU - Fs) đã được quan sát, chụp ảnh và đếm bằng kính hiển vi đảo ngược Axiovert 40 (Carl Zeiss AG) (độ phóng đại x4). Số lượng khuẩn lạc được xác định trên 1.000 tế bào lúc cấy chuyển.

- Chỉ tiêu nghiên cứu

Số lượng khuẩn lạc được tạo thành, mật độ tế bào/ khuẩn lạc sau khi xử lý bằng oxostephanin được xác định và so sánh với đối chứng.

* Phân tích sự tiết các yếu tố tăng trưởng bằng thử nghiệm Luminex

- Tiến hành

Nghiên cứu sử dụng thử nghiệm Luminex với xét nghiệm miễn dịch đa năng ProcartaPlexTM (Human Custom ProcartaPlex 4-Plex kit; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Môi trường duy trì được chuẩn bị bằng cách nuôi cấy tế bào đến 90% trong môi trường thích hợp mà không cần bổ sung hoặc bổ sung FBS trong 48 giờ. Môi trường duy trì sau đó được thu thập và giữ trong đá trước khi sử dụng. Thuốc thử và quy trình được xử lý theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tín hiệu phát quang của các yếu tố tăng trưởng được phát hiện bằng cách sử dụng hệ thống LuminexTM 100/200TM được trang bị phần mềm xPONENT 3.1 (Luminex co., Ltd).

- Chỉ tiêu nghiên cứu

Số lượng và nồng độ các yếu tố tăng trưởng gồm VEGF-A, FGF-2 và HGF được tiết ra từ các tế bào hUVECs và hFBs, so sánh với đối chứng.

* Thử nghiệm chữa lành vết thương

- Tiến hành

Khả năng chữa lành (làm liền) vết thương có mối quan hệ chặt chẽ với khả năng di chuyển của tế bào. Các tế bào hUVECs và hFBs được nuôi cấy trong môi trường tương ứng tăng trưởng tế bào nội mô EGM-2-2 Bulletkit (Lonza Bioscience) và DMEM/F12 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) được bổ sung FBS 10% để đạt đến hỗn hợp hoàn chỉnh trong các đĩa 24 giếng. Sau đó, các tế bào được bổ sung mitomycin C (5 µg/ml) để ức chế sự tăng sinh của tế bào. Tiếp theo, các tế bào được nuôi cấy trong môi trường không có huyết thanh trong 24 giờ (hUVECs) và 48 giờ (hFBs). Các vết thương được tạo ra bằng cách sử dụng máy nạo tế bào SPLScar (SPL Life Sciences co., Ltd.), và các tế bào nổi được loại bỏ bằng cách rửa giếng hai lần với PBS. Oxostephanin được ủ với các tế bào ở ba nồng độ 25, 5 và 1 µM trong 24 giờ (hUVECs) và 48 giờ (hFBs). Hình ảnh được chụp sau mỗi 6 giờ (kính hiển vi ngược Olympus IX73, Olympus) từ các vết thương được tạo ra. Khả năng di chuyển của tế bào được phân tích bằng phần mềm ImageJ (phiên bản 1.53e, Viện Y tế Quốc gia).

- Chỉ tiêu nghiên cứu

Hình ảnh về sự di chuyển của tế bào về phía vết thương và khả năng che phủ vết thương sau thời gian di chuyển của các tế bào thử nghiệm (tỷ lệ % che phủ), so sánh với đối chứng.

* Thử nghiệm hình thành mạch

- Tiến hành

Thử nghiệm hình thành mạch được thực hiện bằng kit Angiogenesis Assay (ab204726, Abcam). Dung dịch nền ngoại bào (Matrigel, được cung cấp kèm theo bộ kit, Abcam) được thêm vào đĩa 96 giếng và ủ trong 1 giờ ở 37°C để cho phép dung dịch tạo thành gel. hUVECs được cấy ở $1,5x10^4$ tế bào/giếng (ba lần lặp lại mỗi nhóm) trên gel và được ủ với oxostephanin ở hai nồng độ 5 và 1 μ M. Đối với các giếng kiểm soát nền, không có Matrigel được thêm vào. Suramin (được cung cấp kèm theo bộ dụng cụ, Abcam) được sử dụng như một chất kiểm soát ức chế sự hình thành mạch. Sau 8 giờ ủ ở 37°C trong tủ ấm, sự hình thành ống được kiểm tra bằng kính hiển vi đảo ngược.

- Chỉ tiêu nghiên cứu

Tổng chiều dài mạch, số điểm phân nhánh (số điểm nối), tổng chiều dài mạch nhánh và chiều dài ống trung bình được phân tích bằng phần mềm Wimasis (Phiên bản web, wimasis.com).

* Xử lý số liệu nghiên cứu

- Đối với các dữ kiện không sử dụng được phương pháp thống kê: sử dụng phương pháp mô tả.

- Phân tích thống kê: các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm R phiên bản 3.4.4. Sự khác biệt giữa các nhóm được đánh giá bằng cách sử dụng t-test không ghép đôi, two-way ANOVA và Tukey's HSD test. Giá trị P < 0,05 được coi là biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Các dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± SD.
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT TỪ THÂN LÁ CÂY CỦ DÒM 3.1.1. Chiết xuất, phân lập một số hợp chất từ thân lá cây củ dòm 3.1.1.1. Chiết xuất

Dược liệu thân lá cây Củ dòm 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 cắn 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 cắn 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 cắn ethyl acetat chứa lớp chất alcaloid (SDE-II).

3.1.1.2. Phân lập và tinh chế

Phân tách cắn SDE-II (65 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải gradient dichloromethan/methanol (100% dichloromethan \rightarrow 100% methanol) thu được 5 phân đoạn (SDE1 - SDE5). Phân tách phân đoạn SDE1 (3,0 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/aceton (10/1, v/v) thu được phân đoạn SDE1.2. Phân lập phân đoạn SDE1.2 (1,50 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi dichloromethan/ethyl acetat (80/1, v/v) thu được 2 hợp chất **SD6** (13,2 mg) và **SD8** (8,8 mg).

Phân tách phân đoạn SDE2 (5,1 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/aceton (50/1, v/v) thu được phân đoạn SDE2.5. Phân lập phân đoạn SDE2.5 (2,8 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/ethyl acetat (80/1, v/v) thu được hợp chất **SD7** (2052 mg) và phân đoạn SDE2.5.2. Hợp chất **SD9** (3,9 mg) thu được từ phân đoạn SDE2.5.2 (160,3 mg) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/methanol (80/1, v/v).

Phân tách phân đoạn SDE3 (4,6 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/methanol (80/1, v/v) thu được phân đoạn SDE3.1. Tiếp tục phân tách phân đoạn SDE3.1 (1,5 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/aceton (18/1, v/v) thu được phân đoạn SDE3.1.16 (600 mg) và phân đoạn này được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo RP-C₁₈ với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (2/1, v/v) thu được hợp chất **SD1** (21,0 mg).

Phân tách phân đoạn SDE4 (7,3 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi dichloromethan/methanol (80/1, v/v) thu được 2 phân đoạn SDE4.6 và SDE4.12. Tiếp tục phân tách phân đoạn SDE4.6 (1,2 g) bằng sắc ký cột pha thường với hệ dung môi dichloromethan/aceton/methanol (30/1/0,05, v/v/v), sau đó sử dụng sắc ký cột Sephadex với hệ dung môi dichloromethan/methanol (1/1, v/v) thu được 2 hợp chất **SD3** (8,6 mg) và **SD4** (3,9 mg). Phân lập phân đoạn SDE4.12 (801,2 mg) bằng sắc ký cột pha thường với hệ dung môi dichloromethan/methanol (80/1, v/v) thu được hợp chất **SD5** (3,5 mg).

Phân tách phân đoạn SDE5 (8,9 g) bằng sắc ký cột silica gel với dung môi rửa giải dichloromethan/methanol (20/1, v/v) thu được hai phân đoạn SDE5.9 và SDE5.11. Phân lập phân đoạn SDE5.9 (410,7 mg) bằng sắc ký cộ pha đảo với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (2/3, v/v) thu được hợp chất **SD10** (40,0 mg). Tiến hành sắc ký cột tương tự đối với phân đoạn SDE5.11 (1,2 g) thu được hợp chất **SD2** (8,5 mg) và **SD11** (25,0 mg).

Quá trình chiết xuất, phân lập các hợp chất từ thân lá cây củ dòm được tóm tắt trong **hình 3.1**.

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

3.1.2.1. Hợp chất SD1 (chất mới)

Hợp chất **SD1** phân lập được từ phân đoạn SDE3.1.16.

Cảm quan: dạng chất bột, màu nâu đỏ.

Công thức phân tử của **SD1** được xác định là $C_{19}H_{15}NO_6$ dựa trên phổ khối phân giải cao HR-QTOF-MS với sự xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 354,0979 $[M + H]^+$ (giá trị lý thuyết cho $C_{19}H_{16}NO_6^+$ là 354,0977), tương ứng với chỉ số bất bão hòa là 13. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) và ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): Xem **bảng 3.1**.



Hình 3.1. Tóm tắt quá trình chiết xuất, phân lập các hợp chất trong thân lá cây củ dòm

Vị trí	$\delta_{ m H}{}^{ m a,b}$	${oldsymbol{\delta}_{\mathrm{C}}}^{\mathrm{a,c}}$	$^{\#}\!\delta_{\mathrm{C}}$
1	-	150,0	151,2
2	-	147,5	147,4
3	7,44 s	102,1	102,9
3a		135,5	134,4
4	7,81d (5,5)	121,9	122,9
5	8,28 d (5,5)	139,9	143,8
6	-	-	-
6a	-	150,2	145,8
6b	-	121,1	121,1
7	-	167,0	179,7
7a	-	145,0	120,7
8	-	147,5	160,9
9	7,00 dd (8,0; 1,0)	111,8	112,8
10	6,81 t (8,0)	118,1	134,2
11	6,67 dd (8,0; 1,0)	123,7	118,9
11a	-	119,3	134,3
11b	-	112,7	106,8
12	6,14 s/6,15 s	101,9	102,4
7-OCH ₃	3,14 s	51,2	-
8-OCH ₃	3,83 s	55,9	55,9

Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD1 và chất tham khảo oxostephanin

^a DMSO-d₆, ^b500 MHz, ^c125 MHz

[#] δ_C của oxostephanin đo trong DMSO-d₆ [41]

Dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của **SD1** có nhiều điểm tương đồng với dữ liệu phổ của oxostephanin trong tài liệu tham khảo [41] cho thấy **SD1** cũng có cấu trúc bộ khung là dẫn xuất của oxoaporphin (**hình 3.2A**). Phổ ¹³C-NMR cho thấy sự xuất hiện của 19 carbon, bao gồm 15 carbon vòng thơm, một carbon của nhóm methoxy gắn cào vòng thơm 8-OCH₃ (δ_C 55,9), một nhóm methylendioxy (C-12, δ_C 101,9) và một nhóm methoxy (δ_C 51,2) của nhóm ester C₇=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 $\delta_{\rm C}$ 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: Δ =14; **SD1**: Δ =13) hỗ trợ cho sự mở vòng C của khung chất. Nhóm hydroxyl (-OH) được xác định dựa vào tín hiệu ở C-7a ($\delta_{\rm C}$ 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 ($\delta_{\rm H}$ 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 ($\delta_{\rm H}$ 7,44) với C-3 ($\delta_{\rm C}$ 102,1), giữa H-4 ($\delta_{\rm H}$ 7,81, d, J=5,5 Hz) với C-4 ($\delta_{\rm C}$ 121,9), giữa H-5 ($\delta_{\rm H}$ 8.28, d, J = 5,5 Hz) và C-5 ($\delta_{\rm C}$ 139,9), giữa H-9 ($\delta_{\rm H}$ 7,00, dd, J =8,0 Hz, 1,0 Hz) với C-9 ($\delta_{\rm C}$ 111,8), giữa H-10 ($\delta_{\rm H}$ 6,81, t, J = 8,0 Hz) với C-10 ($\delta_{\rm C}$ 118,1), giữa H-11 ($\delta_{\rm H}$ 6,67, dd, J = 8,0 Hz, 1,0 Hz) với C-11 ($\delta_{\rm C}$ 123,7), giữa H-12 ($\delta_{\rm H}$ 6,11) với C-12 ($\delta_{\rm C}$ 101,9), giữa proton 7-OCH₃ ($\delta_{\rm H}$ 3,14) với carbon C-7 thế -OCH₃ ($\delta_{\rm C}$ 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 ($\delta_{\rm H}$ 7,81)/H-5 ($\delta_{\rm H}$ 8,28), H-9 ($\delta_{\rm H}$ 7,00)/H-10 ($\delta_{\rm H}$ 6,81)/H-11 ($\delta_{\rm H}$ 6,67), đồng thời cùng với một tín hiệu singlet ở $\delta_{\rm H}$ 7,44. Cụ thể hơn, phổ COSY xuất hiện một số tương tác gần, xác định được các proton cạnh nhau như H-4 ($\delta_{\rm H}$ 7,81, d, J = 5,5 Hz) tương tác với H-5 ($\delta_{\rm H}$ 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 ($\delta_{\rm H}$ 7,00, dd, J = 8,0, 1,0 Hz) tương tác với H-10 ($\delta_{\rm H}$ 6,81, t, J = 8,0 Hz) và H-10 tương tác lên H-11 ($\delta_{\rm H}$ 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 ($\delta_{\rm H}$ 6,14 và 6,15) và methoxy ($\delta_{\rm H}$ 3,83) vẫn được giữ nguyên vị trí trên vòng qua các tương tác HMBC quan trọng, cụ thể là H-12 ($\delta_{\rm H}$ 6,14 và 6,15) /C-1 ($\delta_{\rm C}$ 150,0), C-2 ($\delta_{\rm C}$ 147,5) và 8-OCH₃ ($\delta_{\rm H}$ 3,83) /C-8 ($\delta_{\rm H}$ 147,5). Tuy nhiên, sự xuất hiện của tín hiệu methyl tại $\delta_{\rm H}$ 3,14 và $\delta_{\rm C}$ 51,2 cùng với tương tác HMBC của 7-OCH₃/ C-7 gọi ý cho sự xuất hiện của một nhóm methyl ester trong cấu trúc.

Ngoài ra dữ liệu phổ ¹H-NMR, COSY và HMBC cho thấy rằng vòng A và B không thể tạo khung quinolin. Giả sử chúng tạo khung quinolin thì từ ¹H- NMR và COSY cho thấy rằng carbon vị trí 6 là carbon bậc 4 và được liên kết với nhóm thế ester là methoxy carboxyl do chỉ xuất hiện tín hiệu tương tác giữa H-4 ($\delta_{\rm H}$ 7,81, d, J=5,5) và H-5 ($\delta_{\rm H}$ 8,28, d, J=5,5) trên COSY, cùng với hằng số tương tác đôi J = 5,5 giữa hai proton trên, không có sự tương tác của proton khác. Cùng với đó là sự thiếu hụt tín hiệu của proton gắn với C-6 ($\delta_{\rm C}$ 150,2 ppm) trên HSQC. Đồng thời sự chuyển dịch của độ dịch chuyển của tín hiệu carbon về trường thấp cũng chứng tỏ sự xuất hiện của nhóm thế tại C-6 trên ¹³C-NMR. Nếu xuất hiện nhóm ester gắn kết với vòng quinolin ở vị trí C-6, thì đồng nghĩa nên tìm thấy tín hiệu tương tác dài giữa H-5 và carbon của nhóm ester, nhưng tín hiệu này lại thiếu hụt trên HMBC. Tất cả điều này khẳng định rằng vòng A và B tạo ra khung isoquinolin chứ không phải là quinolin.

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**.





3.1.2.2. Hợp chất SD2 (chất mới)

Hợp chất **SD2** phân lập được từ phân đoạn SDE5.11.

Cảm quan: dạng chất kết tinh hình kim, màu trắng.

Công thức phân tử của hợp chất được xác định là $C_{17}H_{11}NO_4$ dựa trên phổ khối phân giải cao HR-QTOF-MS cho tín hiệu pic ion giả phân tử tại *m/z* 294,0766 [M+H]⁺ (giá trị lý thuyết cho $C_{17}H_{12}NO_4^+$ là 294,0766), tương ứng với độ bất bão

hòa là 13. 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): Xem **bảng 3.2**.

Bảng 3.2. Sô liệu phô NMR (δ ppm) của SD2 và chât tham khảo oxostephani

Vị trí	$\delta_{ ext{H}^{\mathrm{a,b}}}$	$\delta c^{a,c}$	${oldsymbol{\delta}}_{ m C}{}^{ m d,c}$	# δ C
1	-	152,7	151,7	151,2
2	-	140,8	147,3	147,4
3	6,91 s	101,2	100,6	102,9
3a	-	137,3	136,2	134,4
4	7,06 d (6,0)	124,0	123,6	122,9
5	7,82 d (6,0)	140,2	140,5	143,8
6a	-	157,3	156,2	145,8
6b	-	112,2	111,0	121,1
7	-	-	-	179,7
7a	-	141,3	140,1	120,7
8	-	148,1	140,5	160,9
9	6,95 dd (8,0, 1,5)	113,1	113,3	112,8
10	7,10 t (8,0)	115,7	117,5	134,2
11	7,74 dd (8,0, 1,5)	118,6	115,2	118,9
11a	-	118,3	117,4	134,3
11b	-	110,1	108,2	106,8
12	6,20 s	102,2	102,0	102,4
8-OCH ₃	3,93 s	56,3	55,8	55,9

^{*a*} CDCl₃ + MeOD (9/1 v/v), ^{*b*}500 MHz, ^{*c*}125 MHz, ^{*d*}DMSO-d₆

^{*#*} δ_C của oxostephanin đo trong DMSO-d₆ [41]

Phổ ¹H-NMR của **SD2** có nhiều tín hiệu tương đồng với dữ liệu phổ của hợp chất oxostephanin trong tài liệu tham khảo số [41], bao gồm tín hiệu đặc trưng của một nhóm methoxy tại $\delta_{\rm H}$ 3,93 (3H, s) và các tín hiệu proton ở các vòng thơm bao gồm một tín hiệu singlet tại $\delta_{\rm H}$ 6,91(1H, s), hai tín hiệu proton trên liên kết đôi tại $\delta_{\rm H}$ 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 $\delta_{\rm H}$ 6,95 (1H, dd, J = 8,0, 1,5Hz)/ 7,10 (1H, t, J = 8,0 Hz)/7,74 (1H, dd, J = 8.0, 1.5Hz), một tín hiệu của nhóm methylen tại $\delta_{\rm H}$ 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 ($\delta_{\rm H}$ 3,93)/C-8 ($\delta_{\rm C}$ 148,1) và H-12 ($\delta_{\rm H}$ 6,20)/C-1 ($\delta_{\rm C}$ 152,7) và C-2 ($\delta_{\rm C}$ 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 Δ =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 ($\delta_{\rm H}$ 6,95) với C-9 ($\delta_{\rm C}$ 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** (hình 3.3).



Hình 3.3. Cấu trúc và tương tác HMBC chính của hợp chất SD2 3.1.2.3. Hợp chất SD3

Hợp chất **SD3** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng cam. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6) và ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6): Xem **bảng 3.3**. Phổ ¹H-NMR xuất hiện tín hiệu của 1 proton olefin singlet tại $\delta_{\rm H}$ 7,43 (1H, s), 2 proton dạng *cis* tại $\delta_{\rm H}$ 7,90 (1H, d, J = 5,0 Hz) và 8,73 (1H, d, J = 5,0 Hz), 3 proton cạnh nhau tại $\delta_{\rm H}$ 7,25 (1H, d, J = 8,0 Hz), 7,73 (1H, t, J = 8,0 Hz) và 8,26 (1H, d, J = 8,0 Hz), 1 nhóm dioxymethylen tại $\delta_{\rm H}$ 6,51 (1H, s), 1 nhóm methoxy dưới dạng singlet tại $\delta_{\rm H}$ 3,96 (8-OCH₃). Phổ ¹³C-NMR kết hợp phổ HSQC của **SD3** cho thấy sự có mặt của 18 nguyên tử carbon, trong đó có 1 carbon dioxymethylen tại $\delta_{\rm C}$ 102,5 (C-12), 1 carbon keton tại $\delta_{\rm C}$ 179,7 (C-7). 15 carbon còn lại thuộc vòng thơm nằm trong vùng trường từ $\delta_{\rm C}$ 102,7 \rightarrow 160,9. Những phân tích trên cho thấy, **SD3** thuộc nhóm alcaloid.

Vị trí	$\delta_{ ext{H}}{}^{ ext{a,b}}$	$\delta_{\mathrm{C}}^{\mathrm{a,c}}$	# δ C
1	-	151,3	151,2
2	-	147,5	147,4
3	7,43 (s)	102,7	102,6
3a		134,4	134,5
4	7,90 (d, 5,0)	123,0	122,9
5	8,73 (d, 5,0)	143,8	143,8
6a	-	145,8	145,8
6b	-	121,1	121,1
7	-	179,7	179,7
7a	-	120,2	120,3
8	-	160,9	160,9
9	7,25 (d, 8,0)	112,6	112,8
10	7,73 (t, 8,0)	134,3	134,2
11	8,26 (d, 8,0)	118,8	118,9
11a	-	134,5	134,3
11b	-	106,7	106,8
12	6,42 (s)	102,5	102,4
8-OCH ₃	3,96 (s)	55,9	55,9

Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD3 và hợp chất tham khảo

^{*a*} DMSO-d₆, ^{*b*}500 MHz, ^{*c*}125 MHz

^{*#*} δ_C của oxostephanin đo trong DMSO-d₆ [41]

Phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa H-12 với C-1 và C-2, cho phép xác định nhóm methylen này tạo liên kết vòng 5 cạnh với C-1 và C-2 của khung chất qua hai cầu oxy. H-4 tương tác với C-5 và dựa vào hằng số tương tác của cả hai proton (J = 5,5 Hz) cho biết hai proton nằm cạnh nhau. Proton H-9 tương tác với C-7a, C-11, H-10 tương tác với C-8 và C-11a, H-11 tương tác với C-7a, C-9, C-11b cho phép xác định được 3 proton trên nằm cạnh nhau.

Từ những phân tích trên và so sánh các giá trị phổ NMR của hợp chất **SD3** thu được với các giá trị phổ tương ứng của hợp chất oxostephanin được công bố [41] có thể kết luận **SD3** là **oxostephanin** (**Hình 3.4**).



Hình 3.4. Cấu trúc của hợp chất SD3

3.1.2.4. Hợp chất SD4

Hợp chất **SD4** được phân lập dưới dạng bột, màu nâu đỏ. Phổ ESI-MS xuất hiện tín hiệu pic ion giả phân tử tại m/z 291,9 [M + H]⁺ phù hợp công thức phân tử là C₁₇H₉NO₄. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) và ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): Xem **bảng 3.4**.

Bảng 3.4. Số liệu ph	ố NMR (δ ppm)) của SD4 và hợp (chất tham khảo
----------------------	---------------	--------------------	----------------

Vị trí	$oldsymbol{\delta}_{ ext{H}}^{ ext{a,b}}$	$\delta_{C}^{a,c}$	$^{\&}\delta_{\mathrm{C}}$
1	-	151,5	151,3
2	-	148,8	147,5
3	7,57 s	103,2	102,7
3a	-	134,8	134,4
4	8,07 d (5,5)	124,7	123,0
5	8,86 d (5,5)	144,2	143,8
6a	-	143,6	145,8
6b	-	122,4	121,1

7	-	186,4	179,7
7a	-	115,3	120,2
8	-	163,3	160,9
9	7,09 dd (1,0, 8,0)	116,5	112,6
10	7,79 t (8,0)	136,7	134,3
11	8,17 dd (1,0; 8,0)	117,7	118,8
11a	-	133,1	134,5
11b	-	106,0	106,7
12	6,51 s	103,0	102,5
8-OH	13,64 s	-	
8-OCH ₃	-	-	55,9

^a DMSO-d₆, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz

 $\delta_{\rm C}$ của **SD3** đo trong DMSO-d₆

Dữ liệu phổ 1D- và 2D-NMR của **SD4** tương tự như **SD3** ngoại trừ sự vắng mặt của nhóm methoxy. Dựa trên các dữ liệu phổ NMR và MS kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố [122] có thể xác định được **SD4** là **oxostephanosin (Hình 3.5)**.



Hình 3.5. Cấu trúc của hợp chất SD4

3.1.2.5. Hợp chất SD5

Hợp chất **SD5** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu vàng cam. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 335,9 [M + H]⁺ phù hợp với công thức phân tử C₁₉H₁₃NO₅. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) và ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): Xem **bảng 3.5**.

Vị trí	$\boldsymbol{\delta}_{\mathbf{H}}^{\mathrm{a,b}}$	$\delta c^{a,c}$	${}^{\#}\!\delta_{\mathrm{C}}$	& δ _C
1	-	151,7	152,3	151,3
2	-	146,9	146,9	147,5
3	7,48 s	102,2	102,0	102,7
3a	-	135,1	135,9	134,4
4	7,97 d (5,5)	123,8	123,9	123,0
5	8,75 d (5,5)	144,2	143,3	143,8
6a	-	145,6	144,7	145,8
6b	-	121,3	121,7	121,1
7	-	180,8	180,9	179,7
7a	-	125,4	124,9	120,2
8	-	150,0	150,8	160,9
9	-	153,3	153,4	112,6
10	7,58 d (9,0)	118,1	117,3	134,3
11	8,26 d (9,0)	123,5	123,9	118,8
11a	-	126,0	126,3	134,5
11b	-	106,9	107,9	106,7
12	6,46 s	102,9	102,7	102,5
8-OCH ₃	3,86 s	60,6	61,3	55,9
9-OCH ₃	3,93 s	56,1	56,1	

Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD5 và hợp chất tham khảo

^{*a*} DMSO-*d*₆, ^{*b*} 500 MHz, ^{*c*} 125 MHz

[#] $\delta_{\rm C}$ của oxocrebanin đo trong CDCl₃ [123],

 $\delta_{\rm C}$ của **SD3** đo trong DMSO-d₆

Phổ NMR của **SD5** tương tự như **SD3** ngoại trừ sự xuất hiện thêm của một nhóm methoxy ($\delta_{\rm C}$ 60,6) và sự vắng mặt của nhóm methin. Điều này được thể hiện rõ qua sự thay đổi của vòng D tại các vị trí C-7a (+ 5,2 ppm), C-8 (- 10,9 ppm), C-9 (+ 40,7 ppm), C-10 (- 16,2 ppm) và C-11 (- 4,7 ppm) (**Bảng 3.5**). Vị trí của 2 nhóm methoxy được xác định tại C-8 và C-9 dựa trên tương tác HMBC giữa proton $\delta_{\rm H}$ 3,86, H-10 với C-8 và proton $\delta_{\rm H}$ 3,93, H-10 và H-11 với C-9. Với những phân tích dữ liệu phổ trên và kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố, có thể xác định được hợp chất **SD5** là **oxocrebanin** [123] (**Hình 3.6**).



Hình 3.6. Cấu trúc của hợp chất SD5

3.1.2.6. Hợp chất SD6

Hợp chất **SD6** được phân lập dưới dạng chất kết tinh hình kim, màu vàng. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6) và ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6): Xem **bảng 3.6**.

Vị trí	${\delta_{\mathrm{H}}}^{\mathrm{a,b}}$	$\delta_{\mathrm{C}}^{\mathrm{a,b}}$	$^{\#}\!\delta_{\mathrm{C}}$
1	-	147,1	146,8
2	-	148,8	148,5
3	7,64 s	105,6	105,3
3a	-	119,3	119,1
4	-	168,1	168,1
6a	-	134,7	134,4
6b	-	124,8	124,8
7	7,34 s	97,9	97,8
7a	-	124,0	123,8
8	-	155,3	155,1
9	7,20 d (8,0)	108,3	107,9
10	7,50 t (8,0)	125,7	125,4
11	8,12 d (8,0)	118,7	118,6
11a	-	125,0	124,6
11b	-	111,0	110,8
12	6,47 s	103,2	103,1

Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD6 và hợp chất tham khảo

8-OCH ₃	4,00 s	55,8	55,7
NH	10,73	-	-
" D1 (GO 1	h = 0 0 1 (11 + 0 10 = 1 (1	7	

^a DMSO-d₆, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz

[#] $\delta_{\rm C}$ của aristolactam đo trong DMSO-d₆ [124]

Phổ ¹H-NMR xuất hiện tín hiệu singlet của 1 nhóm methoxy tại $\delta_{\rm H}$ 4,00 (3H, s), 1 nhóm dioxymethylen tại $\delta_{\rm H}$ 6,47 (2H, s), 2 proton olefin singlet tại $\delta_{\rm H}$ 7,64 (1H, s), 7,34 (1H, s), 3 proton olefin cạnh nhau tại $\delta_{\rm H}$ 7,20 (1H, d, J = 8,0 Hz), 7,50 (1H, t, J = 8,0 Hz), 8,12 (1H, d, J = 8,0 Hz) và 1 nhóm NH tại $\delta_{\rm H}$ 10,73 (1H, s). Phổ ¹³C-NMR kết hợp phổ HSQC cho thấy sự xuất hiện của 17 nguyên tử carbon, bao gồm 1 nhóm methoxy [$\delta_{\rm C}$ 55,8 (8-OCH₃)], 1 nhóm dioxymethylen [$\delta_{\rm C}$ 103,2 (C-12)]. Các tín hiệu carbon còn lại thuộc vòng thơm nằm trong vùng trường từ $\delta_{\rm C}$ 97,8 \rightarrow 168,0. Dữ liệu phổ 1D-NMR cho thấy, **SD6** cũng là 1 alcaloid với cấu trúc khung của vòng A, C và D gần tương tự như các hợp chất **SD2 - SD5**. Phân tích phổ HMBC cho thấy tương tác của proton $\delta_{\rm H}$ 4,00 (3H, s), H-9 và H-10 với carbon C-8 cho phép xác định được vị trí của nhóm methoxy tại C-8. Ngoài ra, tương tác giữa proton $\delta_{\rm H}$ 10,73 (1H, s) với C-3^a, C-4, C-6^a và C-6b giúp khẳng định thêm về cấu trúc của vòng B. Với những phân tích dữ liệu như trên và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố, có thể kết luận **SD6** là **aristolactam** [124] (**Hình 3.7**).



Hình 3.7. Cấu trúc và tương tác HMBC chính của hợp chất SD6 3.1.2.7. Hợp chất SD7

Hợp chất **SD7** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu nâu. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 340 [M+H]⁺ phù hợp với công thức phân tử C₂₀H₂₁NO₄. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): Xem **bảng 3.7**.

Vị trí	$\boldsymbol{\delta}_{\mathbf{H}}^{\mathrm{a,b}}$	$\boldsymbol{\delta}_{\mathrm{C}}^{\mathrm{a,c}}$	# δ _C
1	-	142,1	142,0
2	-	146,7	146,5
3	6,51 s	106,8	106,8
3a	-	126,3	126,5
4	3,05 - 3,14 * 2,62 dd (3,5, 16,0)	29,0	29,2
5	3,05 - 3,14 * 2,53 td (3,5, 11,5)	53,5	53,6
6a	3,05 - 3,14 *	61,9	61,9
6b	-	126,4	126,6
7	3,67 dd (4,0, 14,5) 2,31 dd (14,0, 14,5)	26,8	26,9
7a	-	129,7	129,7
8	-	145,9	145,8
9	-	152,1	152,0
10	6,87 d (8,5)	110,4	110,2
11	7,80 d (8,5)	123,1	123,1
11a	-	124,6	124,6
11b	-	116,6	116,5
12	5,90 d (1,5) 6,04 d (1,5)	100,6	100,6
8-OCH ₃	3,81 s	60,7	60,6
9-OCH ₃	3,89 s	55,8	55,7
6-NCH ₃	2,59 s	43,7	43,9

Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD7 và hợp chất tham khảo

^{*a*} CDCl₃, ^{*b*} 500 MHz, ^{*c*} 125 MHz, * tín hiệu bị chồng chập ${}^{\#}\delta_{\rm C}$ của crebanin đo trong CDCl₃ [123].

Phổ ¹H-NMR xuất hiện tín hiệu singlet của 2 nhóm methoxy tại $\delta_{\rm H}$ 3,81 (3H, s) và 3,89 (3H, s), một nhóm methyl liên kết với nitơ tại $\delta_{\rm H}$ 2,59 (3H, s); 3 nhóm methylen ở vùng trường cao tại $\delta_{\rm H}$ 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 $\delta_{\rm H}$ 3,05 - 3,14 (1H); 1 nhóm dioxymethylen (-OCH₂O-) tại $\delta_{\rm H}$ 5,90 (1H, d, J = 1,5 Hz) và 6,04 (1H, d, J = 1,5 Hz); 1 proton olefin ở dạng singlet tại $\delta_{\rm H}$ 6,51 (1H, s) và hai proton olefin cạnh nhau tại $\delta_{\rm H}$ 6,87 (1H, d, J = 8,5 Hz) và 7,80 (1H, d, J = 8,5 Hz).

Phổ ¹³C-NMR kết hợp phổ HSQC cho thấy tín hiệu của 20 carbon, trong đó có bốn nhóm methylen [δ_C 29,0 (C-4), 53,5 (C-5), 26,8 (C-7) và 100,6 (C-12)], một nhóm methin [δ_C 61,9 (C-6a)], hai nhóm methoxy [δ_C 60,7 (8-OCH₃) và 55,8 (9-OCH₃)], một nhóm methyl liên kết trực tiếp với nitơ [δ_C 43,7 (>N-CH₃)]. Từ những dữ liệu này cho thấy, **SD7** là một alcaloid có cấu trúc khung gần tương tự như các hợp chất **SD2-SD5**. Vị trí của nhóm methoxy cũng được xác định thông qua tương tác HMBC giữa proton δ_H 2,59 (3H, s) tương tác với C-5 và C-6a cho phép xác định được nhóm methyl liên kết trực tiếp với nguyên tử nitơ. Hai nhóm methoxy cũng được xác định được vị trí thế vào C-8 và C-9 do xuất hiện tương tác giữa các nhóm methoxy lên hai vị trí tương ứng cũng như sự tương tác giữa H-11 với C-7a/ C-9/ C-11b và giữa H-10 với C-8/ C-9/ C-11a.

So sánh với tài liệu tham khảo đã công bố, giá trị proton và carbon tại các vị trí đều tương đồng với hợp chất crebanin (**Bảng 3.7**). Kết hợp với những giá trị phân tích phổ trên có thể xác định được hợp chất **SD7** là **crebanin [123]** (**Hình 3.8**).



Hình 3.8. Cấu trúc của hợp chất SD7

3.1.2.8. Hợp chất SD8

Hợp chất **SD8** thu được dưới dạng bột màu nâu đỏ. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 359,9 [M+Na]⁺ phù hợp với công thức phân tử C₂₀H₁₉NO₄. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): Xem **bảng 3.8**.

Vị trí	${oldsymbol{\delta}}_{ ext{H}}{}^{ ext{a,c}}$	$\delta c^{a,b}$	$^{\#} \delta_{\mathrm{C}}$	[«] δ _C
1	-	141,7	141,6	142,1
2	-	145,2	145,1	146,6
3	6,87 s	106,8	106,7	106,8
3a	-	127,4	127,5	126,2
4	3,21 t (6,0)	30,7	30,8	28,9
5	3,27 t (6,0)	50,6	50,5	53,5
6a	-	143,9	144,1	61,8
6b	-	118,3	118,3	126,4
7	6,88 s	106,8	106,7	26,7
7a	-	129,4	129,5	129,6
8	-	141,7	141,6	145,9
9	-	150,2	150,2	152,0
10	7,01 d (9,0)	108,8	108,5	110,3
11	8,64 d (9,0)	123,4	123,4	123,1
11a	-	118,8	118,6	124,6
11b	-	117,5	117,4	116,5
12	6,18 s	100,9	100,8	100,6
8-OCH ₃	3,97 s	60,6	60,5	60,7
9-OCH ₃	3,98 s	56,2	56,2	55,7
6-NCH ₃	3,12 s	40,6	40,5	43,7

Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD8 và hợp chất tham khảo

^a CDCl₃, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz

 $^{\#}\delta_{\rm C}$ của dehydrocrebanin đo trong CDCl₃

 $^{\&}\delta_{C}$ của **SD7** đo trong CDCl₃ [123]

Dữ liệu phổ NMR cho thấy, **SD8** tương tự như **SD7** ngoại trừ cấu trúc của vòng C với sự thay đổi lớn về độ chuyển dịch hóa học của C-6a (- 82,1 ppm), C-6b (+ 8,1 ppm), C-7 (- 80,1 ppm) và C-11a (+ 5,8 ppm). Phổ ¹³C-NMR và HSQC cho thấy sự xuất hiện nhóm -CH=C< (δ_C 106,8 và 143,9) trong vòng C thay vì nhóm methin và methylen như trong cấu trúc của **SD7**. Điều này cũng được quan sát trên phổ ¹H-NMR với sự xuất hiện của proton olefinic tại δ_H 6,88 (s). Phổ

HMBC cũng cho thấy sự tương tác của proton này với C-6b, C-11a và C-8. Với những phân tích dữ liệu như trên và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố, có thể xác định được hợp chất **SD8** là **dehydrocrebanin** [123] (Hình 3.9).



Hình 3.9. Cấu trúc của hợp chất SD8

3.1.2.9. Hợp chất SD9

Hợp chất **SD9** được phân lập từ dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 120,8 [M-H]⁻ phù hợp với công thức phân tử là C₇H₆O₂. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): Xem **bảng 3.9**.

Vị trí	$oldsymbol{\delta}_{ ext{H}}^{ ext{a,b}}$	$\boldsymbol{\delta} \mathbf{c}^{\mathrm{a,c}}$	$^{\#}\!\delta_{\mathrm{C}}$
1	-	130,0	130,3
2, 6	7,79 d (9,0)	133,5	133,5
3, 5	6,92 d (9,0)	117,1	116,9
4	-	165,8	165,2
7	9,77 s	192,8	192,9

Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR (δ ppm) của SD9 và hợp chất tham khảo

^a CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz

[#] $\delta_{\rm C}$ của 4-hydroxybenzaldehyd đo trong CD₃OD [125]

Phổ ¹H-NMR xuất hiện hai cặp tín hiệu proton olefin tại $\delta_{\rm H}$ 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 thom dạng AA'BB'. Ngoài ra, phổ proton cũng xuất hiện tín hiệu của nhóm aldehyd tại $\delta_{\rm H}$ 9,77 (1H, s, H-7). Phổ ¹³C-NMR và DEPT cho thấy tín hiệu cuả 7 carbon, trong đó 6 carbon của vòng thom tại $\delta_{\rm C}$ 130,0 (C-1), 133,4 (C-2, C-6), 117,0 (C-3, C-5) và 165,7 (C-4). Tín hiệu tại $\delta_{\rm C}$ 192,7 (C-7) đặc trưng cho nhóm aldehyd.

Với những phân tích dữ liệu phổ trên và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố, có thể xác định **SD9** là **4-hydroxybenzaldehyd** [125] (**Hình 3.10**).



Hình 3.10. Cấu trúc của hợp chất SD9

3.1.2.10. Hợp chất SD10

Hợp chất **SD10** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 292,9 [M+Na]⁺ phù hợp với công thức phân tử C₁₃H₁₈O₆. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): Xem **bảng 3.10**.

		,		?								,		
D ?	2 10	C ^	1• ^	. 1. ^		18		. ? .	0010	•	1	1. 4	41	11.2.
Kana	× 111	NO.	11611	nho		10	nnm	CII 9	<u>NININ</u>	VQ	nn	chat	tham	k hau
Dane	J.1U.	NU.	nu	DIIO	T ATATIV	ιv	NNIII /	ua	NDIV	v a	nvp	unau	unam	nnav
			•	1		•	11 /				• 1			

Vị trí	$\delta_{\mathrm{H}}^{\mathrm{a,b}}$	$\boldsymbol{\delta}^{\mathrm{c}^{\mathrm{a,c}}}$	# δ C
1	-	139,0	139,1
2, 6	7,41 m	129,2	129,3
3, 5	7,31 m	129,1	129,2
4	7,26 m	128,6	128,6
7	4,66 d (12,0)	717	71.8
/	4,92 d (12,0)	/1,/	/1,0
1′	4,35 d (8,0)	103,2	103,3
2'		75,1	75,1
3'	3,23-3,30 m	77,9	78,1
4'		71,6	71,7
5'	3,34 m	78,0	78,1
6'	3,69 dd (6,0, 12,0)	62.8	67.8
0	3,89 dd (2,5, 12,0)	02,8	02,8

^a CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz

[#] δ_C của benzyl β -D-glucopyranosid đo trong CD₃OD [126]

Phổ ¹H-NMR xuất hiện tín hiệu của 5 proton thơm tại $\delta_{\rm H}$ 7,41 (2H, m, H-2, H-6), 7,31 (2H, m, H-3, H-5) và 7,26 (1H, m, H-4) gọi 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 $\delta_{\rm H}$ 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 [$\delta_{\rm H}$ 4,35 (1H, d, J = 8,0 Hz)], proton nhóm hydroxymethylen [$\delta_{\rm H}$ 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 [$\delta_{\rm H}$ 3,23 – 3,34 (4H, m)]. Phổ ¹³C-NMR cho thấy tín hiệu của 13 carbon trong đó 6 carbon của gốc đường β-D-glucopyranosyl [$\delta_{\rm C}$ 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' ($\delta_{\rm H}$ 4,35) với C-7 ($\delta_{\rm C}$ 71,7). Với những phân tích dữ liệu phổ trên và so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố, có thể xác định hợp chất **SD10** là **benzyl β-Dglucopyranosid** [126] (**Hình 3.11**).



Hình 3.11. Cấu trúc của hợp chất SD10

3.1.2.11. Hợp chất SD11

Hợp chất **SD11** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 409 [M+Na]⁺ phù hợp với công thức phân tử C₁₉H₃₀O₈. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): Xem **bảng 3.11**.

Vị trí	$\boldsymbol{\delta}_{\mathbf{H}^{\mathrm{a,b}}}(J=\mathrm{Hz})$	$\boldsymbol{\delta} c^{a,c}$	$^{\#}\delta_{\rm C}$	${}^{\&}\delta_{\mathrm{C}}$	$^{\$}\!\delta_{ m C}$	${}^{@}\!\delta_{\mathrm{C}}$
1	-	42,4	42,5	42,5	42,5	42,4
2	2,18 m/2,61 m	50,7	50,7	50,8	50,8	50,7
3	-	201,2	201,2	210,3	201,3	201,1
4	5,89 br s	127,1	127,2	127,1	127,2	127,2

5	-	167,0	167,3	167,4	167,2	166,9
6	-	80,0	80,0	80,0	80,1	80,0
7	6,99 d (15,5)	133,7	131,6	131,7	134,7	134,1
8	5,75 d (15,5)	133,7	135,3	135,1	133,8	133,8
9	4,55 m	74,6	77,3	76,9	74,7	74,7
10	1,31 d (6,5)	22,2	21,22	21,2	22,3	22,2
11	1,06 s	23,4	23,5	23,4	23,5	23,5
12	1,03 s	24,7	24,7	24,6	24,7	24,8
13	1,96 d (1,5)	19,5	19,6	19,7	19,6	19,4
1′	4,29 d (7,5)	101,2	102,8	102,6	100,3	100,9
2'	3,21 t (8,0)	74,9	75,3	75,2	75,0	75,0
3'	3,25-3,30 m	78,3	78,2	78,0	78,4	78,3
4'	3,25-3,30 m	71,6	71,7	71,5	71,7	71,8
5'	3,17 m	78,1	78,1	78,0	78,3	78,1
6'	3,66 dd (6,0, 11,5) 3,87 dd (2,0, 11,5)	62,8	62,9	62,6	62,9	62,9

^a CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz

[#] $\delta_{\rm C}$ của (6S,9R)-roseosid, [&] $\delta_{\rm C}$ của (6R,9R)-roseosid, ^{\$} $\delta_{\rm C}$ của (6S,9S)roseosid và [@] $\delta_{\rm C}$ của (6R,9S)-roseosid đo trong CD₃OD [127]

Phổ ¹H-NMR của hợp chất **SD11** xuất hiện tín hiệu của một proton olefin dạng C=CH tại $\delta_{\rm H}$ 5,89 (1H, br s, H-4) và một nối đôi khác thế hai lần (CH=CH) dạng *trans* tại $\delta_{\rm H}$ 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 [$\delta_{\rm H}$ 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 [$\delta_{\rm H}$ 1,31 (3H, d, J = 6,5 Hz, H-10)]; 1 nhóm methylen [$\delta_{\rm H}$ 2,18 (1H, m, H-2a)/2,61 (1H, m, H-2b)]; 1 nhóm oxymethin [$\delta_{\rm H}$ 4,55 (1H, t, J = 6,8 Hz, H-9)]. Ngoài ra, phổ ¹H-NMR còn xuất hiện tín hiệu của một proton anomeric tại $\delta_{\rm H}$ 4,29 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-1'), 2 proton hydroxymethylen tại $\delta_{\rm H}$ 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 phần đường cùng với hằng số tương tác lớn của proton anomeric H-1'/H-2' ($J_{1'-2'} = 7,5$ Hz) gọi ý gốc đường là O- β -D-glucopyranosyl.

Phổ ¹³C-NMR và HSQC của hợp chất **SD11** 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.

Phân tích phổ HMBC của **SD11** 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 phần đường tại C-9.

Cấu hình 6*R*, 9*S* được xác định dựa trên độ chuyển dịch hóa học của carbon tại các vị trí C-7, C-8 và C-9 (**Bảng 3.11**). Từ các phân tích trên kết hợp so sánh số liệu phổ NMR với hợp chất (6*R*,9*S*)-roseosid đã được công bố trước đó [127], có thể khẳng định **SD11** là (6*R*,9*S*)-roseosid (Hình 3.12).





Như vậy từ thân lá cây củ dòm đã chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của 11 hợp chất. Thông tin cơ bản của các hợp chất này được tóm tắt trong **bảng 3.12.**

STT	Tên hợp chất	CTPT – KLPT	Cấu trúc hoá học
1	Stedieltin A (SD1)	$C_{19}H_{15}NO_6$ M = 353,0899	
			OCH3
2	Stedieltin B (SD2)	$C_{17}H_{11}NO_4$ M = 293,0688	O O O C O C H ₃
3	Oxostephanin (SD3)	C ₁₈ H ₁₁ NO ₄ M =305	O O O O O O O O O O O O O O
4	Oxostephanosin (SD4)	C ₁₇ H9NO4 M = 291	
5	Oxocrebanin (SD5)	$C_{19}H_{13}NO_5$ M = 335	O O O O O O O O O O O O O O
6	Aristolactam (SD6)	$C_{17}H_{11}NO_4$ M = 293	O O O NH O O CH ₃

Bảng 3.12. Các hợp chất phân lập được từ thân lá cây củ dòm

7	Crebanin (SD7)	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	
		M = 339	N ^N CH ₃
			OCH3
			OCH₃
8	Dehydrocrebanin	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	
	(SD8)	M = 337	N°.CH3
			OCH3
			ÓCH ₃
9	4-hydroxy	$C_7H_6O_2$	° ∀ H
	benzaldehyd (SD9)	M = 122	
			о́н
10	Benzyl β -D-	$C_{13}H_{18}O_{6}$	HOOO
	glucopyranosid	M = 270	но но он
	(SD10)		
11	(6R,9S)-roseosid	C19H30O8	
	(SD11)	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

3.2.1.1. Phân lập oxostephanin

Nguyên liệu là thân lá cây củ dòm khô (hàm ẩm 5,6%) (5 kg) được nghiền nhỏ và đem ngâm chiết với MeOH (35 lít) ở nhiệt độ phòng, sau 3 ngày tách dịch chiết ra, cô cạn trên máy cất chân không thu được cắn MeOH. Tiến hành lặp lại thêm hai lần chiết với dùng dung môi trên thì thu được cắn MeOH, ký hiệu là M (0,45 kg, hiệu suất 9,0% so với khối lượng nguyên liệu thân lá củ dòm khô).

Phân bố cắn M trên với 5 lít nước cất, thêm HCl 10% đến môi trường acid với pH 4-5. Chiết phân bố dịch acid này 3 lần với dung môi ethyl acetat (tỷ lệ 1:1, v/v), tách và loại bỏ phần dịch chiết ethyl acetat. Thu gom phần dịch chiết nước rồi cất loại dung môi ethyl acetat còn tồn dư dưới áp suất giảm 70 kPa, nhiệt độ 50°C, thu được dịch nước trong môi trường acid, ký hiệu là Wa.

Dịch chiết nước Wa tiếp tục được trung hòa về môi trường kiềm tương đương pH 9-10 sử dụng NH4OH. Tiến hành chiết phân bố dịch nước trong môi trường kiềm hóa (ký hiệu là Wk) 3 lần bằng dung môi petroleum ether, tách và loại bỏ phần dịch chiết petroleum ether, tiếp tục thu gom phần chiết dịch nước Wk, sau đó chiết phân bố tiếp phần dịch nước thu được 3 lần với dung môi chloroform, tách và cất loại bỏ phần dịch chiết chloroform. Thu gom phần dịch chiết Wk rồi cất loại dung môi chloroform còn tồn dư sau khi chiết phân bố chloroform. Dịch chiết Wk đã được cất loại hết phần dung môi ethyl acetat, tách và loại bỏ dung môi ethyl acetat, thu được cắn ethyl acetat (45,0 g, hiệu suất 0,90% so với khối lượng nguyên liệu thân lá củ dòm khô). Đây là cắn chứa nhóm chất alcaloid đã được làm giàu và ký hiệu là Ek.

Tiến hành chiết phân bố cắn Ek lặp lại 3 lần bằng hỗn hợp dung môi MeOH và *n*-hexan (tỷ lệ 85:15, 75:25, 65:35 v/v), gom các phân đoạn chiết phân bố trên, cất thu hồi dung môi được một cắn làm giàu oxostephanin (31,0 g, hiệu suất 0,62% so với khối lượng nguyên liệu thân lá củ dòm khô), ký hiệu là EkO. Cuối cùng, tinh chế hợp chất oxostephanin từ phân đoạn được làm giàu EkO bằng cách kết tinh lại nhiều lần sản phẩm thô làm giàu trên trong hỗn hợp MeOH và EtOH (tỷ lệ 1:2 v/v) thu được 4,0 g sản phẩm tinh khiết dưới dạng bột màu vàng cam vô định hình, cô quay chân không trong 2-3h, đóng lọ bảo quản.

Quy trình phân lập oxostephanin được trình bày trong hình 3.13.



Hình 3.13. Quy trình phân lập oxostephanin

3.2.1.2. Sơ bộ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin

Độ tinh khiết của oxostephanin được đánh giá thông qua phần trăm diện tích pic trên sắc ký đồ khi chạy HPLC với một số hệ dung môi khác nhau.

Các điều kiện sắc ký được sử dụng bao gồm:

- 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
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng
- Pha động
 - + Pha động A: MeOH : acid formic 0,1% (tỷ lệ 35:65, v/v)
 - + **Pha động B**: ACN: H₂O (tỷ lệ 80:20, v/v)
 - + Pha động C: Kênh A: ACN (0.1% acid formic, v/v), kênh B: H₂O (0.1% acid formic, v/v) với gradient nồng độ được thiết lập như bảng 3.13.

Thời gian (min)	Kênh A (%)	Kênh B (%)
0	95	5
12	95	5
13	100	0
16	100	0
17	95	5
20	95	5

Bảng 3.13. Gradient nồng độ pha động C

Kết quả được trình bày trong bảng 3.14 và hình 3.14.

Bảng 3.14. Tỷ lệ (%) diện tích pic của oxostephanin khi chạy HPLC bằng các pha động khác nhau

	Thời gian lưu (phút)	Tỷ lệ diện tích pic (%)
Pha động A	14,261	98,641
Pha động B	21,740	99,742
Pha động C	8,838	98,556

Như vậy 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.



Hình 3.14. Sắc ký đồ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin

A: pha động A (% S pic oxostephanin = 98,641)

B: pha động B (% S pic oxostephanin = 99,742)

C: pha động C (% S pic oxostephanin = 98,556)

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

3.2.2.1. Xây dựng phương pháp định lượng

* Khảo sát bước sóng phát hiện

Quét phổ hấp thụ tử ngoại của dung dịch chuẩn oxostephanin thu được kết quả như **hình 3.15**.

Phổ hấp thụ của dung dịch chuẩn oxostephanin có các điểm cực đại là 256 nm, 287 nm, 374 nm và 478 nm. Nhìn vào phổ hấp thụ có thể thấy ngoài bước sóng ở tử ngoại xa thì tại bước sóng 256 nm cho tín hiệu cao nhất. Theo Dược điển Việt Nam V [128] quy định $\lambda_{max} \pm 2$ nm, do đó đề tài lựa chọn giữ nguyên bước sóng phát hiện so với các công bố trước đây [12], [13] là 254 nm.



Hình 3.15. Phổ hấp thụ tử ngoại của oxostephanin

Khảo sát pha động

Kết quả các **hình 3.14** cho thấy tuy pha động C (gồm kênh A: ACN (0,1% acid formic v/v), kênh B: H₂O (0,1% acid formic, v/v) với gradient nồng độ) cho thời gian lưu của oxostephanin tương đối ngắn hơn so với hai pha động còn lại, giúp giảm thời gian phân tích, song sử dụng gradient nồng độ phức tạp hơn so với chế độ đẳng dòng. Pha động A gồm MeOH : acid formic 0,1% (tỷ lệ 35:65, v/v) cho sắc ký đồ cân đối, thời gian lưu (khoảng 14 phút) hợp lý hơn so với khi chạy pha động B (khoảng 21 phút); đồng thời trong mẫu dung dịch thử pic của oxostephanin đã tách hoàn toàn ra khỏi pic tạp với Rs > 1,5 (**hình 3.16**).

Do đó luận án lựa chọn pha động A gồm MeOH : acid formic 0,1% (tỷ lệ 35:65, v/v) cho các nghiên cứu tiếp theo.

Từ các khảo sát trên, 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)



formic 0,1% (tỷ lệ 35:65, v/v))

* Khảo sát quá trình xử lý mẫu

- * Khảo sát số lần chiết
 - Khảo sát hàm lượng oxostephanin sau các lần với dung môi là MeOH và sử dụng sóng siêu âm để hỗ trợ chiết.
 - Số lần khảo sát: 1 lần, 2 lần, 3 lần, 4 lần.
 - Thời gian chiết mỗi lần: 1 giờ.
 - Lượng dược liệu cân chính xác khoảng: 0,50 g
 - Lượng dung môi chiết mỗi lần: 50 ml, sau mỗi lần chiết lọc dịch chiết vào bình 50 ml và làm đầy bằng MeOH.

Kết quả khảo sát được trình bày trong bảng 3.15.

Dung errer qui ninue sur se nin errer					
Diện tích pic (mAU.s)					
2320696					
524905					
ND*					
ND*					

	,				,	•	,
D?	TZA	. ?	11.2.			14 .	1. • • • •
Kang vis	Кег	กแจ	k nau	C 9 T	SU	lan	cnier
Danz 5.15.	INCU	yua	Maav	Sau	30	1411	UNICU

*ND: không xác định được diện tích pic

Để xác định sự có mặt của oxostephanin trong lần chiết thứ 3 và thứ 4, tiến hành cô riêng biệt tạo cắn 2 dịch chiết trên, sau đó cắn thu được hoà tan trở lại trong 500 μ l MeOH, lọc và đem định lượng, từ đó tính được lượng oxostephanin trong dịch chiết lần 3 và lần 4 và hàm lượng của nó còn tồn lại trong bã chiết. Kết quả thu được ở **bảng 3.16.**

Số lần chiết	Hàm lượng (%) tính	Tổng hàm lượng sau các	
So fair chiet	trên dược liệu	lần chiết được (%)	
Lần 1	$0,347 \pm 0,013$	0,347	
Lần 2	$0,076 \pm 0,003$	0,423	
Lần 3	$0,033 \pm 0,001$	0,456	
Lần 4	$0,006 \pm 0,002$	0,462	

Bảng 3.16. Kết quả hàm lượng oxostephanin trong dược liệu thu được qua các lần chiết

Kết quả cho thấy sau 3 lần chiết đã chiết kiệt được oxostephanin trong dược liệu. Luận án lựa chọn số lần chiết là 3 lần cho các nghiên cứu tiếp theo. Từ khảo sát trên cho thấy tổng lượng dung môi dùng để chiết tối thiểu là 100 ml methanol với chính xác khoảng 0,50000 g thân lá củ dòm (tương đương tỷ lệ dung môi/dược liệu (ml/g) là 200:1).

* Khảo sát tỷ lệ dung môi/ dược liệu

- Khảo sát lượng oxostephanin chiết được với các lượng dung môi khác nhau.
- Dung môi chiết là MeOH, số lần chiết 3 lần, mỗi lần 1 giờ.
- Tổng lượng dung môi khảo sát: 25 ml/0,25 g dược liệu; 50 ml/0,25 g dược liệu, 100 ml/0,25 g dược liệu.

Kết quả khảo sát được thể hiện trong bảng 3.17.

Bảng 3.17. Kết quả hàm lượng oxostephanin với lượng dung môi khác nhau

Tổng lượng dung môi	Tỷ lệ dung môi/ dược	Hàm lượng (%)	
chiết (ml)	liệu (ml/mg)		
25	100 : 1	$0,362 \pm 0,006$	
50	200:1	$0,423 \pm 0,001$	
100	400:1	$0,\!425 \pm 0,\!002$	

Hàm lượng oxostephanin khi chiết tỉ lệ dung môi/ dược liệu (ml/g) là 200 : 1 và 400 : 1, hàm lượng oxostephanin chiết được cao hơn đáng kể so với 100 : 1. Điều này chứng tỏ với tỷ lệ 100 : 1 oxostephanin vẫn chưa được chiết kiệt. So sánh tỷ lệ 200 : 1 và 400 : 1 hàm lượng oxostephanin chiết được không nhiều sự khác biệt. Như vậy đề tài lựa chọn tổng lượng dung môi chiết/ dược liệu là 200 : 1 (ml/g) cho các nghiên cứu tiếp theo.

* Khảo sát thời gian chiết

- Khảo sát lượng oxostephanin chiết được theo thời gian, với cùng lượng dung môi và số lần chiết.
- 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/ dược liệu: 200 : 1
- Thời gian chiết mỗi lần: 20 phút; 40 phút; 60 phút; 80 phút (tổng thời gian chiết: 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ).
- Lượng cân chính xác khoảng 0,25g.

Kết quả khảo sát được thể hiện trong bảng 3.18.

Thời gian chiết mỗi lần	Tổng thời gian chiết	Hàm lượng trung bình (%)
20 phút	1 giờ	$0,321 \pm 0,005$
40 phút	2 giờ	$0,370 \pm 0,029$
60 phút	3 giờ	$0,442 \pm 0,013$
80 phút	4 giờ	$0,443 \pm 0,021$

Bảng 3.18. Kết quả khảo sát thời gian chiết

Qua khảo sát thời gian chiết nhận thấy sau 3 lần chiết với thời gian chiết là 60 phút/ lần đã chiết kiệt được oxostephanin trong dược liệu. Luận án lựa chọn thời gian chiết là 1 giờ/ lần (tổng thời gian chiết 3 giờ) cho các nghiên cứu tiếp theo.

Như vậy 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/ dược liệu: 200 : 1

- Thời gian chiết mỗi lần: 1 giờ

3.2.2.2. Thẩm định phương pháp định lượng oxostephanin bằng HPLC * Độ phù hợp hệ thống

Kết quả độ phù hợp hệ thống khi tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn oxostephanin với nồng độ khoảng 25 μ g/ml được thể hiện ở **Bảng 3.19.**

стт	Thời gian lưu	Diện tích pic	Số đĩa	Hệ số đối
511	(phút)	(mAU.s)	lý thuyết	xứng
1	14,11	1214153	4235	1,442
2	14,15	1219037	4247	1,444
3	14,33	1215144	4246	1,442
4	14,32	1227682	4253	1,446
5	14,31	1240081	4252	1,448
6	6 14,30		4246	1,450
Trung bình	14,25	1223929	4247	1,445
RSD (%)	0,68	0,80	0,2	0,2

Bảng 3.19. Kết quả độ phù hợp hệ thống

RSD thời gian lưu và diện tích pic của oxostephanin thấp hơn 2,0%. Số đĩa lý thuyết trung bình của oxostephanin khoảng 4247 (> 3000). Điều kiện sắc ký lựa chọn có độ lặp lại tốt về thời gian lưu, diện tích pic, số đĩa lý thuyết và hệ thống HPLC sử dụng phù hợp và đảm bảo để phân tích định lượng oxostephanin, do đó phương pháp đạt về độ phù hợp hệ thống theo AOAC và "Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích" [107].

* Độ đặc hiệu

Chuẩn bị độc lập các mẫu dung môi, các mẫu chuẩn, mẫu thử và các mẫu thử thêm chuẩn (như trình bày ở mục 2.2.2.2). Tiến hành sắc ký trong điều kiện đã chọn. Kết quả được trình bày ở **hình 3.17.**

Oxostephanin được tách hoàn toàn khỏi chất khác trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch thử từ thân lá củ dòm. Thời gian lưu của pic oxostephanin trên sắc ký đồ mẫu thử tương tự như thời gian lưu của pic chuẩn tương ứng trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Trên sắc ký đồ dung dịch thử, pic của oxostephanin

được tách hoàn toàn khỏi các pic khác. Như vậy, phương pháp đủ đặc hiệu để định lượng oxostephanin trong thân lá cây củ dòm



Hình 3.17. Sắc ký đồ thẩm định độ đặc hiệu

Chú thích:

Data 1: SKĐ mẫu trắng

- Data 3: SKĐ dung dịch thử
- Data 2: SKĐ oxostephanin chuẩn Data 4: SKĐ dung dịch thử thêm chuẩn

* Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Tiến hành sắc ký dãy dung dịch chuẩn (chuẩn bị như trình bày ở mục 2.2.2.2) theo điều kiện sắc ký đã chọn. Kết quả được thể hiện trong **bảng 3.20 và hình 3.18.**

STT	Nồng độ (µg/ml)	S (mAu.s)	Độ chệch (%)	
1	3,125 272443		11,54	
2	6,25	418469	6,18	
3	12,5	696245	0,24	
4	25	1214153	-6,12	
5	50	2506725	0,58	
6	100	4900220	0,20	
	y = 48390x + 65108			
	$R^2 = 0,9993$			

Bảng 3.20. Kết quả khảo sát độ tuyến tính



Hình 3.18. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ của oxostephanin

Trong khoảng nồng độ khảo sát đã có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của oxostephanin. Đường chuẩn của oxostephanin có hệ số tương quan $0,995 \le R \le 1$, độ chệch (bias) tại các điểm đều không quá $\pm 15\%$. Như vậy độ tuyến tính của oxostephanin phù hợp với yêu cầu của "Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích" và AOAC.

* Độ lặp lại

Chuẩn bị các mẫu thử như mục 2.2.2.2. Tiến hành sắc ký, mỗi ngày 6 mẫu thử độc lập kết quả thẩm định độ lặp lại giữa các ngày phân tích được thể hiện ở **Bảng 3.21.**

Ngày	STT	Lượng cân dược liệu (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
	1	0,5001	1424964	0,281		
1	2	0,5002	1444767	0,285	0.285	16
1	3	0,5007	1475847	0,291	0,205	1,0
	4	0,5001	1465971	0,289		

Bảng 3.21. Kết quả độ lặp lại giữa các ngày phân tích

	5	0,5003	1447025	0,286		
	6	0,5001	1414563	0,279		
	1	0,5001	1424964	0,281		
	2	0.5002	1444767	0,285		1,0
2	3	0,5005	1447125	0,280	0.282	
<u> </u>	4	0,5001	1414563	0,280	0,282	
	5	0,4999	1414231	0,280		
3	6	0,5001	1414565	0,286	0,283	1,7
	1	0,5071	1424964	0,281		
	2	0,5022	1455390	0,287		
	3	0,5032	1409751	0,278		
	4	0,5074	1407767	0,277		
	5	0,5018	1450319	0,286		
	6	0,5041	1460461	0,288		
Trung bình 3 ngày					0,283	1,4

RSD của oxostephanin trong cùng ngày, khác ngày phân tích đều thỏa mãn yêu cầu: RSD của oxostephanin \leq 3,7%. Phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác theo yêu cầu của "Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích" và AOAC.

* Độ đúng

Mẫu thân lá cây củ dòm có nồng độ oxostephanin 28,02µg/ml. Chuẩn bị các mẫu thử thêm chuẩn như mục 2.2.2.2. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn. Kết quả độ thu hồi của oxostephanin trình bày ở **bảng 3.22**.

Kết quả thỏa mãn yêu cầu phần trăm tìm lại của oxostephanin từ 95,0 % – 105,0 %. Phương pháp đã xây dựng đạt yêu cầu về độ đúng của "Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích" và AOAC.
Mức thêm chuẩn	M _{dược} liệu (g)	Nồng độ thực của được liệu (µg/ml)	Nồng độ chuẩn thêm vào (µg/ml)	Nồng độ mẫu khi thêm chuẩn (µg/ml)	Nồng độ chuẩn tìm lại được (µg/ml)	Độ thu hồi (%)	Trung bình (%)
80%	0,5001 0,5002 0,5001	28,02	22,0	49,88 49,92 49,90	21,86 21,90 21,88	99,36 99,55 99,45	99,45
100%	0,5001 0,5002 0,5001	28,02	28,0	55,46 55,68 55,48	27.44 27,66 27,46	98,00 98,79 98,07	98,29
120%	0,5001 0,5002 0,5001	28,02	33,0	60,88 60,90 60,86	32,86 32,88 32,84	99,56 99,64 99,52	99,57

Bảng 3.22. Kết quả độ thu hồi của oxostephanin

* Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)





Mẫu chuẩn với nồng độ oxostephanin được pha loãng dần đến khi trên sắc kí đồ tại thời điểm quan sát thấy tỷ lệ S/N trong khoảng 2 - 11. Từ đó, xác định

giá trị của LOD và LOQ. Mỗi mẫu lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình. Kết quả cho thấy dung dịch có nồng độ 0,002441 µg/ml cho đáp ứng pic gấp khoảng 3 lần so với độ nhiễu đường nền (**hình 3.19**). LOQ được tính toán dự kiến gấp 3 lần LOD là 0,007323 µg/ml. Từ thực nghiệm, dung dịch có nồng độ 0,0079 µg/ml cho đáp ứng pic gấp khoảng 10 lần so với độ nhiễu đường nền.

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

Ứng dụng phương pháp đã thẩm định để định lượng oxostephanin có trong dược liệu được thu hái ở các thời điểm khác nhau tại Bắc Giang và các mẫu được thu hái từ Quản Bạ - Hà Giang, Ba Vì – Hà Nội.

Kết quả định lượng oxostephanin trong dược liệu được thể hiện trong bảng **3.23** và bảng **3.24**.

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

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

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 dòm. 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 %.

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.

Ký hiệu	Địa điểm	Thời gian thu hái	Hàm lượng trung bình (%)	RSD (%)
QB – phần lá	Quản Bạ - Hà Giang	3/2019	0,320	1,7
QB – phần thân	Quản Bạ - Hà Giang	3/2019	0,004	2,5
BV – phần lá	Ba Vì – Hà Nội	3/2019	0,340	2,2
BV – phần thân	Ba Vì – Hà Nội	3/2019	0,008	1,9
BV1	Ba Vì – Hà Nội	5/2020	0,556	2,3
BV2	Ba Vì – Hà Nội	10/2020	0,553	3,4

Bảng 3.24. Đánh giá hàm lượng oxostephanin trong một số mẫu thân lá củ dòm thu hái tại Quản Bạ - Hà Giang và vườn giống Ba Vì - Hà Nội

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 3.3.1.1. Ảnh hưởng của các hợp chất SD1, SD2, SD3, SD4, SD5 tới hình thái tế bào

Sự biến đổi hình thái đặc trưng của tế bào là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá độc tính của các chất lên các tế bào ung thư nuôi cấy.

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của dung môi 0,5% DMSO đến hình thái tế bào được thể hiện trong các **hình 3.20 – 3.24** trong đó (a) Tế bào đối chứng sinh học; (b) Tế bào trong dung môi 0,5% DMSO tại thời điểm 48h (VK 10X, Zoom 5.6))



Hình 3.20. Hình thái tế bào Hela



Hình 3.21. Hình thái tế bào HepG2



Hình 3.22. Hình thái tế bào MCF7



Hình 3.23. Hình thái tế bào N87



Hình 3.24. Hình thái tế bào OVCAR-8

Từ hình ảnh thu được có thể nhận thấy được hình dạng đặc trưng của năm dòng tế bào HeLa, HepG2, OVCAR-8, MCF7, N87 ở giếng đối chứng và đối chứng dung môi đều có trạng thái bám dính chắc chấn, mật độ che phủ tế bào phù hợp. Hình ảnh cũng cho thấy không có sự khác biệt về hình thái tế bào giữa 2 giếng hình (*a*) tế bào đối chứng sinh học và tế bào được xử lý với môi trường 0,5% DMSO hình (*b*). Kết quả định lượng tế bào cũng thu được mật độ tế bào tại giếng bổ sung dung môi đều > 95% so với giếng đối chứng sinh học. Điều này chứng tỏ môi trường chứa 0,5% DMSO (dung môi pha thuốc) không có tác động đáng kể nào lên tế bào nuôi cấy. Kết quả này đảm bảo đạt chuẩn là cơ sở để so sánh với hình thái tế bào ở các giếng thí nghiệm. Kết quả tác động gây độc của các hợp chất lên hình thái các dòng tế bào ở các nồng độ chất thử khác nhau được thể hiện trong **hình 3.25.**

Với dòng tế bào Hela, hợp chất **SD3** là có tác dụng gây độc mạnh nhất, làm hình thái tế bào biến dạng, toàn bộ tế bào co tròn với nồng độ cao nhất [C1] - 65,5 μ M và nồng độ [C2] – 32,75 μ M, từ nồng độ thứ [C3] – 16,38 μ M mới bắt đầu xuất hiện tế bào bám nhưng mật độ khá thấp. Quan sát hình thái tế bào được ủ với các hợp chất khác, cho kết quả không có sự khác biệt rõ ràng giữa các chất ở các nồng độ thử nghiệm. Ngay cả khi được ủ với nồng độ cao các dòng tế bào vẫn bám dính chắc chắn, chỉ có hợp chất **SD5** ở nồng độ cao nhất [C1] – 187 μ M làm tế bào cũng co tròn, tuy nhiên vẫn còn thấy một vài tế bào bám đáy và hình thái bám đặc trưng thể hiện ở ngay nồng độ [C2] – 93,5 μ M.

Với dòng tế bào ung thư gan HepG2 sau 48h ủ hợp chất từ hình ảnh thu được cho thấy hợp chất **SD3** và **SD4** có tác dụng gây độc tế bào. Hợp chất **SD3** có tác dụng gây độc tế bào mạnh nhất, tại nồng độ cao nhất $[C1] - 65,5 \mu M$ và

nồng độ $[C2] - 32,75 \mu$ M tế bào co tròn, teo tóp theo từng cụm. Khi giảm nồng độ xuống đến $[C3] - 16,38 \mu$ M lúc này tế bào thể hiện bám dính đặc trưng, tuy nhiên mật độ vẫn thấp. Hợp chất **SD4** cũng chỉ gây độc tế bào ở nồng độ cao nhất $[C1] - 156,4 \mu$ M, tại đây mật độ tế bào có giảm nhưng về hình thái vẫn bám dính và chưa nhận thấy sự khác biệt rõ rệt. Các hợp chất còn lại là **SD1**, **SD2** và **SD5** đều cho hình thái như nhau và không có sự sai khác gì so với đối chứng ngay ở các nồng độ cao nhất.

Với dòng tế bào ung thư vú MCF7 chỉ có hợp chất **SD3** là có tác dụng gây độc tế bào, ở nồng độ cao $[C1] - 65,5 \mu$ M và nồng độ $[C2] - 32,75 \mu$ M toàn bộ tế bào co tròn với số lượng ít chỉ chiếm 12-15%, đến nồng độ $[C3] - 16,38 \mu$ M tế bào mới bắt đầu bám đáy và tăng sinh. **SD1, SD2, SD4** và **SD5** là các hợp chất không có tác dụng gây độc nào cho tế bào MCF7, ngay ở nồng độ cao nhất [C1] hình thái quan sát cho thấy tế bào vẫn bám đáy đặc trưng và số lượng tế bào khá cao chiếm 60-70% bề mặt đĩa nuôi cấy.

Với dòng tế bào ung thư dạ dày N87 cho kết quả có ba hợp chất **SD3**, **SD4** và **SD5** có tác dụng gây độc tế bào. Trong đó hợp chất **SD3** và **SD4** có tác dụng gây độc tế bào mạnh nhất; ở nồng độ cao nhất [C1] hình thái tế bào biến đổi rõ rệt, gần như toàn bộ tế bào co dúm và mật độ giảm mạnh. Khi giảm nồng độ thì ngay nồng độ sau [C2], cả mật độ cũng như hình thái tế bào không thấy có sự sai khác rõ rệt giữa thí nghiệm và đối chứng. **SD5** với kết quả thu được cho thấy không có tác dụng gây độc mạnh như **SD3** và **SD4**, với nồng độ cao nhất [C1] – 187 μ M chỉ làm giảm số lượng tế bào và hình thái tế bào gần như không có sự thay đổi. Hai hợp chất **SD1**, **SD2** không có ảnh hưởng nào lên tế bào, hình thái tế bào không có biến đổi, mật độ tế bào chiếm khá cao đạt trên 70-90%.

Với dòng ung thư buồng trứng OVCAR-8 từ hình ảnh thu được cho thấy hợp chất **SD3** và **SD4** có tác dụng gây độc tế bào. Về mặt hình thái cũng như số lượng tế bào quan sát được thì **SD3** có tác dụng gây độc mạnh hơn, ở nồng độ cao **SD3** làm cho tế bào co tròn toàn bộ, số lượng tế bào giảm hẳn chỉ đạt 9-10%. Với hợp chất **SD4**, tế bào vẫn bám đáy đặc trưng, mật độ tế bào có giảm nhưng vẫn đạt trên 30%. Các hợp chất còn lại **SD1**, **SD2** và **SD5**, tương tự như dòng Hela và HepG2 chưa quan sát thấy có sự ảnh hưởng nào lên tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8.

Chất thử	Đối chứng	Tế bào trong		SD1		SD2	SI	D3	SI	D4	S	D5
Dòng tế bào	sinh học	DMSO 0,5%	Y	Ν	Y	Ν	Y	Ν	Y	Ν	Y	Ν
OVCAR-8												
[C] µM				239		563	4,1	2,05	39,1	19,55		187
HeLa						N. N						
[C] µM				239		563	32,75	16,38		156,4	187	93,5
HepG2						1						
[C] µM				239		563	4,1	2,05	156,4	78,2		187
MCF7												
[C] µM				239		563	4,1	2,05		156,4		187
N87												
[C] µM		<u> </u>		239		563	65,5	32,75	78,2	39,1	187	93,5

Ghi chú: Y. Nồng độ thấp nhất có tác dụng; N. Nồng độ cao nhất không có tác dụng

Hình 3.25. Hình thái các dòng tế bào thử nghiệm dưới tác dụng của SD1, SD2, SD3, SD4 và SD5

tại thời điểm 48h (VK 10X, Zoom 5,6)

3.3.1.2. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào bằng phương pháp nhuộm MTS

MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4sulfophenyl)-2H-tetrazolium] là một loại mới của muối tetrazolium, khi có mặt PMS (phenazine methyl sulfate) được một loại enzym trong ty thể của tế bào sống chuyển hoá tạo ra sản phẩm formazan tan trong môi trường nuôi cấy tế bào, hấp thụ ánh sáng tối đa ở bước sóng 490 - 500 nm trong đệm PBS. Hàm lượng của chất tạo ra tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống tham gia phản ứng, lượng formazan được định lượng bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 490 nm.

Sau 48h ủ thuốc, bằng phương pháp MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4- sulfophenyl)-2H-tetrazolium], đo phổ hấp phụ tại bước sóng 490nm, bằng máy đọc Elisa SpectraMAX Plus 384.

Với chỉ số OD đo được, bằng các phương pháp toán học trong Excel xử lý số liệu và thu được trung bình tỷ lệ % tế bào sống (A%) tương ứng với các nồng độ. Số liệu về giá trị IC₅₀ của từng chất được thể hiện ở **bảng 3.25**.

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 ± 0,007	$22,\!4\pm0,\!7$	$3,2 \pm 0,18$ $3,1 \pm 0,00$		$33 \pm 0,08$	
505	$R^2 = 0,99$	$R^2 = 0,99$	$R^2 = 0,97$	$R^2 = 0,99$	$R^2 = 0,98$	
SD4	$30\pm1,4$	$97,\!4 \pm 4,\!6$	$122.9 \pm 5,7$	ND	$66,1 \pm 0,9$	
504	$R^2 = 0,98$	$R^2 = 0,98$	$R^2 = 0,98$	$R^2 = 0.98$ IND		
SD5	ND	$160,3 \pm 9,2$ $R^2 = 0,99$	ND	ND	$11\overline{5,3 \pm 1,34}$ $R^2 = 0.97$	

Bảng 3.25. IC₅₀ của các hợp chất trên các dòng tế bào ung thư trong thử nghiệm MTS (μM)

Kết quả thử nghiệm bằng phương pháp MTS tương quan với kết quả định tính so sánh hình thái thu được ở **hình 3.25**.

Nhìn một cách tổng thể thì 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.

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

3.3.2.1. Ảnh hưởng của oxostephanin theo thời gian thực đối với tế bào ung thư OVCAR-8

Nghiên cứu thực hiện phân tích độc tính tế bào của oxostephanin bằng cách sử dụng dòng tế bào OVCAR-8 với hệ thống xCELLigence RTCA. Trong thời gian u > 200 h, khả năng sống sót, số lượng, hình thái và khả năng kết dính của các tế bào được ghi lại và hiển thị dưới dạng đồ thị (**Hình 3.26**). Các tiện ích trong phần mềm RTCA Control Unit cho phép tạo đường cong đáp ứng liều và tính giá trị IC₅₀ của thuốc tại các thời điểm khác nhau. Kết quả cho thấy oxostephanin và VX-680 có tác dụng tương tự 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.



Hình 3.26. Ánh hưởng của oxostephanin và VX-680 theo thời gian thực lên tế bào OVCAR-8

Trong các giếng đối chứng, các giá trị chỉ số tế bào tăng dần và đạt đỉnh tại thời điểm 140 h, với CI là 32 (**Hình 3.26**). Trong các giếng được xử lý với hai nồng độ cao nhất là 125 và 25 μ M oxostephanin, sự tăng sinh tế bào bị ức chế hoàn toàn so với đối chứng với các giá trị CI giảm sau 3 giờ ủ, cho thấy rằng các tế bào không thể phát triển mà đã chết. Ở nồng độ oxostephanin 5 μ M, tốc độ tăng sinh tế bào xấp xỉ một nửa so với đối chứng, với thời gian để đạt được đỉnh của giá trị CI là 165 giờ. Ở nồng độ oxostephanin 1 μ M, đỉnh đạt được cùng lúc nhưng với giá trị nhỏ hơn, tương đương với 78% đối chứng. Ở nồng độ nhỏ nhất 0,2 μ M oxostephanin, sự tăng sinh tế bào thấp hơn so với đối chứng. Đối với các giếng

được xử lý bằng VX-680, trong khi tất cả các tế bào đều bị giết ở hai nồng độ cao nhất, giá trị CI ở các đỉnh kết hợp với các nồng độ khác nhỏ hơn và được quan sát tại các thời điểm muộn hơn so với các giá trị của đối chứng (**Hình 3.26**). Sử dụng phần mềm RTCA, các giá trị IC₅₀ tại các thời điểm ủ khác nhau từ 24 đến 120 h đã được tính toán. Giá trị IC₅₀ là từ 3,8-7,3 μ M đối với oxostephanin và 0,2-0,6 μ M đối với VX-680 (**Bảng 3.26**).

Bảng 3.26. Giá trị IC₅₀ của oxostephanin và VX-680 đối với tế bào ung thư OVCAR-8 với thời gian ủ khác nhau

Chất thử	Thời gian ủ (h)								
Chat thu	24	48	72	96	120				
VX-680 (µM)	0,3±0,02	0,6±0,06	0,2±0,04	0,2±0,07	0,2±0,05				
Oxostephanin (µM)	7,3±1,5	6,6±0,9	5,6±0,7	4,6±0,8	3,8±0,5				

Thời gian nhân đôi của các tế bào OVCAR-8 cũng bị ảnh hưởng bởi hai hợp chất này. Sau khi xử lý bằng VX-680, các tế bào không phát triển và chết nhanh chóng sau khi bổ sung chất được biểu thị bằng các giá trị âm của thời gian nhân đôi ở ba nồng độ cao nhất. 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 (**Hình 3.27**).

Đáng chú ý, sự thay đổi kích thước của các tế bào được xử lý bằng oxostephanin và VX-680 ở nồng độ thấp đã được quan sát thấy. Các tế bào tăng kích thước sau thời gian ủ. Không chỉ kích thước tế bào, mà phương pháp nhuộm miễn dịch của những tế bào này cũng chỉ ra rằng có sự gia tăng đáng kể diện tích nhân tế bào (**Hình 3.28**). 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 (**Hình 3.28**).



Hình 3.27. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 lên thời gian nhân đôi của tế bào OVCAR-8



Hình 3.28. Hình ảnh nhân tế bào sau khi ủ với oxostephanin và VX-680 trong 48 giờ

Sử dụng phần mềm trình duyệt hình ảnh LSM, diện tích nhân đã được đo. Dữ liệu chỉ ra rằng kích thước nhân của các tế bào được xử lý bằng oxostephanin hoặc VX-680 lớn hơn gấp ba lần so với ở nhóm đối chứng (**Hình 3.29**). Kết hợp với nhau, những kết quả này đã chứng minh rằng oxostephanin ức chế sự tăng sinh của tế bào OVCAR-8 trong phạm vi vi cực. Tác dụng theo thời gian thực của oxostephanin có thể so sánh với tác dụng của VX-680, một chất ức chế Aurora kinase.



Hình 3.29. Kích thước trung bình của vùng nhân tế bào sau khi ủ với oxostephanin và VX-680 trong 48 giờ (*P < 0.05 so sánh với đối chứng)

Cảm ứng apoptosis là một đặc điểm của chất ức chế Aurora kinase [42], [129]. Do đó, nghiên cứu đã kiểm tra xem liệu oxostephanin có thể gây ra quá trình apoptosis của các tế bào ung thư OVCAR-8 hay không. 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 (**Hình 3.30**). Hình ảnh miễn dịch huỳnh quang của các tế bào đối chứng và được xử lý bằng oxostephanin được nhuộm bằng Annexin V - FITC cho thấy sự biểu hiện cao hơn của các phân tử phosphatidylserine trên bề mặt tế bào ở các tế bào được xử lý (màu xanh lục).

Tỷ lệ tế bào dương tính với Annexin-V được tính từ tổng của góc phần tư Q1-1 (apoptosis sớm) và Q2-1 (apoptosis muộn) trong biểu đồ đo tế bào dòng chảy (**Hình 3.31**). Theo đó, tỷ lệ tế bào được xử lý với oxostephanin (5 μ M) dương tính với Annexin-V là 30,4 ± 6,8%, cao gấp 7,4 lần so với đối chứng (4,1 ± 0,8%).

Hơn nữa, $33,7 \pm 5,1\%$ tế bào dương tính với Annexin-V khi được xử lý bằng 0,2 μ M VX-680.



Hình 3.30. Oxostephanin gây ra quá trình apoptosis của tế bào OVCAR-8



Hình 3.31. Phân tích định lượng phần trăm apoptosis trong các tế bào được xử lý bằng oxostephanin và VX-680

3.3.2.2. Oxostephanin ức chế sự phát triển của khối u OVCAR-8

Tác động của oxostephanin lên sự phát triển của tế bào OVCAR-8 trong nuôi cấy 3D đã được nghiên cứu. Với điều kiện xử lý thứ nhất, khi thêm chất thử vào thời điểm chuẩn bị khối u, oxostephanin này đã ngăn chặn 70% sự hình thành khối u ở 5 μ M và 58% sự hình thành hình cầu ở 1 μ M. 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 μ M. Hơn nữa, thể tích của các khối u được tạo thành nhỏ hơn so với thể tích của đối chứng (**Hình 3.32**). Sau khi chuyển các khối u vào đĩa thạch, sự phát triển không thay đổi ở nồng độ 1 μ M, trong khi điều này giảm ở nồng độ 5 μ M sau thời gian nuôi cấy ngay cả khi không có oxostephanin (**Hình 3.33**).



Hình 3.32. Khả năng hình thành và phát triển của khối u OVCAR-8 sau khi ủ với oxostephanin và VX-680





Hình 3.33. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 lên thể tích tương đối của khối u

(Số ngày được tính từ thời điểm chuyển khối u từ giọt treo sang đĩa thạch)

Đối với điều kiện xử lý thứ hai, 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 μ M và 2,7 lần ở 1 μ M. 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 μ M, với sự giảm 2,1 lần về thể tích vào ngày điều trị thứ 7. Mặt khác, đối chứng đã làm tăng thể tích khối u lên gấp 3 lần vào ngày thứ 7 của nuôi cấy trên thạch (**Hình 3.33**).

Hơn nữa, hình thái của các khối u được xử lý trong cả hai điều kiện: i) các chất thử được thêm vào tại thời điểm chuẩn bị khối u; và ii) các chất thử được thêm vào, duy trì trong môi trường để phát triển khối u trong đĩa thạch cũng được 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 (**Hình 3.34**).



Hình 3.34. Hình thái của khối u được xử lý trong hai điều kiện (*Thanh tỷ lệ, 100 μm*)

3.3.2.3. Oxostephanin ức chế sự biểu hiện và hoạt động của Aurora kinase

Để xác định oxostephanin 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. Để thu thập tế bào ở giai đoạn phân bào, quần thể tế bào được đồng bộ hóa bằng cách bổ sung paclitaxel, sau đó ủ với oxostephanin và VX-680 ở nồng độ lần lượt là 5 và 0,2 μM. Các hình ảnh cho thấy tín hiệu huỳnh quang của H3S10ph đã giảm rõ rệt trong các tế bào phân bào

được ủ với oxostephanin và VX-680, ngay cả khi có hoặc không có paclitaxel (**Hình 3.35**). 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 (màu xanh lục) bị khử khi có mặt oxostephanin (5 μ M) và VX-680 (0,2 μ M) trong 15 giờ



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

Ngoài ra, sự phân bố của Aurora B bị ảnh hưởng bởi các hợp chất này. Những quan sát thu nhận được khi phân tích trên hệ thống LSM 510 cho thấy trong các tế bào OVCAR-8 nguyên phân, Aurora B kinase vẫn được biểu hiện trong tế bào tại vị trí tương ứng là trên vùng kinetochore khi NST ở kỳ đầu giữa và kỳ giữa. Tuy nhiên, các protein không biểu hiện tập trung mà có xu hướng phân tán lên toàn bộ NST (**Hình 3.36**).

Bên cạnh đó, RT-qPCR tiết lộ rằng biểu hiện mRNA của Aurora B đã giảm sau khi ủ với oxostephanin trong các tế bào OVCAR-8 (**Hình 3.37**).



Hình 3.36. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 lên sự phân bố của Aurora kinase B



Hình 3.37. Sự biểu hiện của Aurora A và Aurora B đã giảm ở mức mRNA sau khi xử lý bằng oxostephanin và VX-680

(* P <0,05, so với đối chứng)

Để xác định ảnh hưởng của oxostephanin đối với sự định vị của Aurora B kinase, các tế bào HeLa biểu hiện ổn định Aurora kinase B-GFP đã được sử dụng. Đáng chú ý, sự khuếch tán của Aurora B đã được quan sát thấy ở cả tế bào HeLa sống và đã cố định (**Hình 3.38**). Ở cả hai điều kiện là theo dõi tế bào sống hoặc tế bào đã cố định đều quan sát thấy ở mẫu đối chứng, tín hiệu của Aurora B thể hiện ở dạng các chấm phát huỳnh quang mạnh trên vùng kinetochore của NST. Còn ở mẫu xử lý với VX-680 hoặc oxostephanin, tín hiệu huỳnh quang dàn trải trên các cánh NST chứ không tập trung thành điểm. Sự phân tán của Aurora B kinase là do bản thân protein này cũng bị ức chế khả năng tự phosphoryl hóa, dẫn đến sự thay đổi vị trí biểu hiện của phân tử, qua đó ành hưởng đến chức năng của protein này. Như vậy có thể thấy oxostephanin, tương tự như VX-680, đã ảnh hưởng đến vị trí biểu hiện của Aurora kinase.



Hình 3.38. Ảnh hưởng của oxostephanin và VX-680 đến sự biểu hiện của Aurora kinase B trong tế bào nguyên phân

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.

3.3.2.4. Oxostephanin gây độc tế bào có chọn lọc trên các loại tế bào khác nhau

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**).

Thứ hai, các tế bào được ủ với oxostephanin để phân tích quá trình chết của tế bào. Sau 24 giờ ủ với oxostephanin, sự chết của tế bào hUVECs được quan sát thấy ở hai nồng độ cao nhất. Sau 48 và 72 giờ, số lượng tế bào chết tăng liên tục trong các giếng chứa hUVECs. Kết quả tương tự cũng được phát hiện trong UC-MSCs. Mặt khác, trong các giếng của hFBs, không có tế bào chết nào được quan sát thấy (**Hình 3.40**).



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



Hình 3.40. Khả năng sống sót của các tế bào UC-MSCs, hUVECs và hFBs được xử lý với các nồng độ oxostephanin khác nhau sau 24, 48 và 72 giờ ủ

Ngoài ra, các giá trị IC₅₀ phù hợp với những quan sát này. Các giá trị IC₅₀ của hUVECs lần lượt là 7,9 ± 0,6; 3,1 ± 0,5 và 1,9 ± 0,5 µM sau 24, 48 và 72 giờ ủ. Tuy nhiên, không thể xác định giá trị IC₅₀ của hFBs sau 24 và 48 giờ, nhưng là 17,1 ± 0,8 µM 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 IC₅₀ ở 48 và 72 giờ lần lượt là 4,7 ± 0,8 và 5,1 ± 0,7 µM. Đường cong ức chế tăng trưởng theo liều của oxostphanin đối với ba dòng tế bào được thể hiện trong **Hình 3.41**. 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.



Hình 3.41. Đường cong ức chế tăng trưởng đáp ứng liều đối với oxostephanin của ba loại tế bào

3.3.2.5. Oxostephanin làm giảm sự hình thành khuẩn lạc và tiết yếu tố tăng trưởng bởi hUVECs và hFBs

Ảnh hưởng của oxostephanin đối với khả năng của các tế bào tiền thân nội mô và các tế bào tiền thân nguyên bào sợi để hình thành các khuẩn lạc sau đó đã được kiểm tra và chụp ảnh (**Hình 3.42**)



Hình 3.42. Oxostephanin ảnh hưởng đến sự hình thành và hình thái khuẩn lạc ở tế bào hUVECs và hFBs

 (i và iii) Hình ảnh của đĩa nuôi cấy hFBs và hUVECs, sau khi nhuộm Giemsa;
(ii và iv) Hình ảnh hiển vi của một khuẩn lạc nhuộm màu đơn lẻ trong hFBs và hUVECs tương ứng. Thanh tỷ lệ, 200 μM. Hình 3.42 cho thấy cả số lượng khuẩn lạc và mật độ tế bào/khuẩn lạc đều giảm trong các giếng được xử lý so với đối chứng. Số lượng CFU-EC và CFU-F đã giảm đáng kể với hai nồng độ cao nhất (25 và 5 μ M) (P < 0,01).

Sự hình thành khuẩn lạc trên 1.000 tế bào được nuôi cấy cũng bị gián đoạn với nồng độ oxostephanin thấp hơn, với số lượng khuẩn lạc ít hơn so với đối chứng trong hUVECs (P < 0,05) (**Hình 3.43**, biểu đồ bên trái). Ngoài ra, tác dụng ức chế của oxostephanin đối với sự hình thành khuẩn lạc nhiều hơn nổi bật ở hUVECs so với hFBs, với số lượng CFU nhỏ hơn so với đối chứng (%) trong tế bào nội mô so với trong nguyên bào sợi (P < 0,05) (**Hình 3.43**, biểu đồ bên phải).



Hình 3.43. Ảnh hưởng của oxostephanin lên số lượng khuẩn lạc được hình thành ở tế bào hUVECs và hFBs

Ba loại yếu tố tăng trưởng, bao gồm VEGF-A, FGF-2 và HGF, được đo trong môi trường nuôi cấy tế bào sau khi xử lý tế bào bằng oxostephanin ở 1 và 5 μ M. Dữ liệu chỉ ra rằng sự bài tiết của các protein này khác nhau giữa các loại tế bào. Trong các giếng đối chứng, cả hUVECs và hFBs đều tiết ra HGF với các giá trị tương ứng là 4,5 và 1,333 ± 243,2 μ g/ml (**Hình 3.44**). Ngoài ra, cả hFBs và hUVECs đều sản xuất VEGF-A vào môi trường với nồng độ khoảng ~ 1.270 pg/ml. hUVECs tiết ra một lượng lớn FGF-2 (2.285,8 ± 240,1 pg/ml). Sau khi ủ với oxostephanin, khả năng bài tiết yếu tố tăng trưởng của các tế bào phù hợp với sự kiểm soát liên quan đến thành phần yếu tố, trong đó chỉ hUVECs mới có thể tiết ra cả ba yếu tố (VEGF-A, HGF và FGF-2) và hFBs chỉ tiết ra VEGF-A và HGF. Tuy nhiên, số lượng của tất cả các yếu tố tăng trưởng được thử nghiệm đều giảm (P < 0,05), ngoại trừ VEGF-A được tiết ra bởi hUVECs được xử lý bằng 5

μM oxostephanin (**Hình 3.44**). Những kết quả này đã chứng minh rằng oxostephanin ảnh hưởng đến việc bài tiết các yếu tố tăng trưởng của tế bào.



Hình 3.44. Ảnh hưởng của oxostephanin lên sự bài tiết các yếu tố tăng trưởng ở tế bào hUVECs và hFBs

(* P < 0,05, ** P < 0,01 và *** P < 0,001, so với đối chứng)

3.3.2.6. Oxostephanin ức chế sự di chuyển của hUVECs và hFBs

Di chuyển nguyên bào sợi và tế bào nội mô là một bước quan trọng trong quá trình chữa lành vết thương và quá trình hình thành mạch [130]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, một xét nghiệm chữa lành vết thương đã được thực hiện để kiểm tra khả năng của oxostephanin để điều chỉnh sự di chuyển của các tế bào nội mô và nguyên bào sợi. Trong nhóm đối chứng, cả hUVECs và hFBs đều thể hiện khả năng di chuyển để thu hẹp vết tổn thương (vết xước) với tốc độ nhanh hơn; hUVECs thể hiện khả năng di chuyển lớn hơn (che phủ 100% vết thương sau 24 giờ) so với hFBs (che phủ 46,1% vết thương sau 24 giờ) (**Hình 3.45**).

Khi các tế bào được xử lý bằng oxostephanin, sự di chuyển của hUVECs và hFBs đã giảm đáng kể (P < 0,05; **Hình 3.45**). Đối với hUVECs, tỷ lệ vết thương được bao phủ bởi các tế bào được điều trị bằng oxostephanin ở nồng độ 25 và 5 μ M là ~ 11% so với 100% ở nhóm đối chứng sau 24 giờ, điều này cho thấy hợp chất này đã ức chế sự di chuyển của hUVECs trên 10 lần. Tác dụng ức chế này ít nổi bật hơn ở hFBs ở hai nồng độ cao nhất (giảm 5,7 lần ở 25 μ M và giảm 3,2 lần ở 5 μ M ở 48 giờ). Tuy nhiên, ở nồng độ 1 μ M, hợp chất có tác dụng ức chế nổi bật hơn đối với sự di chuyển của hFB so với hUVECs. Những kết quả này đã

chứng minh rằng oxostephanin ức chế đáng kể sự di chuyển của hUVECs và hFBs.





của tế bào (* P < 0,05 và *** P < 0,001)

3.3.2.7. Oxostephanin ức chế sự hình thành mạch trong ống nghiệm

Ảnh hưởng của oxostephanin trên sự hình thành mạch của hUVECs đã được kiểm tra bằng cách sử dụng thử nghiệm hình thành mạch.



Hình 3.46. Ảnh hưởng của oxostephanin đến sự hình thành mạch của hUVECs

Như được thể hiện trong **hình 3.46** các tế bào hUVEC đã hình thành một mạng lưới giống như mao quản trên Matrigel, với tổng số chiều dài mạch và điểm phân nhánh của mạch cao nhất sau 10 giờ. Ngược lại, khả năng hình thành mạch giảm đáng kể khi các tế bào được xử lý với 5 μ M oxostephanin (P <0,05) (**Hình 3.47**). Tổng chiều dài mạch, phân nhánh mạch, các đoạn mạch và số lượng các điểm nối lần lượt là 72,9 ± 2,1, 62,5 ± 8,4, 36,4 ± 7,2 và 52,1 ± 5,6% so với nhóm đối chứng. Phần lớn các tế bào được xử lý với 1 μ M oxostephanin, tỷ lệ phần trăm tổng chiều dài mạch, phân nhánh, phân đoạn và số điểm nối đạt lần lượt là 80,8 ± 10, 76,2 ± 12, 52,7 ± 12,2 và 70,3 ± 12,3% so với đối chứng (**Hình 3.48**). Những phát hiện này cho thấy rằng oxostephanin ức chế sự hình thành mạch trong ống nghiệm.



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



Hình 3.48. Khả năng ức chế hình thành mạch của oxostephanin trên hUVECs so với đối chứng (%) (* P < 0.05 và ** P < 0.01)

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

Phần lớn các loài thuộc chi Stephania Lour. ở Việt Nam đã được nghiên cứu đến nay đều được người dân địa phương sử dụng làm thuốc từ lâu đời, có phân bố địa lý hẹp, đặc hữu theo từng vùng, đa số thường mọc hoang từ vùng núi cao đến vùng đồng bằng, ven biển, có loài mọc ngay trên bãi cát hoặc gò hoang vùng ven biển. Đã có nhiều nghiên cứu trước đây về các loài thuộc chi Stephania Lour. tại Việt Nam, trong đó có một số nghiên cứu về loài củ dòm Stephania dielsiana Y.C.Wu, tuy nhiên các nghiên cứu hầu hết tập trung vào đối tương là củ của cây; nội dung chủ yếu dừng lại ở việc chiết xuất, phân lập, xác định cấu trúc một số hợp chất và sơ bộ đánh giá tác dụng sinh học trong đó có tác dụng giảm đau [22], [23], an thần, chống trầm cảm [19], [20], [21] và đặc biệt là tác dụng kháng ung thư [15], [16], [17], [18]. Một số nghiên cứu thời gian gần đây trên phần thân lá cây củ dòm cho thấy sự tương đồng nhất định về thành phần alcaloid với phần củ. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng hàm lượng oxostephanin ở thân lá có thể cao hơn khoảng 10 lần so với trong phần củ [13], [14], và oxostephanin được chứng minh ban đầu có tác dụng ức chế tế bào ung thư tốt thông qua khả năng gây độc tế bào ung thư, khả năng gây chết tế bào ung thư theo chương trình (apoptosis) [18]. Thêm vào đó, sinh khối của thân lá có thể thu hái được nhiều lần trong năm, có thể tận dụng để tăng giá trị cây thuốc trong quá trình trồng trot và thu hái. Để góp phần bổ sung thêm các nghiên cứu về loài này, luân án tiến hành nghiên cứu về thành phần hóa học và đánh giá tác dung kháng ung thư của thân lá cây củ dòm.

4.1. VỀ CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẦU TRÚC CÁC HỢP CHẤT TỪ THÂN LÁ CÂY CỦ DÒM

Alcaloid là thành phần hóa học chính trong các loài thuộc chi *Stephania* Lour. Cho đến nay, các nhà khoa học trên thế giới đã phân lập được khoảng hơn 270 alcaloid tinh khiết từ khoảng 41 loài thuộc chi *Stephania*, chiếm 38,3% tổng số loài trên thế giới (107 loài). Một số loài có số lượng alcaloid phân lập nhiều như: *S. cepharantha* (58 alcaloid), *S. tetrandra* (28 alcaloid), *S. japonica* (31 alcaloid), *S. sasakii* (24 alcaloid), *S. longa* (30 alcaloid), *S. abyssinica* (19

alcaloid), *S. venosa* (22 alcaloid),.. Ngoài alcaloid, các nhóm chất khác ít được đề cập hơn trong các công bố thành phần hóa học của chi này.

Đối với loài củ dòm (*S. dielsiana*), tính đến nay, số lượng các công bố trên thế giới liên quan đến chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất là tương đối hạn chế (05 công bố trong giai đoạn 2009 – 2020). Những nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam đã công bố chiết xuất phân lập được 27 alcaloid trong đó chiếm tỷ lệ lớn chất là các alcaloid nhóm aporphin (20/27), ngoài ra còn có các alcaloid nhóm morphinan (3 hợp chất), protoberberin (3 hợp chất) và benzylisoquinolin (1 hợp chất) từ loài củ dòm.

Trong luận án, 11 hợp chất gồm có 8 alcaloid và 3 hợp chất không phải alcaloid đã được công bố chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc từ thân lá của cây củ dòm, trong đó:

- Stedieltin A (SD1) và Stedieltin B (SD2): hai hợp chất này đều được phân lập từ cắn ethyl acetat từ thân lá cây củ dòm, sau khi tiến hành sắc ký cột dùng dung môi pha thuận và pha đảo. Đây là hai hợp chất mới, lần đầu tiên được phân lập từ tự nhiên.

Trong đó dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của **SD1** có nhiều điểm tương đồng với oxostephanin [41], thay đổi cơ bản là sự biến đổi ở vòng C của khung oxoaporphin, cụ thể 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 (C-7) gắn với vòng B ở vị trí C-6a được minh chứng thông qua tín hiệu $\delta_{\rm C}$ 167,0, và nhóm OCH₃ ($\delta_{\rm C}$ 51,2; $\delta_{\rm H}$ 3,14 s ppm) và một nhóm phenol ở C-7a ($\delta_{\rm C}$ 145,0 ppm). Thêm vào đó, là sự khác biệt về trường của hai proton ở vị trí H-12 ($\delta_{\rm H}$ 6,14 s; 6,15 s ppm) cũng được coi là minh chứng cho sự mở vòng C trong cấu trúc của **SD1**.

Với hợp chất **SD2**, dữ liệu phổ NMR và HMBC cũng cho thấy nhiều tín hiệu tương đồng với phổ của oxostephanin [41], 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. Tuy nhiên, phổ ¹³C-NMR của **SD2** chỉ có 17 tín hiệu carbon, trong đó không có tín hiệu của nhóm carbonyl như ở phổ chất oxostephanin. Thêm vào đó, tín hiệu C-6a và C-7a chuyển dịch về vùng trường thấp trên phổ ¹³C-NMR, gọi 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 $C_{17}H_{11}NO_4$ và độ bất bão hòa Δ =13, cho thấy rằng khác với oxostephanin, hợp chất **SD2** có vòng C là dị vòng chứa một nguyên tử oxy.

Như vậy, sự mở vòng, thay đổi các nhóm thế ở các vị trí C-6a, C-7 ở **SD1**, sự xuất hiện của dị vòng C chứa nguyên tử oxy ở **SD2** là những điểm làm nên tính mới của hai hợp chất này.

- Oxostephanin (SD3): hợp chất này đã được Nguyễn Quốc Huy và cộng sự chiết xuất từ phân đoạn SM2 (phân đoạn dichloromethan và ethylacetat) của củ [4] và thân lá loài *S. dielsiana* [9]. Nghiên cứu năm 2018 của Đào Đức Thiện và cộng sự [41] và nghiên cứu năm 2020 của James Knockleby và cộng sự [42] đã công bố phân lập được hợp chất này từ thân lá cây củ dòm. Ngoài ra oxostephanin cũng đã được phân lập từ loài *Stephania venosa* (Blume) Spreng [43]. Tuy nhiên hợp chất này mới được tìm thấy ở thân lá và củ loài nghiên cứu thu hái tại Việt Nam, còn với loài thu hái tại Trung Quốc chưa thấy có công bố về chiết xuất, phân lập hợp chất này. Điều này cho thấy có thể có sự khác nhau cơ bản về một trong những thành phần hoá học đang được quan tâm nghiên cứu của cây củ dòm ở Việt Nam và Trung Quốc.

Các nghiên cứu về tác dụng gây độc trên các dòng tế bào ung thư thực nghiệm của oxostephanin là tương đối phong phú, trong đó hợp chất này đã được chứng minh tác dụng tốt trên các dòng tế bào ung thư buồng trứng (OVCAR-8), ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư gan (HepG2), ung thư vú (gồm các dòng MDA-MB-231, MDA-MB-468, BC và BT474), ung thư cuống phổi phế nang (H358), bạch cầu lympho ác tính (MOLT-3), ung thư ruột kết ở người (HCT116) [15], [41], [42], [43]. Cơ chế kích thích quá trình apoptosis (kích thích tế bào chết theo chương trình) ở tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 của oxostephanin cũng đã được Nguyễn Quốc Huy và cộng sự [18]; James Knockleby và cộng sự [42] chứng minh trên thực nghiệm. Ngoài ra hợp chất này được chỉ ra là có tác dụng dừng chu trình tế bào, có ảnh hưởng nhất định lên Aurora kinase. Điều này gợi ý cho việc cần tiếp tục đánh giá tác dụng gây độc tế bào của oxostephanin, so sánh tác dụng này với các hợp chất khác được chiết xuất phân lập từ loài nghiên cứu và làm rõ hơn về cơ chế tác dụng gây độc tế bào của hợp chất. Ngoài ra cũng cần nghiên cứu độc tính của oxostephanin trên các dòng tế bào thường để đánh giá khả năng tác dụng chọn lọc

của hợp chất, định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển chế phẩm có chứa oxostephanin.

- Oxostephanosin (SD4): hợp chất này được chiết xuất, phân lập từ loài S. venosa [122] và Polyalthia nemoralis DC. Annonaceae (Ran rừng, Phọc đen) [131]. Đây là lần đầu tiên oxostephanosin được phân lập từ loài củ dòm, đóng góp thêm cho tính mới về thành phần hoá học của loài nghiên cứu. Cấu trúc của SD4 gần như tương tự với SD3 (oxostephanin), chỉ khác ở vị trí C-8 liên kết với nhóm OH thay thế cho liên kết với nhóm OCH₃. Điều này gọi ý tiếp tục đánh giá tác dụng gây độc tế bào của hợp chất SD4.

- Oxocrebanin (SD5): hợp chất này đã được công bố có trong các loài *S. succifera*, *S. venosa* [132]; được Phạm Gia Điền và cộng sự [133], Zhang Yi và cộng sự [3], De-Xiong Zhou và cộng sự [4] phân lập từ củ loài *S. dielsiana*, củ loài *S. hainanensis* [46], và từ thân lá loài *Fissistigma poilanei* (Ast) Tsiang & P.T. Li (Annonaceae) thu hái ở Việt Nam [134]. Tuy nhiên với phần thân lá loài *S. dielsiana*, nghiên cứu của Đào Đức Thiện và cộng sự [41] và nghiên cứu năm 2020 của James Knockleby và cộng sự [42] lại chưa phân lập được chất này. Như vậy luận án đã lần đầu tiên phân lập được oxocrebanin từ thân lá cây củ dòm, đánh dấu một điểm khác biệt về mặt thành phần hoá học trong phần thân lá của cây so với các nghiên cứu trước đây.

Hợp chất oxocrebanin chiết xuất phân lập từ loài *S. hainanensis* đã được chứng minh có tác dụng gây độc tế bào ung thư theo cơ chế tác động kép gồm ức chế Topoisomerase, ngăn chặn sự phát triển của tế bào ung thư vú MCF-7 bằng cách gây ra tổn thương DNA và ngăn cản phân bào [46]. Ngoài ra tác dụng chống viêm của hợp chất này cũng rất đáng chú ý. Như vậy oxocrebanin là một chất có tiềm năng trong nghiên cứu các chất tác dụng kháng ung thư. Cần có những nghiên cứu tiếp theo để đánh giá tác dụng sinh học của hợp chất này.

- Aristolactam (SD6): đây là một trong các hợp chất thuộc nhóm aristolactam alcaloid, được phân lập từ loài *Aristolochia indica* L., họ Mộc hương nam (Aristolochiaceae) và một số loài khác thuộc chi *Aristolochia, Asarum* [124]. Tham chiếu tài liệu đã công bố về những nghiên cứu thành phần hóa học của chi *Stephania* Lour, thì **SD6** chưa từng được đề cập đến trong chi này. Như vậy, **SD6** hay Aristolactam được ghi nhận trong kết quả này, nên luận án là nghiên cứu đầu tiên công bố **SD6** được phân lập từ chi *Stephania* Lour. nói chung và loài củ dòm nói riêng. Đó chính là một trong những đóng góp về tính mới trong các nghiên cứu về thành phần hoá học của chi *Stephania* Lour. và loài củ dòm. Điểm khác biệt cơ bản của aristolactam so với các hợp chất alcaloid đã được công bố trong củ dòm là ở dị vòng 5 cạnh chứa N, thay cho dị vòng 6 cạnh chứa N trong các hợp chất khung aporphin, morphinan, protoberberin hoặc benzylisoquinolin. Đây cũng có thể là nguyên nhân dẫn đến tác dụng của aristolactam cũng khác so với tác dụng của các chất đã công bố trong loài, cụ thể là độc tính trên thận và khả năng gây ung thư, gây đột biến gen và gây ung thư của aristolactam cũng như acid aristolochic đã được thừa nhận [135]. Do các thông tin về độc tính của hợp chất cũng như do lượng hợp chất thu được quá nhỏ (2,3 mg) nên luận án không tiến hành đánh giá tác dụng gây độc trên các dòng tế bào ung thư thực nghiệm của hợp chất này.

- Crebanin (SD7): đây là hợp chất tương đối điển hình thuộc nhóm aporphin, đã được tìm thấy trong khoảng 15 loài khác nhau thuộc chi *Stephania* Lour. Các nghiên cứu của Yecheng Deng và cộng sự [5], De-Xiong Zhou và cộng sự [4] đã công bố việc phân lập crebanin từ củ loài *S. dielsiana*. Một số nghiên cứu về thành phần hóa học của thân lá củ dòm cũng đã công bố sự xuất hiện của crebanin qua chiết tách phân lập [41], [42]. Như vậy có thể thấy crebanin phân bố cả trong củ và thân lá của củ dòm. Từ kết quả nghiên cứu thành phần hóa học của thân lá củ dòm của luận án, trên 2000 mg crebanin đã được chiết xuất phân lập từ 7 kg dược liệu. Kết quả này phù hợp với các công bố trên thế giới và Việt Nam về thành phần hoá học của loài củ dòm. Kết quả phân lập được một lượng không nhỏ crebanin cho gợi ý rằng đó có thể là một trong những thành phần chính của nhóm alcaloid trong loài củ dòm, nên một số nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu một số tác dụng sinh học của chất này.

Crebanin gây độc mạnh với dòng tế bào ung thư vú BT474 với IC₅₀ = 1,58 μ g/ml [41], gây độc yếu trên các dòng tế bào ung thư HeLa, MDA-MB231, MDA-MB-468, MCF-7 và các dòng tế bào không ung thư 184B5 và MCF10A [42]. Mặt khác theo nghiên cứu của Nguyễn Quốc Huy [15], crebanin chưa thể hiện tác dụng gây độc trên dòng tế bào ung thư OVCAR-8, thậm chí chất này còn có tác dụng kích thích tế bào ung thư cổ tử cung HeLa tăng sinh mạnh ở những nồng độ thấp.

Do đó trong khuôn khổ nghiên cứu của luận án, crebanin chưa được lựa chọn cho nghiên cứu đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư và tác dụng liên quan.

Tuy nhiên ngoài tác dụng gây độc tế bào, crebanin còn có các tác dụng đáng lưu ý khác như tăng cường trí nhớ trong thử nghiệm, ức chế AChE, chống loạn nhịp tim, cảm ứng chu trình chết tế bào, giảm đáp ứng của màng ty thể, chống xâm lấn và di căn tế bào ung thư, giảm đáp ứng trong phản ứng viêm, kháng khuẩn [44], [45], [50], [57], [136], [137]. Do hạn chế về mặt nội dung, thời gian triển khai luận án, các tác dụng này của crebanin chưa có điều kiện để đánh giá. Cần có những nghiên cứu sâu hơn về tác dụng sinh học của crebanin để có thể tận dụng dược nguồn nguyên liệu chiết xuất hợp chất này với lượng lớn như củ dòm.

- Dehydrocrebanin (SD8): hợp chất này được chiết xuất phân lập từ các loài *S. venosa* [138], *S. sasakii* [139], *S. cepharantha* [140] và từ củ loài *S. dielsiana* [8], [26]. Trong thân lá của loài này chưa có công bố về việc chiết xuất phân lập được dehydrocrebanin. Như vậy luận án đã lần đầu tiên phân lập được dehydrocrebanin từ thân lá cây củ dòm, đóng góp thêm tính mới về thành phần hoá học của loài nghiên cứu.

Về tác dụng sinh học, hợp chất này thể hiện tác dụng gây độc tế bào mạnh hơn trên các dòng OVCAR-8 và MDA-MB-231; tác dụng yếu hơn trên các dòng HeLa, HepG2 và H358 [15]. Ngoài ra hợp chất này còn có tác dụng chống sốt rét với $IC_{50} = 70$ ng/ml [54]. Do lượng hợp chất phân lập được không nhiều, các dòng tế bào ung thư thực nghiệm sử dụng trong luận án tương đối trùng với các dòng tế bào đã công bố trên, do vậy luận án không lựa chọn dehydrocrebanin để tiếp tục đánh giá tác dụng gây độc tế bào trên *in vitro* nữa. Trong thời gian tiếp theo, có thể nghiên cứu tác dụng của dehydrocrebanin trên các dòng tế bào ung thư khác hoặc đánh giá

- Các hợp chất khác:

+ 4-hydroxybenzaldehyd (SD9): đây là một trong ba đồng phân của hydroxybenzaldehyd, có thể được tìm thấy trong các loài lan *Gastrodia elata*, *Galeola faberi* và loài *Pisonia aculeata* [141]. Đây được xem là chất có khả năng can thiệp vào hoạt động và ức chế của dopamine beta-monooxygenase (DBM).

+ **Benzyl** β-D-glucopyranosid (SD10): đã được Tram Ngoc Ly và cộng sự phân lập từ thân rễ loài *Alpinia officinarum* Hance [126], David S. Seiglera, Guido

F. Pauli và cộng sự phân lập từ 2 cây *Passiflora edulis* (Chanh leo) và *Carica papaya* (Đu đủ) năm 2002 [142]. Một vài nghiên cứu sau này đã chứng minh hợp chất này có tác dụng chống oxy hóa.

+ (6R,9S)-roseosid (SD11): đây là một megastigman glucosid, trước đây đã phân lập được từ *Vinca rosea* [143] và *Bauhinia variegata* [144], đã được chứng minh có tác dụng tăng cường giải phóng insulin từ dòng tế bào INS-1 *in vitro* [144]. Trên thế giới, đã có nghiên cứu tổng hợp các đồng phân của roseosid [127], và chứng minh rằng các đồng phân lập thể của nó có tác dụng ức chế giải phóng leukotrien từ tế bào mast nuôi cấy có nguồn gốc từ tủy xương chuột (BMCMC) [145]. Tại Việt Nam, đồng phân (6*R*,9*S*)-roseosid đã được Hoàng Văn Thủy phân lập từ loài *S. viridiflavens* thu hái tại Văn Chấn, Yên Bái [138].

Luận án là công bố đầu tiên về việc phân lập được 3 hợp chất 4hydroxybenzaldehyd, benzyl β -D-glucopyranosid, và (6*R*,9*S*)-roseosid từ thân lá cây củ dòm, góp phần tăng cường các kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học của loài. Do các hợp chất này không thuộc nhóm alcaloid là nhóm hợp chất chính trong củ dòm, tác dụng sinh học đã được công bố của các hợp chất này cũng tương đối khác biệt so với định hướng nghiên cứu của luận án, nên luận án không lựa chọn 3 hợp chất này cho trong các nghiên cứu tiếp theo về định lượng cũng như đánh giá tác dụng sinh học.

Như vậy luận án đã chiết xuất phân lập được 11 hợp chất, trong đó có:

+ 02 hợp chất alcaloid mới, lần đầu tiên được phân phân lập từ tự nhiên, được đề nghị đặt tên là **Stedieltin A (SD1)** và **Stedieltin B (SD2)**

+ 01 hợp chất alcaloid lần đầu tiên được phân lập từ chi *Stephania* Lour. là **aristolactam (SD6)**

+ 01 hợp chất alcaloid lần đầu tiên được phân lập từ loài củ dòm là oxostephanosin (SD4)

+ 01 hợp chất alcaloid lần đầu tiên được phân lập từ phần thân lá của cây củ dòm (đã phân lập được từ phần củ) là **oxocrebanin (SD5)**

+ 03 hợp chất alcaloid là **oxostephanin (SD3), crebanin (SD7)** và **dehydrocrebanin (SD8)** phù hợp với các kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học của củ dòm trên thế giới và tại Việt Nam.

+ 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 dòm.

Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học này đã góp phần làm phong phú kho tàng các hợp chất thiên nhiên nói chung, chi Stephania nói riêng, cụ thể: luận án đã đưa tổng số alcaloid phân lập được từ củ và thân lá loài S. dielsiana cho đến nay là 31 alcaloid, nhiều hợp chất trong đó mới công bố ở Việt Nam. Trong số các hợp chất alcaloid có trong củ dòm, có 5 hợp chất là stephanin, Ltetrahydropalmatin, crebanin, O-methylbulbocapnin, oxostephanin được tìm thấy trong cả thân lá và củ; 7 hợp chất mới được tìm thấy trong thân lá là palmatin, thailandin, dehydrocrebanin, oxotephanosin, aristolactam, stedieltin A và stedieltin B, còn lai là các hợp chất được tìm thấy trong củ. Như vậy thành phần hoá học của phần củ và phần thân lá cây củ dòm đã có những điểm khác biệt đáng kể, cần có những nghiên cứu sâu hơn để đánh giá so sánh, từ đó có thể định hướng các nghiên cứu về chuyển hoá của các hợp chất trong thực vật. Luận án cũng đã bổ sung 4-hydroxybenzaldehyd; benzyl β -D-glucopyranosid và (6R,9S)-roseosid vào danh mục các hợp chất khác có trong chi Stephania Lour. nói chung và loài củ dòm nói riêng. Kết quả nghiên cứu của luận án là cơ sở khoa học để nghiên cứu phát triển thành sản phẩm bổ trợ, chăm sóc sức khỏe nhân dân từ loài củ dòm. 4.2. VỀ BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU XÂY DƯNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỂ THEO DÕI HÀM LƯỢNG OXOSTEPHANIN TRONG DƯỢC LIÊU THEO THỜI GIAN THU HÁI 4.2.1. Về phân lập và sơ bộ đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin

Với các kết quả nghiên cứu đã công bố về tác dụng sinh học của oxostephanin, nhận thấy đây là một hợp chất có tiềm năng trong điều trị ung thư, luận án tiến hành chiết tách hợp chất này với số lượng đủ lớn để phục vụ các nghiên cứu về đánh giá tác dụng cơ chế gây độc tế bào của nó.

Trong phương pháp chiết tách oxostephanin, để chiết lấy toàn bộ thành phần của dược liệu thì dung môi thích hợp nhất là methanol hoặc ethanol 80-95%. Methanol được xem là dung môi đa năng vì nó có khả năng hòa tan được nhiều nhóm chất không phân cực, đồng thời dung môi này cũng có thể tạo cầu nối hydro để có thể hòa tan nhóm chất phân cực khác. Thêm vào đó, giá thành của methanol và quá trình loại dung môi trong dung dịch chiết là những ưu điểm nổi bật của dung môi này. Phương pháp chiết phân lập oxostephanin gồm 6 bước, chia thành 4 giai đoạn, gồm: (1) chiết xuất tạo cao tổng methanol của củ dòm; (2) loại tạp tạo cao giàu alcaloid thô (bằng ethyl acetate và petroleum ether kết hợp với chuyển dạng muối chloride- base alcaloid); (3) Tạo cắn giàu alcaloid đã làm giàu oxostephanin bằng chiết phân bố với chloroform và ethyl acetate; (4) tinh chế kết tinh tạo oxostephanin. Trong phương pháp chiết xuất và phân lập oxostephanin đã xây dựng được, ở giai đoạn 2 cao chiết methanol được áp dụng cả phương thức đặc trưng của chiết xuất alcaloid bởi chuyển dang base-muối bằng HCl 10% và dung dịch NH4OH bão hòa, đồng thời với chiết phân đoan loại tạp bằng dãy các dung môi hữu cơ có độ phân cực khác nhau từ petroleum ether, chloroform, ethyl acetate quan chiết phân bố lỏng-lỏng. Dưa vào đô tan khác nhau của muối chloride alcaloid trung gian được tạo bởi thêm HCl 10% đến pH 4-5 so với những chất khác ngoài alcaloid trong củ dòm, ethyl acetat được sử dụng trong chiết phân bố lỏng-lỏng có thể giúp loại bỏ phần lớn những nhóm chất có thể có như phenolic, flavonoid...Sự chuyển dạng từ muối chlorid alcaloid sang dạng base của alcaloid trong bước tiếp theo của phương pháp bằng NH₄OH đến pH 9-10, và sử dụng petroleum ether trong chiết phân bố có thể giúp ích trong việc loại bỏ những chất ngoài alcaloid còn sót lại như các mảnh thủy phân của glycoside phenolic, chlorophyll.... trong dich chiết củ dòm, và tao ra phân đoan cao alcaloid tổng. Tiếp theo dựa vào đặc tính phân bố, khả năng hòa tan khác nhau trong dụng môi của từng alcaloid có thể có trong hỗn hợp tổng để dần làm giàu oxostephanin trong alcaloid tổng (giai đoan 3). Sử dung chloroform để giảm bớt sư đa dang của alcaloid trong hỗn hợp. Từ thực nghiệm cho thấy oxostephanin tan trong chloroform ít hon nhiều trong ethyl acetat. Trong khi đó, chloroform lại có thể có khả năng đáng kể hòa tan nhiều loại alcaloid khác nhau [146]. Do vậy, chloroform đã được sử dụng như một dung môi tinh chế loại bớt alcaloid trong hỗn hợp nhằm làm giàu oxostephanin trong hỗn hợp. Cắn giàu oxostephanin được tiến hành kết tinh nhiều lần trong hỗn hợp methanol/ethanol (1:2) để thu được oxostephanin tinh khiết (giai đoạn 4).

So sánh phương pháp chiết tách oxostephanin và phân lập oxostephanin (SD3) trong phần nghiên cứu thành phần hóa học thấy rằng: Ưu điểm của phương

pháp chiết tách oxostephanin là tương đối đơn giản, dễ thực hiện và cho phép phân tách được hợp chất oxostephanin ra khỏi hỗn hợp nhiều chất bằng cách kết tinh lại, mà không cần sử dụng hệ thống cột sắc ký và phân đoạn. Thêm vào đó lượng oxostephanin thu được nhiều hơn với 4 g / 5 kg dược liệu, trong khi đó với 7 kg được liệu nghiên cứu thành phần hóa học chỉ phân lập được 8,6 mg. Điều đó chứng tỏ giai đoạn làm giàu oxostephanin của phương pháp chiết này có hiệu quả tốt. Với mục đích chiết xuất oxostephanin đơn giản nhất, có thể sử dụng rộng rãi thì đây là phương pháp có khả năng ứng dụng cao, có thể áp dụng để sản xuất chất đối chiếu, với giá thành hợp lý. Tuy nhiên, từ kết quả nghiên cứu định lượng trong thân lá cho thấy hàm lượng oxostephanin có thể có hàm lượng (%) từ 0,320-0,873. Nếu như vậy thì với 5 kg thân lá củ dòm có thể có khoảng hơn 20 gam oxostephanin, nhưng phương pháp chỉ lấy được 4 g chất này. Từ tính toán sơ bô, cho thấy rằng hiệu suất phân lập của phương pháp còn thấp, vậy có sự mất của oxostephanin trong các bước/giai đoạn của quá trình tinh chế, như sử dụng chloroform để làm giàu, lượng oxostephanin còn có thể tồn trong nước cái kết tinh. Do vậy, cho dù phương pháp chiết xuất này có ưu điểm đơn giản, có thể được nâng cấp thực hiện với quy mô lớn, nhưng cần tiếp tục nghiên cứu xây dựng cải tiến để đạt hiệu suất chiết xuất cao hơn, hiệu quả hơn mà không cần sử dụng các bước phân tách truyền thống qua sắc ký cột hoặc sắc ký điều chế cũng như các phương pháp phân tích khác, giảm được giá thành cũng như tăng hiệu suất thu được hợp chất oxostephanin tinh khiết.

Bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, oxostephanin thu được có độ tinh khiết khoảng 98,5% (tính theo diện tích pic). Hợp chất này được sử dụng làm cho nghiên cứu đánh giá sự thay đổi hàm lượng hoạt chất theo thời điểm thu hái và là nguyên liệu cho các đánh giá *in vitro* về tác dụng và cơ chế gây độc tế bào tiếp theo. Hiện nay trên thế giới và tại Việt Nam đều chưa có chuẩn oxostephanin để phục vụ việc nối chuẩn trong phân tích. Tuy nhiên do hạn chế về thời gian và điều kiện thực nghiệm nên luận án chưa tiến hành được việc thiết lập chất chuẩn oxostephanin. Do vậy cần có các nghiên cứu chiết tách oxostephanin với lượng lớn hơn đáp ứng yêu cầu của thiết lập chuẩn cũng như làm nguyên liệu cho các nghiên cứu đánh giá tác dụng *in vitro* và *in vivo*.
Như đã bàn luận ở trên, oxostephanin là alcaloid đã được chiết xuất, phân lập và tinh chế từ cây củ dòm với nhiều tác dụng sinh học đáng lưu ý, đặc biệt là tác dụng kháng ung thư. Luận án đã điều chế được 4,0 g oxostephanin phục vụ các nghiên cứu về thành phần hoá học và tác dụng sinh học. Nhận thấy đây là hợp chất có lượng chiết được tương đối lớn, tác dụng sinh học tốt, sau khi tham khảo các tài liệu, luận án lựa chọn oxostephanin là chất so sánh để đánh giá sự thay đổi hàm lượng theo thời gian thu hái.

4.2.2. Về xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng

* Khảo sát bước sóng phát hiện

Oxostephanin có khả năng hấp thụ UV tốt do có hệ thống vòng thơm. Quét phổ tử ngoại trong khoảng 200 – 800 nm cho thấy oxostephanin có hình thái và các đỉnh hấp phụ cực đại/ cực tiểu tương đồng với công bố trước đó [12]. Tham khảo tài liệu [12], [13] tiến hành định lượng oxostephanin ở bước sóng 254 nm. Thực tế quá trình khảo sát cho thấy tại bước sóng 256 nm thì tín hiệu pic cao nhất và ổn định. Vì vậy luận án quyết định giữ nguyên bước sóng 254 nm ($\lambda_{max} \pm 2$ nm) như tài liệu tham khảo để tiến hành định lượng oxostephanin.

* Khảo sát pha động

Sau khi tham khảo các công bố trước đây, với định lượng oxostephanin bằng phương pháp HPLC, luận án tiến hành khảo sát 3 pha động gồm pha động A: MeOH : acid formic 0,1% (tỷ lệ 35:65, v/v); pha động B: ACN: H₂O (tỷ lệ 80:20, v/v) và pha động C gồm kênh A: ACN (0.1% acid formic v/v), kênh B: H₂O (0.1% acid formic, v/v) với gradient nồng độ.

Với pha động C, thời gian lưu của oxostephanin tương đối ngắn hơn so với 2 pha động còn lại, song sử dụng gradient nồng độ phức tạp hơn so với chế độ đẳng dòng. Pha động B cho thời gian lưu của oxostephanin dài hơn hẳn (khoảng 21 phút) gây kéo dài thời gian phân tích. Trong khi đó pha động A gồm MeOH : acid formic 0,1% (tỷ lệ 35:65, v/v) cho sắc ký đồ cân đối, thời gian lưu (khoảng 14 phút) đã hợp lý hơn. Do vậy luận án lựa chọn pha động A cho các nghiênc ứu tiếp theo.

So sánh với phương pháp của Nguyễn Quốc Huy và các cộng sự [13] thì phương pháp trong luận án có ưu điểm không chạy gradient nên đường nền ổn

định hơn, thời gian sắc ký ngắn hơn 10 phút nên tiết kiệm được thời gian, hóa chất dung môi.

* Khảo sát phương pháp xử lý mẫu

Về thu hái mẫu nghiên cứu: Nguyên liệu phục vụ 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. Thực hiện trồng trọt và chăm sóc theo khuyến cáo của vườn giống gốc. Thu hái phần thân lá non (đoạn thân lá dài khoảng 1m tính từ đầu ngọn), bắt đầu từ tháng thứ 6 sau khi trồng. Yêu cầu thu hái mẫu này có được sau khi tham khảo nghiên cứu của Nguyễn Quốc Huy năm 2015 [10], theo đó bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) đã xác định được hàm lượng oxostephanin cao nhất ở phần thân lá non của cây.

Lựa chọn dung môi chiết: Từ tính chất lý hóa của oxostephanin là tan tốt hơn trong MeOH, kết hợp tham khảo [13] nên luận án quyết định lựa chọn MeOH làm dung môi chiết. Tuy nhiên MeOH là một dung môi chiết không chọn lọc, có thể hòa tan được nhiều chất, do đó quá trình khảo sát sắc ký phải dùng cả dung dịch thử để xác định pic tạp có ảnh hưởng đến pic của oxostephanin hay không.

Trong nghiên cứu của Nguyễn Quốc Huy và cộng sự [13] sử dụng phương pháp chiết lỏng - lỏng để tách và định lượng phần có chứa oxostephanin. Quá trình xử lý mẫu này phải trải qua bước chuyển dạng alcaloid base và chiết lỏnglỏng với chloroform, dẫn đến có thể gây sai số phân tích qua từng bước chuẩn bị mẫu, cho dù thu được mẫu thử sạch. Trong khi đó, luận án đã xử lý mẫu với một dung môi duy nhất là methanol, và một bước chiết tương đối đơn giản, dễ thực hiện, nên tránh được sai số hơn so với chiết lỏng - lỏng, tuy mẫu thu được là dạng cao toàn phần, nhưng chương trình phân tích vẫn đảm bảo tách pic tạp ra khỏi pic oxostephanin.

Luận án khảo sát lại các thông số như số lần chiết, lượng dung môi chiết và thời gian chiết để chọn được phương pháp chiết tối ưu. Kết quả khảo sát cho thấy điều kiện xử lý mẫu tối ưu là chiết 3 lần/ 3 giờ (mỗi lần 1 giờ) với tổng tỉ lệ dung môi/ dược liệu là 200 : 1 (ml/g). Xác định các thông số của quá trình xử lý mẫu cũng là việc làm cần thiết để tránh những sai số có thể gặp phải trong quá trình định lượng.

* Thẩm định phương pháp phân tích

Theo "Hướng dẫn ASEAN về thẩm định quy trình phân tích" [107] và AOAC [108] sau khi khảo sát điều kiện sắc ký và điều kiện xử lý mẫu, luận án tiến hành thẩm định lại theo tiêu chí của AOAC và Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích. Kết quả thẩm định đã đáp ứng được các tiêu chí của AOAC với độ ổn định hệ thống tốt, khoảng tuyến tính rộng, có tính đặc hiệu cao, độ đúng và độ chính xác cao, có khả năng ứng dụng tốt trong các phòng thí nghiệm.

4.2.3. Về sự thay đổi hàm lượng oxostephanin theo thời gian thu hái

Vì điều kiện khách quan, chỉ lấy được mẫu dược liệu của 9 tháng và không lấy được mẫu của 3 tháng còn lại (tháng 6, tháng 7 và tháng 8). Bởi thời điểm này trong năm 2020 thời tiết quá nắng nóng, mà củ dòm là một cây ưa bóng nên cây bị lụi và không thể thu hái được. Do đó luận án chỉ đưa ra được kết quả sơ bộ về thời điểm thu hái để hàm lượng oxostephanin cao nhất là vào khoảng giữa tháng 9 đến giữa tháng 10. Với các tháng còn lại, hàm lượng hoạt chất thay đổi từ 0,337 – 0,611 % (tính theo khối lượng dược liệu khô tuyệt đối) cho thấy có sự thay đổi đáng kể về hàm lượng hoạt chất theo thời gian thu hái. Tuy nhiên do điều kiện bị ảnh hưởng nghiêm trọng của dịch bệnh, nghiên cứu chưa đánh giá được ảnh hưởng của các yếu tố trong quá trình trồng trọt như mật độ trồng, chất đất, chế độ chăm sóc và tưới tiêu, độ che phủ (do cây không chịu được ánh nắng gay gắt), ... có thể làm ảnh hưởng đến hàm lượng của hoạt chất. Do đó cần có các nghiên cứu kỹ hơn về các khía cạnh trên, tiến tới xây dựng mô hình trồng trọt củ dòm theo tiêu chuẩn GACP.

Trong khuôn khổ theo dõi động thái tích lũy sinh trưởng trong thân lá của củ dòm trồng ở Bắc Giang, luận án cho kết quả hàm lượng oxostephanin trong thân lá từ 0,337 - 0,873 (%) tùy vào thời gian thu hái. Luận án ghi nhận thời điểm hàm lượng cao nhất là tháng 9 và tháng 10 (0,873 và 0,819 %), hàm lượng thấp vào đầu tháng 2 (0,353%) và tháng 3 (0,337%). Sự biến động hàm lượng trong thời gian từ tháng 2 (0,353 đến 0,611 %) đến tháng 5 (0,430 – 0,597 %) có thể dự đoán rằng, thời tiết mùa đông-xuân, rồi xuân-hè cùng với thời điểm cây sinh trưởng ra hoa, tạo quả có ảnh hưởng không nhỏ đến tích lũy hoạt chất oxostephanin. Luận án đã không lấy mẫu của thời điểm tháng 4 và tháng 6, tháng

7, bởi trên theo dõi thực tế sinh trưởng của phần thân lá cây củ dòm cho thấy rằng: (1) tháng 4 sẽ vào thời điểm ra hoa, không nên thu hái mẫu do ảnh hưởng phát triển của cây; (2) tháng 6 và 7 thân lá củ dòm bị táp nắng do ảnh hưởng thời tiết nắng nóng mùa hè, nên sức cây yếu, không thể thu hoạch được mẫu. Do vậy nghiên cứu động thái tích lũy giúp cho đưa ra thời điểm thu hoạch thân lá hợp lý vào tháng 9 và tháng 10 khi cây củ dòm vừa đảm bảo sinh khối và hàm lượng oxostephanin.



Tháng 4/2020





Tháng 7/2020



Tháng 9/2020Tháng 10/2020Hình 4.1. Hình ảnh cây củ dòm qua một số thời điểm

Nghiên cứu định lượng oxostephanin trong thân lá củ dòm bằng phương pháp HPTLC của Nguyễn Quốc Huy [14], cho thấy trong thân lá non có thể có hàm lượng oxostephanin từ 0,7892 – 1,5221 (%), trong thân lá bánh tẻ có từ 0,7509 - 0,8579 (%), và trong thân lá già từ 0,3257 - 0,5248 (%). Trong khi đó, nghiên cứu định lượng bằng HPLC mẫu lá thì thu hái vào tháng 4 là thời điểm cây đang ra hoa, kết quả nên hàm lượng hoạt chất thu được tương đối cao (0,873 %) [13]. Tuy nhiên nếu thu vào thời điểm này có thể ảnh hưởng đến khả năng nhân giống của cây củ dòm. Điều này cần phải hết sức cân nhắc trong quá trình thu hái do hiện nay củ dòm vẫn đang được xếp vào danh mục VU (sắp nguy cấp) trong Sách đỏ Việt Nam [2], vẫn cần có đầu tư nghiên cứu mở rộng vùng trồng phục vụ sản xuất các sản phẩm trong tương lai.

Sự khác biệt trong kết quả thu được giữa hai phân tích hàm lượng bằng HPTLC và HPLC cho thấy sự khác biệt bởi đặc hiệu của phương pháp, và đồng thời mẫu thu hái của nghiên cứu trước đó lại không chỉ rõ thời điểm mà chỉ phân loại theo tình trạng mẫu. Nên kết quả thu được của luận án là không mâu thuẫn với các nghiên cứu trước của tác giả khác.

Ngoài định lượng các mẫu thu hái tại Bắc Giang luận án còn tiến hành định lượng một số mẫu thu hái tại Quản Bạ - Hà Giang và Ba Vì – Hà Nội là hai vùng có đồng bào dân tộc Dao sử dụng củ dòm trong chữa bệnh và chăm sóc sức khoẻ. Do số lượng mẫu tại hai địa điểm này còn hạn chế nên vẫn chưa đủ thông tin để đưa ra kết luận hàm lượng của oxostephanin. Tuy nhiên cũng có thể sơ bộ nhận thấy với mẫu thân lá củ dòm thu vào tháng 3/2019 ở hai địa điểm chưa có sự khác biệt về hàm lượng oxostephanin, nhưng ở mỗi mẫu, oxostephanin trong lá cao hơn rất nhiều so với trong thân.

So sánh cùng mùa thu hái (tháng 3) thì mẫu thu hái vào tháng 3/2020 ở Bắc Giang có hàm lượng oxostephanin là 0,337%, khác biệt không đáng kể so với mẫu thu hái vào tháng 3/2019 tại Quản Bạ (Hà Giang) và Ba Vì (Hà Nội) (hàm lượng oxostephanin lần lượt là 0,32 và 0,34%). Cùng thời điểm thu hái vào tháng 5/2020, không có sự khác biệt đáng kể về hàm lượng oxostephanin trong mẫu thu hái tại Bắc Giang và Ba Vì. Tuy nhiên, đối với mẫu thu hái tháng 10/2020, sự khác biệt về hàm lượng oxostephanin có thể đến từ sự sai khác về khí hậu của hai vùng trong thời gian này. Ngoài ra cũng cần nhắc đến những sai khác có thể xảy ra trong quá trình thu hái và bảo quản mẫu bởi vì mẫu thu hái ở Bắc Giang phục vụ cho quá trình phân tích động thái tích luỹ oxostephanin trong năm, còn mẫu ở Ba Vì được thu và sơ chế bởi người trồng.

Thông qua quan sát trong quá trình thu hái mẫu tại Bắc Giang, nếu thu hái cả thân và lá thì các mầm cây mới nảy nhiều hơn, lần thu hái tiếp theo trên cùng cây sẽ được nhiều dược liệu tươi hơn (nếu không có tác động bất lợi của thời tiết). Còn nếu chỉ hái lá mà không thu thân, nhiều trường hợp cây có thể bị lụi dần và thậm chí chết cả cây. Tuy nhiên các nhận định này mới dừng ở quan sát, chưa có các đánh giá định lượng cụ thể. Cần có các nghiên cứu đầy đủ về giống dược liệu, quy trình trồng trọt, thu hái, sơ chế và chế biến dược liệu (nếu có) để có thông tin đầy đủ hơn nhằm phát triển vùng trồng dược liệu này theo hướng GACP, phục vụ sản xuất các sản phẩm từ củ dòm.

4.3. VỀ 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

4.3.1. Tác dụng gây độc tế bào của một số hợp chất đã phân lập

Các nghiên cứu của Đào Đức Thiện [41] và James Knockleby [42] đánh giá tác dụng gây độc tế bào trên in vitro của oxostephanin đều sử dụng phương pháp so màu SRB. Ngoài ra thử nghiệm MTT (3- (4,5- dimethylthiazol - 2- yl) -2,5 - diphenyl tetrazolium bromid) cũng là một phương pháp so màu phố biển trong nghiên cứu thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư. Trong thử nghiệm SRB, sau khi nuôi cấy và ủ thuốc, môi trường được loại bỏ trước khi nhuôm với SRB [121]. Còn với thử nghiệm MTT, sản phẩm formazan khử của MTT là tinh thể kết tủa và cần hoà tan tinh thể trước khi đo quang ở 570 nm [147]. So với phương pháp SRB và MTT, phương pháp dùng muối vàng tetrazolium (MTS) cải tiến có ưu điểm là có tính tiện lợi cao, có thể thực hiện trực tiếp trên đĩa 96 giếng không cần rửa hoặc thu tế bào, tránh được sai số do thao tác trong quá trình rửa, thu chuyển tế bào có thể gây ra. Do đó phương pháp MTS có thể được sử dụng kiểm tra độc tính để sàng lọc thuốc với số lượng lớn, trên nhiều nồng độ thuốc khác nhau. Kết quả thu được cho ra giá trị IC₅₀ - là giá trị nồng độ chất thử tại đó chất thử có khả năng gây chết 50% tế bào. IC₅₀ càng thấp nghĩa là khả năng ức chế của mẫu thử càng cao, từ đó đánh giá được độ độc của thuốc cần nghiên cứu.

Luận án đánh giá tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư của 5 alcaloid phân lập được là **SD1 – SD5** bằng hình thái tế bào và bằng phương pháp MTS. Các điều kiện nuôi cấy tế bào và đánh giá độc tính trên *in vitro* được thực hiện trên sự tham khảo từ những nghiên cứu trước đây cũng như theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI).

Phương pháp đánh giá hình thái tế bào bước đầu có thể dự đoán nồng độ có khả năng gây độc đối với tế bào của các chất thử dựa vào quan sát sự biến dạng tế bào, mật độ và khả bám dính ở bề mặt nuôi cấy. Phương pháp này có ưu điểm là đơn giản, dễ thực hiện và không tốn nhiều thời gian do chỉ cần quan sát hình ảnh dưới kính hiển vi soi ngược để định tính mức độ ảnh hưởng của chất thử lên từng dòng tế bào. Do đó để tiến hành đánh giá tác dụng gây độc tế bào số lượng lớn với nhiều dòng tế bào, nhiều hợp chất khác nhau với dải nồng độ rộng trên cùng một thời điểm có thể sử dụng phương pháp đánh giá hình thái tế bào để thu được kết quả dự đoán nhanh. Còn phương pháp thử MTS được sử dụng để định lượng số tế bào chết và xác định giá trị IC₅₀ nên kết quả thu được có độ nhạy, độ chính xác cao.

Trong số 5 alcaloid phân lập được, hợp chất SD3 (oxostephanin) có độc tính mạnh trên cả 5 dòng tế bào ung thư thử nghiệm: HeLa, HepG2, MCF7, N87 và OVCAR-8. Theo tiêu chuẩn của Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), các chất tinh khiết được được coi là có hoạt tính mạnh khi IC₅₀ \leq 5µM [112]. Giá trị IC₅₀ của **SD3** trên các dòng tế bào đều khá thấp, đặc biệt trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 (IC₅₀ = $3,2\mu$ M), tế bào ung thư vú MCF7 (IC₅₀ = $3,1\mu$ M) và tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 (IC₅₀ = $3,4\mu$ M) đều nhỏ hơn 5μ M. So sánh với nghiên cứu năm 2018, Đào Đức Thiện và cộng sự phân lập được 7 alcaloid từ thân lá loài S. dielsiana Y.C.Wu là: tetrahydropalmatin, stephanin, crebanin, Omethylbulbocapnin, oxostephanin, palmatin và thailandin và thử tác dụng gây độc tế bào trên 2 dòng tế bào ung thư (BT474 và HCT116). Kết quả cho thấy, oxostephanin có tác dụng gây độc đối với 2 dòng tế bào ung thư này với giá trị IC₅₀ lần lượt là 9,53 và 8,54 μg/mL [41]. Năm 2020, James Knockleby và cộng sự cũng đã phân lập được 7 hợp chất alcaloid trên từ lá của cây củ dòm và tiến hành thử tác dụng gây độc tế bào trên một số dòng tế bào ung thư (HeLa, MDA-MB231, MDA-MB-468 và MCF7) và hai dòng tế bào non-cancer (184B5 và MCF10A). Kết quả cho thấy, oxostephanin thể hiện tác dụng gây độc mạnh nhất trên các dòng tế bào HeLa, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng 1,76 - 4,35 μ M [42]. Như vậy kết quả nghiên cứu của luận án tương đối phù hợp với các nghiên cứu về độc tính trên các dòng tế bào ung thư thực nghiệm trước đây trên thế giới và ở Việt Nam.

Hợp chất **SD4** (oxostephanosin) có hoạt tính trên hai dòng tế bào ung thư buồng trứng (OVCAR-8) và ung thư dạ dày (N87) với IC₅₀ tương ứng là 30 ± 1,4µM và 66,1 ± 0,9µM. Riêng đối với dòng ung thư vú (MCF7), **SD4** không thể hiện độc tính và dòng ung thư gan (HepG2), hợp chất này thể hiện tác dụng gây độc yếu với IC₅₀ là 122,9 ± 5,7µM. Hiện nay nghiên cứu về tác dụng sinh học của hợp chất này chưa nhiều, mới chỉ có Ziming Lu và cộng sự, bằng phương pháp MTT, cho thấy hoạt tính gây độc tế bào ở mức trung bình (IC₅₀ khoảng 1 mg/L) trên 5 dòng tế bào ung thư thực nghiệm của hợp chất này [131]. Đây là lần đầu tiên phân lập được hợp chất này từ củ dòm, cần có các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá kỹ hơn về tác dụng của oxostephanosin.

Hợp chất **SD5** (oxocrebanin) thể hiện hoạt tính gây độc yếu trên hai dòng tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) và ung thư dạ dày (N87) với IC₅₀ tương ứng là $160,3 \pm 9,1\mu$ M và $115,3 \pm 1,34\mu$ M. Luận án chưa xác định được IC₅₀ của **SD5** trên dòng tế bào MCF-7. Điều này có sự khác biệt đáng kể so với nghiên cứu của Lei Yu và cộng sự năm 2021 [46]. Thông qua kết quả của thử nghiệm MTT, oxocrebanin thể hiện hiệu quả ức chế tốt nhất trên tế bào MCF-7 với IC₅₀ là 16,66 µmol/l, và chỉ có tác dụng yếu đối với sự tăng sinh của tế bào MCF-10A. Hợp chất này cũng đã được chứng minh cơ chế gây độc tế bào có liên quan đến điều chỉnh mức độ Topo I và IIα và các protein liên quan đến tổn thương DNA, ngăn cản quá trình nguyên phân thông qua cả hai con đường phụ thuộc p53 và không phụ thuộc p53. Đây được coi là hợp chất có tiềm năng trong điều trị ung thư vú. Kết quả của luận án có sự khác biệt so với công bố trên thế giới có thể do phương pháp đánh giá khác nhau (sử dụng thử nghiệm MTS thay cho thử nghiệm MTT) hoặc cũng có thể do các nguyên nhân khác nữa, song do lượng hợp chất thu được tương đối nhỏ (3,5 mg) nên luận án chưa có điều kiện nghiên cứu sâu hơn về chất này.

Hợp chất **SD1 (stedieltin A)** và **SD2 (stedieltin B)** chưa thể hiện độc tính trên đến bất kỳ dòng tế bào thử nghiệm nào trong tổng số 5 dòng sử dụng trong nghiên cứu, luận án chưa thể xác định được giá trị IC_{50} của 2 chất này.

Nhận thấy các hợp chất **SD3**, **SD4** và **SD5** có một số điểm tương đồng về cấu trúc hoá học, tuy nhiên hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư thử nghiệm của **SD3** (oxostephanin) tốt hơn so với **SD4** (oxostephanosin) có thể do sự xuất hiện của gốc methyl hoá ở vị trí C8 dẫn đến làm giảm độ phân cực của **SD3** so với **SD4**. Từ đó có thể dẫn đến tăng khả năng thẩm thấu của **SD3** vào tế bào gây ra độc tính với tế bào. Sự xuất hiện thêm của một nhóm methoxy ở vị trí C9 trong **SD5** (oxocrebanin) so với **SD3** có thể làm ảnh hưởng đến cấu trúc không gian của hợp chất, ảnh hưởng đến hoạt lực của độc tính tế bào. Giá trị IC₅₀ của **SD5** trên các dòng tế bào ung thư thử nghiệm đều cao hơn so với **SD4** cũng có thể do ảnh hưởng của cấu trúc không gian này.

So sánh hai hợp chất **SD1** (stedieltin A) và **SD3**, có thể nhận thấy sự mở vòng C đã ảnh hưởng đến góc quay của phân tử có thể dẫn đến sự không ổn định của cấu trúc không gian, gây ra giảm hoạt lực của **SD1** so với **SD3**. **SD2** (stedieltin B) duy trì hầu hết cấu trúc oxostephanin tuy nhiên vị trí C7 ở **SD3** liên kết với nhóm carbonyl đã được thay nguyên tử oxy, nói cách khác vòng C của **SD2** là dị vòng có một oxy. Điều này có thể là nguyên nhân dẫn đến hoạt lực của **SD2** kèm hơn rất nhiều so với **SD3**, hầu như không thể hiện tác dụng gây độc nào trên các dòng tế bào thử nghiệm.

Như vậy cần có những nghiên cứu đánh giá chặt chẽ hơn về mối liên quan giữa cấu trúc và tác dụng của các alcaloid phân lập được, đặc biệt là với những alcaloid có khung aporphin tương tự như oxostephanin.

Từ các kết quả trên cho thấy hợp chất oxostephanin có hoạt tính gây độc mạnh nhất trên hầu hết các dòng tế bào ung thư thực nghiệm đã được nghiên cứu, là hợp chất tiềm năng để phát triển các loại thuốc chống ung thư. Với các hợp chất **SD1, SD2** và **SD4**, luận án lần đầu tiên công bố tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất này, làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo. Cần có sự nghiên cứu thêm về tác dụng gây độc tế bào trên các dòng tế bào khác, hoặc nghiên cứu thêm các tác dụng khác có liên quan đến tác dụng chung của dược liệu như giảm đau, chống viêm, an thần, gây ngủ, giải lo âu, kháng khuẩn,...

4.3.2. Cơ chế tác dụng gây độc tế bào của oxostephanin

Vai trò quan trọng của Aurora kinase, đặc biệt là Aurora A và B, trong sự phân chia tế bào, cũng như sự biểu hiện quá mức của các kinase này trong một loạt các bệnh ung thư, khiến chúng trở thành mục tiêu tiềm năng trong điều trị ung thư. Oxostephanin chiết xuất từ loài *Stephania venosa* lần đầu tiên được Makarasen và cộng sự [43] báo cáo về hoạt động ức chế sự phát triển của nhiều dòng tế bào ung thư. Luận án thực hiện nội dung nghiên cứu cơ chế gây độc tế bào nhằm xác định đặc tính của oxostephanin, chiết xuất từ thân lá cây củ dòm *S. dielsiana* ở Việt Nam, như một chất ức chế Aurora mới bằng cách so sánh tác động theo thời gian thực của chất này trên tế bào ung thư với VX-680, một chất ức chế Aurora kinase nổi tiếng [103].

Dòng tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8 được sử dụng để kiểm tra tác dụng của oxostephanin, vì Aurora kinase đã được báo cáo là biểu hiện quá mức trong ung thư biểu mô buồng trứng, ngoài hai thử nghiệm lâm sàng gần đây đã sử dụng chất ức chế Aurora kinase để điều trị ung thư buồng trứng [148], [149], [150]. Trong nghiên cứu này, phân tích bằng cách sử dụng hệ thống xCelligence cho thấy các phản ứng tương tự của tế bào OVCAR-8 đối với cả hai hợp chất (oxostephanin và VX-680) trong các đường cong đáp ứng liều tăng trưởng theo thời gian thực, thời gian nhân đôi số lượng tế bào và thay đổi kích thước tế bào. Đáng chú ý, ở nồng độ oxostephanin được thử nghiệm thấp (< 5 μ M) và VX-680 (1 μ M), các tế bào trở nên dị bội với sự gia tăng về kích thước nhưng không tăng về số lượng. Nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng khi hoạt động của Aurora kinase bị ức chế, SAC phân bào sẽ được kích hoạt, dẫn đến bắt giữ nguyên phân. Tuy nhiên, SAC này có thể bị ghi đè, gây ra sự trượt phân bào của các tế bào trở nên dị bội hoặc đơn bội [151].

Kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy các tế bào OVCAR-8 được xử lý bằng oxostephanin và VX-680 ở nồng độ thấp biểu hiện nhân mở rộng và có thùy. Hơn nữa, như được thể hiện qua xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang, cả hai hợp chất đều điều hòa quá trình phosphoryl hóa protein histone H3 ở serine 10 trong tế bào ung thư. Những dữ liệu này phù hợp với nghiên cứu của Knockleby và cộng sự [42], chứng minh rằng oxostephanin ức chế H3S10ph trong tế bào HeLa. Vì quá trình phosphoryl hóa histone H3 ở serine 10 được coi là dấu hiệu của kinase Aurora B được hoạt hóa [152], [153], do đó oxostephanin có thể ngăn chặn chức năng của kinase này.

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng hoạt động của Aurora B có liên quan đến quá trình tự động phosphoryl hóa và phân phối trung tâm [42], [154]. Trong điều kiện bình thường, Aurora B phải tập trung tại kinetochore để phosphoryl hóa một số protein trong mạng phức hợp kinetochore KNL1/Mis12/phức hợp Ndc80 (KMN) bên ngoài được bảo tồn, đóng vai trò trong sự gắn kết kinetochore – vi ống [154], [155], [156]. Luận án đã chứng minh rằng oxostephanin ảnh hưởng đến khả năng đinh vi bình thường của Aurora B kinase; do đó, nó có thể ức chế hoạt động tự động phosphoryl hóa của enzym này. Với sự hiên diên của oxostephanin và VX-680, Aurora B khuếch tán đến tất cả các nhánh nhiễm sắc thể và trong tế bào chất. Hiện tượng này xảy ra trong tất cả các tế bào OVCAR-8 và HeLa sống và đã cố định. Bằng cách quan sát các tế bào HeLa sống biểu hiện Aurora B-GFP, nhận thấy rằng các tế bào có nhiễm sắc thể với Aurora B khuếch tán sẽ tồn tại lâu hơn trong hoán vị gen và cuối cùng trở thành thể dị bội. Hiện tượng này của Aurora B đã được đề cập với các chất ức chế khác [105], [114]. Điều này có thể được giải thích là do Aurora B không tập trung ở kinetochore, dẫn đến ảnh hưởng đến sự gắn chính xác của nhiễm sắc thể vào vi ống và sau đó kích hoạt SAC, do đó dẫn đến trượt phân bào. Hơn nữa, oxostephanin làm giảm sự biểu hiện của cả Aurora A và Aurora B ở cấp độ mRNA tương tư như VX-680. Việc giảm mức đô của các protein này góp phần gây ra các khiếm khuyết trong các chức năng phân chia tế bào.

Tổng hợp lại, những dữ liệu này chứng minh rằng oxostephanin là một chất ức chế Aurora kinase, và hợp chất này gây độc tế bào đối với các tế bào OVCAR-8 trong cả nuôi cấy đơn lớp và khối u đa bào. So sánh với nghiên cứu của Knockleby và cộng sự [42] đã chỉ ra tác dụng của oxostephanin trên cả Aurora A và Aurora B trong thử nghiệm kinase, tuy nhiên dòng tế bào được sử dụng là HeLa. Điểm mới đáng lưu ý của luận án là đã lần đầu tiên tập trung vào đánh giá ảnh hưởng của oxostephanin trên Aurora B trong tế bào OVCAR-8. Định hướng trong các nghiên cứu tiếp theo có thể tiếp tục thử nghiệm tác dụng của oxostephanin đối với Aurora A kinase trong nuôi cấy tế bào.

Các tài liệu tham khảo cho thấy tế bào gốc trung mô và nguyên bào sợi liên quan đến ung thư đã được chứng minh là có thể tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiến triển của khối u. Nghiên cứu gần đây đã tiết lộ chức năng của các tế bào gốc trung mô trong u nguyên bào thần kinh đệm kháng lại chất ức chế Aurora kinase, dẫn đến sự tái phát của các khối u [157]. Trong bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML), một cơ chế của tế bào gốc trung mô được sử dụng để bảo vệ tế bào bạch cầu khỏi các tác nhân hóa trị liệu là kích hoạt Aurora A bằng cách tăng tiết IL-6 [158]. Trong hệ thống nuôi cấy cùng môi trường, các nguyên bào sợi đã được chứng minh là gây ra sự điều hòa Aurora A trong ung thư biểu mô phổi không phải tế bào nhỏ để bảo vệ các tế bào ung thư khỏi việc điều trị bằng gefitinib [159], [160]. Nguyên bào sợi có thể được kích hoạt bởi Aurora B thông qua tín hiệu khối u Wilms 1, dẫn đến cảm ứng hình thành sơi [161]. Hơn nữa, sự điều hòa giảm của Aurora B kích thích sự già đi của tế bào trong hFBs [162]. Aurora kinase và tế bào mô đệm có tác dụng hiệp đồng đối với sự phát triển của tế bào ung thư. Thêm vào đó, sự hình thành mạch là cần thiết cho sự tiến triển của các khối u [163]. Do đó, luận án đã kiểm tra tác động của oxostephanin trên bốn loại tế bào (UC-MSCs, hFBs, hUVECs và OVCAR-8).

Đầu tiên, nhận thấy rằng tất cả các tế bào được thử nghiệm đều biểu hiện Aurora A và B rất cao, với mức độ biểu hiện cao nhất được quan sát thấy trong các tế bào OVCAR-8 và hUVEcs, tiếp theo là UC-MSCs và cuối cùng là hFBs. Theo đó, giá trị IC₅₀ của oxostephanin đối với các dòng tế bào này là thấp nhất trong các tế bào OVCAR-8 và hUVEC, cao hơn trong MSCs và cao nhất trong hFBs.

Hơn nữa, việc giảm các đơn vị hình thành khuẩn lạc chỉ ra rằng oxostephanin có thể ức chế sự tăng sinh của các tế bào tiền thân nội mô và nguyên bào sợi. Một hạn chế của nghiên cứu này là sự thể hiện của các khuẩn lạc cần được cải thiện vì không thể nhìn thấy vị trí của các khuẩn lạc tập hợp chặt chẽ. Tuy nhiên, số lượng các khuẩn lạc vẫn có thể được đếm. Ở nồng độ 5 μ M, oxostephanin ức chế đáng kể sự hình thành khuẩn lạc của hUVECs; tuy nhiên, tác dụng ức chế hình thành khuẩn lạc ít nổi bật hơn ở hFBs (~ 30% CFUs).

Ngoài ra, trong thử nghiệm chữa lành vết thương, oxostephanin cũng có tác dụng ức chế nổi bật hơn sự di chuyển của hUVECs so với hFBs. Những kết quả

này đã chứng minh hoạt tính chọn lọc của oxostephanin đối với hUVECs. Luận án tiếp tục lựa chọn tế bào hUVECs để đánh giá về ảnh hưởng của oxostephanin. Việc nhắm mục tiêu của hợp chất đến các loại tế bào khác nhau có thể là do sự biểu hiện của Aurora kinase trong các tế bào này. Mức Aurora kinase cao hơn có liên quan đến tác dụng nổi bật hơn của oxostephanin trên tế bào. Ngoài sự phát triển của tế bào, chức năng của hUVECs trong quá trình hình thành mạch cũng bị oxostephanin làm gián đoạn. Những tế bào này không thể tạo thành ống trong Matrigel khi có 5 µM oxostephanin. Tác dụng chống tạo mạch của các chất ức chế Aurora kinase đã được báo cáo trước đây [164] thông qua việc chúng tham gia vào một con đường truyền tín hiệu giúp tăng cường hình thành mạch [165] và ổn định N-Myc, một chất gây ung thư nổi tiếng [166], [167]. Những kết quả này chỉ ra rằng oxostephanin có chức năng như một chất ức chế hình thành mạch.

Hơn nữa, dữ liệu chỉ ra rằng oxostephanin làm giảm sản xuất VEGF-A, HGF và FGF-2, có chức năng trong quá trình tăng sinh, di chuyển và hình thành ống [168], [169], [170], [171], ở cả hUVECs và hFBs. Đáng chú ý, trong nghiên cứu này, ở hUVECs, sự biểu hiện mRNA của VEGF-A trong các tế bào được điều trị bằng oxostephanin không bị thay đổi đáng kể; tuy nhiên, sự biểu hiện của FGF-2 đã giảm đáng kể so với đối chứng. Hoạt động này của oxostephanin khác với VX-680, được chứng minh là có khả năng ức chế biểu hiện VEGF-A [164]. Tuy nhiên, sự giảm mức FGF-2 và HFG đủ để ức chế sự phát triển và chức năng của hUVECs.

Đáng chú ý, tác động của oxostephanin đối với sự bài tiết yếu tố tăng trưởng của tế bào vẫn chưa được làm rõ. Ngoài ra, sự tham gia của Aurora kinase trong quá trình hình thành mạch vẫn chưa được làm sáng tỏ. Tuy nhiên, có thể giả thuyết rằng các chất ức chế Aurora kinase, chẳng hạn như oxostephanin, gây độc tế bào đối với tế bào ung thư buồng trứng và tế bào nội mô, dẫn đến ức chế hình thành mạch khối u. Hơn nữa, mặc dù hợp chất này ít gây độc tế bào hơn đối với các tế bào mô đệm khác như hFBs và UC-MSCs, nhưng nó đã ngăn chặn các chức năng của tế bào có thể dẫn đến các tế bào mô đệm hoạt động kém hiệu quả trong việc hỗ trợ khối u phát triển. Giả thuyết này đã được khuyến khích bởi một nghiên cứu đã được công bố về hoạt tính chống khối u của chiết xuất phân đoạn methanol từ củ loài *S. dielsiana* trên chuột nhắt chủng Swiss mang khối u Sarcoma-180, cho

thấy khối lượng khối u giảm 4 lần ở những con chuột được điều trị [16]. Cần tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của oxostephanin *in vivo* bằng cách sử dụng các mô hình động vật được cấy ghép với tế bào khối u của người.

Như vậy, luận án đã lần đầu tiên công bố những kết quả nghiên cứu cụ thể về cơ chế tác dụng của hoạt chất oxostephanin trong thân lá cây củ dòm. Những phát hiện của nghiên cứu này chỉ ra rằng oxostephanin là một chất ức chế Aurora kinase tiềm năng. Nó ức chế sự gia tăng của các tế bào OVCAR-8 ung thư buồng trứng ở cả mô hình đơn lớp (mô hình 2D) và các khối u đa bào (mô hình 3D). Hơn nữa, oxostephanin thể hiện độc tính tế bào có chọn lọc đối với các tế bào bình thường bằng cách gây ra biểu hiện cao của Aurora kinase A và B. Ngoài ra, hợp chất này điều chỉnh giảm sự biểu hiện của các yếu tố tăng trưởng, ngăn chặn sự di chuyển của hUVECs và hFBs, và giảm sư hình thành ống. Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu sâu hơn để oxostephanin được phát triển như một loại thuốc chống ung thư. Hợp chất này cần được thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư buồng trứng khác, đặc biệt là các dòng tế bào sơ cấp, để xác nhận tác dụng của nó đối với bệnh ung thư buồng trứng. Ngoài ra, sự biểu hiện của Aurora A và B trong các loại tế bào khác nhau cần được định lượng bằng cách sử dụng các phương pháp hiệu quả, chẳng hạn như phân tích Western blot, để xác định mối liên hệ của biểu hiện Aurora kinase và tác động của oxostephanin. Quan trọng hơn, về lâu dài, các thí nghiệm sử dụng mô hình khối u in vivo cần được thực hiện để xác nhận hiệu quả của oxostephanin.

4.4. VỀ ĐÓNG GÓP MỚI 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 dòm (*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 dòm ở Việt Nam.

Những kết quả nghiên cứu về hóa học của củ dòm 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 dòm, 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 dòm ở 3 địa điểm khác nhau là Quản 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 được liệu củ dòm.

Một số alcaloid phân lập được từ thân lá củ dòm đã được sơ bộ đánh giá khả năng chống ung thư thông qua tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư gồm OVCAR-8, HeLa, MCF-7, N87 và HepG2. Trong đó oxostephanin thể hiện hoạt tính tốt nên cơ chế tác dụng kép ức chế Aurora kinase và sự hình thành mạch đã được chứng minh trên cả tế bào ung thư và tế bào thường.

Do vậy kết quả của luận án đã góp phần giải thích, chứng minh công dụng của được liệu thân lá củ dòm dựa trên căn cứ khoa học, làm sáng tỏ việc sử dụng cây thuốc này theo tri thức dân gian đưới 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 dòm giúp phát triển kinh tế cho người dân ở địa phương.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KÊT LUÂN

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 dòm *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 dòm (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 dòm.

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 dòm 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 dòm 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 dòm 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 IC₅₀ 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.

KIÉN 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 alcaloid khác được phân lập từ củ dòm 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 dòm và đánh giá tác dụng khác của loài này.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ

1. Tống Minh Thảo, **Trần Thị Thu Hiền**, Lê Hoàng Sơn (2019), Định lượng alcaloid trong phần trên mặt đất của cây củ dòm (*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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lã Đình Mõi, Trần Minh Hợi, Dương Đức Huyến và cộng sự. (2005). Chi Bình vôi -Stephania Lour. 1790. Tài nguyên thực vật Việt Nam - Những cây chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học. NXB Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 58-82.
- Viện Khoa học và công nghệ Việt Nam (2007). Phần II Thực vật. Sách đỏ Việt Nam. NXB. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tr. 284-288.
- 3. Zhang Y., Zhang S., Zhang H.-Y. et al. (2009). Chemical Constituents from *Stephania dielsiana*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **7**, 199–202.
- 4. Zhou D.-X., Liang Y., Liu X.-B. et al. (2018). Aporphine Alkaloids from *Stephania dielsiana*. *Chemistry of Natural Compounds*, **54**(**6**), 1202–1204.
- 5. Deng Y., Yu Y., Luo H. et al. (2011). Antimicrobial activity of extract and two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *Stephania dielsiana*. *Food Chemistry*, **124(4)**, 1556–1560.
- LIANG Yan, ZHOU Dexiong, XUE Jiajin et al. (2018). Non alkaloid Chemical Constituents from the Chinese Medical Plant Stephania dielsiana. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 36(1), 95–98.
- 7. Nguyễn Quốc Huy, Phạm Thanh Kỳ, Trần Văn On (2009). Đặc điểm thực vật của 2 loài bình vôi thuộc chi *Stephania* Lour. thu hái ở Ba Vì (Hà Nội) và Sapa (Lào Cai). *Tạp chí Dược học*, **104 (12/2009)**, tr. 33-38.
- Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Quốc Huy (2009). L-Tetrahydropalmatin, Oxostephanin và Dehydrocreabanin phân lập từ củ bình vôi *Stephania dielsiana* Y.C.Wu. *Tạp chí Dược liệu*, 1, tr. 23-27.
- Nguyễn Quốc Huy, Phạm Thanh Kỳ (2013). Phân lập và xác định cấu trúc của oxostephanin từ thân và lá loài bình vôi *Stephania dielsiana* Y. C. Wu. *Tạp chí Dược* học, 53(11), tr. 20-23.
- Nguyễn Vũ Minh, Nguyễn Quốc Huy, Phạm Thanh Kỳ và cộng sự. (2014). Phân lập và xác định cấu trúc của thailandin từ thân và lá loài bình vôi *Stephania dielsiana* Y.C.Wu. *Tạp chí Dược học*, **54**(2), tr. 26-29.
- Nguyễn Quốc Huy (2015). Phân lập và xác định cấu trúc của crebanin từ củ dòm (*Stephania dielsiana* Y. C. Wu). *Tạp chí Dược học*, **467-T3 (2015) (Tập 55)**, tr. 22-25.
- Nguyễn Quốc Huy (2014). Nghiên cứu thiết lập chất đối chiếu oxostephanin dùng trong kiểm nghiệm và nghiên cứu được liệu củ dòm (*Stephania dielsiana* Y.C.Wu). *Tạp chí Dược học*, 4, tr. 63-66.

- 13. Nguyễn Quốc Huy (2014). Định lượng oxostephanin trong củ dòm (*Stephania dielsiana* Y.C.Wu) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí Dược học*, **1**, tr. 28-31.
- 14. Nguyễn Quốc Huy (2015). Xây dựng phương pháp định lượng oxostephanin bằng HPTLC và định lượng một số mẫu củ, lá loài *Stephania dielsiana* Y.C.Wu trồng tại Ba Vì (Hà Nội). *Tạp chí Dược học*, **2**, tr. 29-33.
- 15. Nguyễn Quốc Huy (2015). Đánh giá tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư của các chất tinh khiết phân lập được từ loài *Stephania dielsiana* Y. C. Wu. *Tạp chí Dược học*, **55(1)**, tr. 28-31.
- Nguyễn Quốc Huy, Nguyễn Thị Minh Trang (2015). Thử hoạt tính in vivo của phân đoạn SM2 chiết từ loài *Stephania dielsiana* Y. C. Wu trên chuột nhất chủng Swiss mang khối u Sarcom 180. *Tạp chí Dược học*, **468-T4 (2015) (Tập 55)**, tr. 42-45.
- Nguyễn Quốc Huy, Hoàng Thị Mỹ Nhung (2014). Đánh giá tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư của các phân đoạn chiết từ củ dòm (*Stephania dielsiana* Y. C. Wu). *Tạp chí Dược học*, **54(12**), tr. 38-40.
- 18. Nguyễn Quốc Huy, Bùi Thị Vân Khánh (2015). Đánh giá ảnh hưởng của oxostephanin phân lập từ loài *Stephania dielsiana* Y.C.Wu lên quá trình chết theo chương trình (apoptosis) trên tế bào ung thư buồng trứng OVACR-8. *Tạp chí Nghiên cứu được và Thông tin thuốc*, 2/2015(6), tr. 25-29.
- Huy N.Q., Quan K.T., Hang N.T. et al. (2013). Experimental anxiolytic and sedative like activity of *Stephania dielsiana* Y.C.Wu. *Vietnam Journal of Medicine* & *Pharmacy*, 2(2)/2013, 60–66.
- Nguyễn Hoàng Anh, Khổng Trọng Quân, Đỗ Quyên và cộng sự. (2013). Nghiên cứu tác dụng giải lo âu thực nghiệm của *Stephania sinica* Diels. và *Stephania dielsiana* Y.C. Wu. *Tạp chí Dược liệu*, 3/2013(18), tr. 35-39.
- 21. Nguyễn Hoàng Anh, Lê Thị Giang, Nguyễn Thu Hằng và cộng sự. (2013). Nghiên cứu tác dụng an thần và chống trầm cảm trên động vật thực nghiệm của *Stephania sinica* Diels và *Stephania dielsiana* Y. C. Wu. *Tạp chí Dược học*, **53**(7), tr. 35-39.
- 22. Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Trọng Thông, Trần Thanh Tùng và cộng sự. (2009). Nghiên cứu tác dụng giảm đau, chống viêm của loài *Stephania dielsiana* Y.C.Wu thu hái ở Ba Vì (Hà Nội). *Tạp chí Dược liệu*, **6**, tr. 292-297.
- 23. Nguyễn Quốc Huy, Đào Thị Vui, Nguyễn Thuỳ Dương (2015). Nghiên cứu tác dụng chống viêm giảm đau của dịch chiết phân đoạn từ củ loài *Stephania dielsiana*

Y.C.Wu thu hái tại Ba Vì - Hà Nội. *Tạp chí Nghiên cứu được và Thông tin thuốc*, **1**, tr. 16-20.

- 24. Đỗ Quyên, Nguyễn Quốc Huy (2015). Nghiên cứu tác dụng ức chế acetylcholinesterase của một số loài thuộc chi *Stephania* Lour., họ Menispermaceae thu hái ở Việt Nam. *Tạp chí Dược học*, **468-T4 (2015) (Tập 55)**, tr. 27-30.
- 25. Takhtajan A. (1996). *Diversity and Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, 10, 11, 89.
- 26. Nguyễn Quốc Huy (2010), Nghiên cứu về thực vật, thành phần hóa học, một số tác dụng sinh học của một số loài thuộc chi Stephania Lour. ở Việt Nam, Luận án Tiến sĩ Dược học, Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.
- 27. Nguyễn Chiều (1982). Nghiên cứu xác định tên cây củ dòm. *Tạp chí Dược học*,
 Số 1, tr. 15-17.
- 28. Flora Republicae Popularis Sinicae (学报植物志) (1996). *Tomus 30 (1)*. Science Press, 40–70.
- 29. Hsuen Shui-Lo (1995). Stephania Loureiro. Flora of China. 15–27.
- 30. Index Kewensis (1886). *Tomus I*. Oxford University Press, 411.
- 31. Index Kewensis (1895). Tomus II. Oxford University Press, 991.
- 32. Index Kewensis (1904), Vol II-X, Oxford University Press.
- 33. Flora Yunnanica (Spermatophyta) (1983). Tomus 3. 241–254.
- 34. Flora of Thailand (1991). *vol. V* (3). 311–323.
- 35. Hooker f. and Thomson (1875). Menispermaceae. *Flora of British India, vol. I.* 94–95, 102–103.
- 36. Likuo Fu, Tanqing Chen (2000). *Stephania* Lour. *Higher plant of China, Vol 3*. Quingdao Publishing House, 610–618.
- Nguyễn Chiều, Ngô Văn Trại (1986). Nghiên cứu cây bình vôi ở Việt Nam. *Tạp chí Dược học*, 4, tr. 10-12.
- Võ Văn Chi (2004). Từ điển thực vật thông dụng. NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 2334-2340.
- Viện Dược liệu (2006). Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 547-548.
- 40. Viện Dược liệu (1993). *Tài nguyên cây thuốc Việt Nam*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 82-91.
- 41. Thien D.D., Thuy T.T., Huy N.Q. et al. (2018). Cytotoxic Alkaloids from *Stephania dielsiana*. *Chemistry of Natural Compounds*, **54**(**3**), 613–616.

- 42. Knockleby J., Pradines B., Gendrot M. et al. (2020). Cytotoxic and Anti-Plasmodial Activities of *Stephania dielsiana* Y.C. Wu Extracts and the Isolated Compounds. *Molecules*, **25**(16), E3755.
- 43. Makarasen A., Sirithana W., Mogkhuntod S. et al. (2011). Cytotoxic and antimicrobial activities of aporphine alkaloids isolated from *Stephania venosa* (Blume) Spreng. *Planta Medica*, **77**(**13**), 1519–1524.
- 44. Nantapap (2010). Antiproliferative Effects of Alkaloids Isolated from the Tuber of *Stephania venosa* via the Induction of Cell Cycle Arrest in Mammalian Cancer Cell Lines. *American Journal of Applied Sciences*, **7**, 1057–1065.
- 45. Wongsirisin P., Yodkeeree S., Pompimon W. et al. (2012). Induction of G1 Arrest and Apoptosis in Human Cancer Cells by Crebanine, an Alkaloid from *Stephania venosa. Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **60**(10), 1283–1289.
- 46. Yu L., Han S., Lang L. et al. (2021). Oxocrebanine: A Novel Dual Topoisomerase inhibitor, Suppressed the Proliferation of Breast Cancer Cells MCF-7 by Inducing DNA Damage and Mitotic Arrest. *Phytomedicine*, **84**, 153504.
- 47. Mon M.T., Yodkeeree S., Punfa W. et al. (2018). Alkaloids from *Stephania venosa* as Chemo-Sensitizers in SKOV3 Ovarian Cancer Cells *via* Akt/NF-κB Signaling. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **66**(**2**), 162–169.
- Chulrik W., Jansakun C., Chaichompoo W. et al. (2022). Oxocrebanine from Stephania pierrei exerts macrophage anti-inflammatory effects by downregulating the NF-κB, MAPK, and PI3K/Akt signalling pathways. *Inflammopharmacology*, **30**(4), 1369–1382.
- Yodkeeree S., Ooppachai C., Pompimon W. et al. (2018). *O*-Methylbulbocapnine and Dicentrine Suppress LPS-Induced Inflammatory Response by Blocking NF-κB and AP-1 Activation through Inhibiting MAPKs and Akt Signaling in RAW264.7 Macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **41**(8), 1219–1227.
- 50. Intayoung P., Limtrakul P., Yodkeeree S. (2016). Antiinflammatory Activities of Crebanine by Inhibition of NF-κB and AP-1 Activation through Suppressing MAPKs and Akt Signaling in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **39**(1), 54–61.
- 51. Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Quốc Huy (2006). Kết quả nghiên cứu độc tính và một số tác dụng sinh học của loài *Stephania dielsiana* Y.C.Wu thu hái ở Hà Tây. *Tạp chí Dược học*, 2, tr. 15-19.

- 52. Nguyễn Tiến Vững (2000), Nghiên cứu về thực vật, hoá học và tác dụng sinh học của một số loài thuộc chi Stephania Lour. ở Việt Nam, Luận án Tiến sĩ Dược học, Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.
- 53. Zhu X.Z. (1991). Development of natural products as drugs acting on central nervous system. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **86 Suppl 2**, 173–175.
- 54. Likhitwitayawuid K., Dej-adisai S., Jongbunprasert V. et al. (1999). Antimalarials from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*. *Planta Medica*, **65(8)**, 754–756.
- 55. Chea A., Hout S., Bun S.-S. et al. (2007). Antimalarial activity of alkaloids isolated from *Stephania rotunda*. *Journal of Ethnopharmacology*, **112**(1), 132–137.
- 56. Ingkaninan K., Phengpa P., Yuenyongsawad S. et al. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **58**(**5**), 695–700.
- 57. Rojsanga P., Boonyarat C., Utsintong M. et al. (2012). The effect of crebanine on memory and cognition impairment via the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sciences*, **91**(**3**), 107–114.
- 58. Camacho M.R., Kirby G.C., Warhurst D.C. et al. (2000). Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. *Planta Medica*, **66**(**5**), 478–480.
- 59. Konrath E.L., Passos C. dos S., Klein-Júnior L.C. et al. (2013). Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **65**(12), 1701–1725.
- 60. Ingkaninan K., Temkitthawon P., Chuenchom K. et al. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, **89**(2), 261–264.
- 61. Kongkiatpaiboon S., Duangdee N., Prateeptongkum S. et al. (2016). Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Alkaloids Isolated from *Stephania venosa*. *Natural Product Communications*, **11**(**12**), 1805–1806.
- 62. Phạm Thanh Kỳ, Bùi Kim Liên, Nguyễn Tiến Vững và cộng sự. (1998). Tác dụng của L-Tetrahydro palmatin chiết xuất từ củ loài bình vôi *Stephania glabra* (Roxb.) Miers lên điện tim và điện não thỏ. *Tạp chí Dược học, số 9*, tr. 21-23.
- 63. Chu H., Jin G., Friedman E. et al. (2008). Recent development in studies of tetrahydroprotoberberines: mechanism in antinociception and drug addiction. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **28**(**4**), 491–499.

- 64. Mantsch J.R., Li S.-J., Risinger R. et al. (2007). Levo-tetrahydropalmatine attenuates cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement in rats. *Psychopharmacology*, **192**(**4**), 581–591.
- 65. Liu Y.-L., Yan L.-D., Zhou P.-L. et al. (2009). Levo-tetrahydropalmatine attenuates oxycodone-induced conditioned place preference in rats. *European Journal of Pharmacology*, **602**(**2**), 321–327.
- 66. Ngô Thị Tâm (1992), Nghiên cứu một số Alcaloid làm thuốc từ một số loài thuộc chi Stephania Lour. ở Việt Nam, Luận án phó tiến sĩ Y Dược, Viện Dược liệu, Hà Nội.
- Đỗ Huy Bích, Bùi Xuân Chương (1980), Sổ tay cây thuốc Việt Nam, NXB Y học, Hà Nội.
- 68. Đỗ Huy Bích (1995), Thuốc từ cây cỏ và động vật, NXB Y học, Hà Nội.
- Võ Văn Chi (1997). Từ điển cây thuốc Việt Nam. NXB Y học, Hà Nội, tr. 95-97, 326-327, 385-386, 388-389, 895-896, 1439.
- Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, accessed: 04/12/2022.
- 71. Nguyễn Hải Nam (2012), Nghiên cứu phát triển thuốc mới, NXB Y học, Hà Nội.
- 72. Sowadski J.M., Epstein L.F. (2001). Protein kinases. *Encyclopedia of life science*. Nature Publishing Group, pp.1-14.
- Sardari S., Pourmorad F., Tiemo A. et al. (2003). Protein Kinases and their Modulation in the Central Nervous System. *Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents*, 3(4), 341–364.
- 74. Al-Obeidi F.A., Wu J.J., Lam K.S. (1998). Protein tyrosine kinases: structure, substrate specificity, and drug discovery. *Biopolymers*, **47**(**3**), 197–223.
- Morin M.J. (2000). From oncogene to drug: development of small molecule tyrosine kinase inhibitors as anti-tumor and anti-angiogenic agents. *Oncogene*, 19(56), 6574–6583.
- 76. Traxler P., Bold G., Buchdunger E. et al. (2001). Tyrosine kinase inhibitors: from rational design to clinical trials. *Medicinal Research Reviews*, **21**(6), 499–512.
- 77. Nam N.-H., Parang K. (2003). Current targets for anticancer drug discovery. *Current Drug Targets*, **4**(**2**), 159–179.
- Crisci S., Amitrano F., Saggese M. et al. (2019). Overview of Current Targeted Anti-Cancer Drugs for Therapy in Onco-Hematology. *Medicina (Kaunas)*, 55(8), 414.

- 79. Zhong L., Li Y., Xiong L. et al. (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **6**(1), 1–48.
- Fu J., Bian M., Jiang Q. et al. (2007). Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis. *Molecular Cancer Research*, 5(1), 1–10.
- Schumacher J.M., Golden A., Donovan P.J. (1998). AIR-2: An Aurora/Ipl1related Protein Kinase Associated with Chromosomes and Midbody Microtubules Is Required for Polar Body Extrusion and Cytokinesis in Caenorhabditis elegans Embryos. *The Journal of Cell Biology*, 143(6), 1635–1646.
- Glover D.M., Leibowitz M.H., McLean D.A. et al. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, 81(1), 95–105.
- 83. Adams R.R., Wheatleya S.P., Gouldsworthy A.M. et al. (2000). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Current Biology*, **10**(17), 1075–1078.
- 84. Brown J.R., Koretke K.K., Birkeland M.L. et al. (2004). Evolutionary relationships of Aurora kinases: Implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evolutionary Biology*, **4**, 39.
- 85. Bolanos-Garcia V.M. (2005). Aurora kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **37(8)**, 1572–1577.
- 86. Kollareddy M., Dzubak P., Zheleva D. et al. (2008). Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, **152**(1), 27–33.
- 87. Keen N., Taylor S. (2004). Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, **4**(12), 927–936.
- Kimura M., Matsuda Y., Yoshioka T. et al. (1999). Cell Cycle-dependent Expression and Centrosome Localization of a Third Human Aurora/Ipl1-related Protein Kinase, AIK3*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 7334–7340.
- Li X., Sakashita G., Matsuzaki H. et al. (2004). Direct Association with Inner Centromere Protein (INCENP) Activates the Novel Chromosomal Passenger Protein, Aurora-C*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 47201–47211.
- Hannak E., Kirkham M., Hyman A.A. et al. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in Caenorhabditis elegans. *The Journal of Cell Biology*, 155(7), 1109–1116.

- Cazales M., Schmitt E., Montembault E. et al. (2005). CDC25B Phosphorylation by Aurora A Occurs at the G2/M Transition and is Inhibited by DNA Damage. *Cell Cycle*, 4(9), 1233–1238.
- 92. Hirota T., Lipp J.J., Toh B.-H. et al. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*, 438(7071), 1176–1180.
- 93. Yan X., Cao L., Li Q. et al. (2005). Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. *Genes to Cells*, **10**(**6**), 617–626.
- 94. Slattery S.D., Mancini M.A., Brinkley B.R. et al. (2009). Aurora-C kinase supports mitotic progression in the absence of Aurora-B. *Cell Cycle*, **8**(18), 2986–2997.
- 95. Vader G., Lens S.M.A. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Cancer*, **1786**(1), 60–72.
- Ota T., Suto S., Katayama H. et al. (2002). Increased Mitotic Phosphorylation of Histone H3 Attributable to AIM-1/Aurora-B Overexpression Contributes to Chromosome Number Instability1. *Cancer Research*, 62(18), 5168–5177.
- 97. Khan J., Ezan F., Crémet J.-Y. et al. (2011). Overexpression of Active Aurora-C Kinase Results in Cell Transformation and Tumour Formation. *PLoS One*, **6**(10), e26512.
- Qi G., Ogawa I., Kudo Y. et al. (2007). Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Archiv*, 450(3), 297–302.
- 99. Smith S.L., Bowers N.L., Betticher D.C. et al. (2005). Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability. *British Journal of Cancer*, 93(6), 719–729.
- 100. Sorrentino R., Libertini S., Pallante P.L. et al. (2005). Aurora B Overexpression Associates with the Thyroid Carcinoma Undifferentiated Phenotype and Is Required for Thyroid Carcinoma Cell Proliferation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **90**(2), 928–935.
- 101. Ditchfield C., Johnson V.L., Tighe A. et al. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of Cell Biology*, **161**(2), 267–280.

- 102. Hauf S., Cole R.W., LaTerra S. et al. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore–microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *The Journal of Cell Biology*, **161**(2), 281–294.
- 103. Li Y., Zhang Z.-F., Chen J. et al. (2010). VX680/MK-0457, a potent and selective Aurora kinase inhibitor, targets both tumor and endothelial cells in clear cell renal cell carcinoma. *American Journal of Translational Research*, 2(3), 296–308.
- Katayama H., Sen S. (2010). Aurora Kinase inhibitors as Anticancer Molecules. Biochimica et Biophysica Acta, 1799(0), 829–839.
- 105. Hoang T.M.-N., Favier B., Valette A. et al. (2009). Benzo[e]pyridoindoles, novel inhibitors of the Aurora kinases. *Cell Cycle*, **8**(**5**), 765–772.
- 106. Delacour-Larose M., Thi M.-N.H., Dimitrov S. et al. (2007). Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis. *Cell Cycle*, **6**(15), 1878–1885.
- 107. Bộ Y tế (2018). Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích, phụ lục 1. Thông tư 32/2018/TT-BYT Quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc.
- 108. AOAC (2016), Guidelines for Standard Method Performance Requirements.
- 109. Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L. et al. (2004). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- Malich G., Markovic B., Winder C. (1997). The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, **124**(**3**), 179–192.
- 111. Monks A., Scudiero D., Skehan P. et al. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, **83**(11), 757–766.
- 112. Hughes J.P., Rees S., Kalindjian S.B. et al. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, **162**(6), 1239–1249.
- Slanina H., König A., Claus H. et al. (2011). Real-time impedance analysis of host cell response to meningococcal infection. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 101–108.
- 114. Hoang N.T.M., Phuong T.T., Nguyen T.T.N. et al. (2016). In Vitro Characterization of Derrone as an Aurora Kinase Inhibitor. Biological and Pharmaceutical Bulletin, **39**(6), 935–945.

- McMillan K.S., McCluskey A.G., Sorensen A. et al. (2015). Emulsion technologies for multicellular tumour spheroid radiation assays. *Analyst*, 141(1), 100– 110.
- 116. Lin Y.-S., Su L.-J., Yu C.-T.R. et al. (2018). Gene Expression Profiles of the Aurora Family Kinases. *Gene Expression*, **13**(1), 15–26.
- 117. He J., Qi Z., Zhang X. et al. (2019). Aurora kinase B inhibitor barasertib (AZD1152) inhibits glucose metabolism in gastric cancer cells. *Anticancer Drugs*, 30(1), 19–26.
- 118. Romain C., Paul P., Kim K.W. et al. (2014). Targeting Aurora kinase-A downregulates cell proliferation and angiogenesis in neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery*, **49**(1), 159–165.
- 119. Roy J.G., McElhaney J.E., Verschoor C.P. (2020). Reliable reference genes for the quantification of mRNA in human T-cells and PBMCs stimulated with live influenza virus. *BMC Immunology*, **21**, 4.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCT Method. *Methods*, 25(4), 402– 408.
- 121. Skehan P., Storeng R., Scudiero D. et al. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, **82**(13), 1107–1112.
- 122. Pharadai K., Pharadai T., Tantisewie B. et al. (1985). (-)-O-Acetylsukhodianine and Oxostephanosine: Two New Aporphinoids from *Stephania venosa*. *Journal of Natural Products*, **48**(**4**), 658–659.
- 123. Rayanil K.-O., Prempree C., Nimgirawath S. (2016). The first total syntheses of (±)-norphoebine, dehydrophoebine, oxophoebine, dehydrocrebanine, oxocrebanine and uthongine and their cytotoxicity against three human cancer cell lines. *Journal of Asian Natural Products Research*, **18**(11), 1042–1056.
- 124. Achari B., Bandyopadhyay S., Chakravarty A.K. et al. (1984). Carbon-13 NMR spectra of some phenanthrene derivatives from *Aristolochia indica* and their analogues. *Organic Magnetic Resonance*, **22**(**12**), 741–746.
- 125. Sim J.Y., Kim M.A., Kim M.J. et al. (2014). Acetylcholinesterase inhibitors from the stem of *Zea mays*. *Natural Product Sciences*, **20**, 13–16.

- 126. Ly T.N., Yamauchi R., Shimoyamada M. et al. (2002). Isolation and Structural Elucidation of Some Glycosides from the Rhizomes of Smaller Galanga (*Alpinia* officinarum Hance). J Agric Food Chem, **50**(17), 4919–4924.
- 127. Yamano Y., Ito M. (2005). Synthesis of Optically Active Vomifoliol and Roseoside Stereoisomers. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **53**(5), 541–546.
- 128. Bộ Y tế (2017), Dược điển Việt Nam V, NXB Y học, Hà Nội.
- 129. Bavetsias V., Linardopoulos S. (2015). Aurora Kinase Inhibitors: Current Status and Outlook. *Frontiers in Oncology*, **5**, 278.
- 130. Bi H., Li H., Zhang C. et al. (2019). Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process. *Stem Cell Research & Therapy*, **10**, 302.
- 131. Lu Z., Zhang Q., Chen R. et al. (2009). Aporphine alkaloids from branches and leaves of *Polyalthia nemoralis*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **34**(**18**), 2343–2345.
- Guinaudeau H., Lebœuf M., Cavé A. (1994). Aporphinoid Alkaloids, V. Journal of Natural Products, 57(8), 1033–1135.
- 133. Phạm Gia Điền, Lê Ngọc Liên, Trần Nguyên Tiêu (2004). Các alcaloid khung aporphin từ cây bình vôi *Stephania dielsiana* Y.C.Wu của Việt Nam. *Tạp chí Dược học*, 5, tr. 14-15.
- 134. Thuy T.T.T., Quan T.D., Anh N.T.H. et al. (2012). Cytotoxic and antimicrobial aporphine alkaloids from *Fissistigma poilanei* (Annonaceae) collected in Vietnam. *Natural Product Research*, **26**(14), 1296–1302.
- 135. Kelly K.J. (2018). 14.05 Acute Kidney Injury. *Comprehensive Toxicology* (*Third Edition*). Elsevier, Oxford, 98–127.
- 136. Yodkeeree S., Wongsirisin P., Pompimon W. et al. (2013). Anti-invasion Effect of Crebanine and O-Methylbulbocapnine from *Stephania venosa via* Down-Regulated Matrix Metalloproteinases and Urokinase Plasminogen Activator. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61(11), 1156–1165.
- 137. Yu Z.P., Mu Y.S., Zhao Z.X. et al. (1992). Antiarrhythmic effects of crebanine. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **17**(**11**), 685–687, 704.
- 138. Hoàng Văn Thuỷ (2020), Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học hai loài Stephania Lour. ở Việt Nam, Luận án Tiến sĩ Dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.
- 139. Kunitomo J., Murakami Y., Oshikata M. et al. (1980). The alkaloids of *Stephania sasakii*: Structure of five new alkaloids. *Phytochemistry*, **19**(**12**), 2735–2739.

- 140. Kashiwaba N., Ono M., Toda J. et al. (2000). Aporphine glycosides from *Stephania cepharantha* seeds. *Journal of Natural Products*, **63**(**4**), 477–479.
- 141. Wu M.-C., Peng C.-F., Chen I.-S. et al. (2011). Antitubercular Chromones and Flavonoids from *Pisonia aculeata*. *Journal of Natural Products*, **74**(**5**), 976–982.
- Seigler D.S., Pauli G.F., Nahrstedt A. et al. (2002). Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry*, **60**(8), 873– 882.
- 143. Bhakuni D.S., Joshi P.P., Uprety H. et al. (1974). Roseoside-A C13 glycoside from *Vinca rosea*. *Phytochemistry*, **13**(**11**), 2541–2543.
- 144. Frankish N., de Sousa Menezes F., Mills C. et al. (2010). Enhancement of Insulin Release from the β -Cell Line INS-1 by an Ethanolic Extract of *Bauhinia variegata* and Its Major Constituent Roseoside. *Planta Medica*, **76**(10), 995–997.
- 145. Yajima A., Oono Y., Nakagawa R. et al. (2009). A simple synthesis of four stereoisomers of roseoside and their inhibitory activity on leukotriene release from mice bone marrow-derived cultured mast cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(1), 189–194.
- 146. Bộ Y tế (2007). Dược liệu chứa alcaloid. Dược liệu học (tập II). NXB Y học, Hà Nội, tr.9-173.
- 147. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- 148. Pérez-Fidalgo J.A., Gambardella V., Pineda B. et al. (2020). Aurora kinases in ovarian cancer. *ESMO Open*, **5**(**5**), e000718.
- 149. Cervantes A., Elez E., Roda D. et al. (2012). Phase I Pharmacokinetic/ Pharmacodynamic Study of MLN8237, an Investigational, Oral, Selective Aurora A Kinase Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 18(17), 4764–4774.
- 150. Falchook G., Coleman R.L., Roszak A. et al. (2019). Alisertib in Combination With Weekly Paclitaxel in Patients With Advanced Breast Cancer or Recurrent Ovarian Cancer. JAMA Oncology, 5(1), e183773.
- 151. Brito D.A., Yang Z., Rieder C.L. (2008). Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *The Journal of Cell Biology*, **182(4)**, 623–629.

- 152. Mallm J.-P., Rippe K. (2015). Aurora Kinase B Regulates Telomerase Activity via a Centromeric RNA in Stem Cells. *Cell Reports*, **11**(**10**), 1667–1678.
- 153. Rosasco-Nitcher S.E., Lan W., Khorasanizadeh S. et al. (2008). Centromeric Aurora-B Activation Requires TD-60, Microtubules, and Substrate Priming Phosphorylation. *Science*, **319**(**5862**), 469–472.
- Shimada M., Goshima T., Matsuo H. et al. (2016). Essential role of autoactivation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. *Nature Communications*, 7(1), 12059.
- 155. Gurden M.D., Anderhub S.J., Faisal A. et al. (2016). Aurora B prevents premature removal of spindle assembly checkpoint proteins from the kinetochore: A key role for Aurora B in mitosis. *Oncotarget*, **9**(**28**), 19525–19542.
- 156. Lan W., Zhang X., Kline-Smith S.L. et al. (2004). Aurora B Phosphorylates Centromeric MCAK and Regulates Its Localization and Microtubule Depolymerization Activity. *Current Biology*, 14(4), 273–286.
- 157. Willems E., Lombard A., Dedobbeleer M. et al. (2017). The Unexpected Roles of Aurora A Kinase in Gliobastoma Recurrences. *Targeted Oncology*, **12**(**1**), 11–18.
- Wang J.-D., Zhang W., Zhang J.-W. et al. (2020). A Novel Aurora Kinase Inhibitor Attenuates Leukemic Cell Proliferation Induced by Mesenchymal Stem Cells. *Molecular Therapy Oncolytics*, 18, 491–503.
- Chen J., Lu H., Zhou W. et al. (2015). AURKA upregulation plays a role in fibroblast-reduced gefitinib sensitivity in the NSCLC cell line HCC827. Oncology Reports, 33(4), 1860–1866.
- 160. Wu C.C., Yu C.-T.R., Chang G.-C. et al. (2011). Aurora-A promotes gefitinib resistance via a NF-κB signaling pathway in p53 knockdown lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **405**(2), 168–172.
- Kasam R.K., Ghandikota S., Soundararajan D. et al. (2020). Inhibition of Aurora Kinase B attenuates fibroblast activation and pulmonary fibrosis. *EMBO Molecular Medicine*, 12(9), e12131.
- 162. Kim H.-J., Cho J.H., Quan H. et al. (2011). Down-regulation of Aurora B kinase induces cellular senescence in human fibroblasts and endothelial cells through a p53dependent pathway. *FEBS Letters*, **585**(22), 3569–3576.
- Lugano R., Ramachandran M., Dimberg A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(9), 1745–1770.

- 164. Sun X., Niu S., Zhang Z. et al. (2019). Aurora kinase inhibitor VX-680 suppresses the proliferation and migration of HUVECs and angiogenesis. *Molecular Medicine Reports*, 19(5), 3841–3847.
- 165. Wang Z., Zhao Y., An Z. et al. (2020). Molecular Links Between Angiogenesis and Neuroendocrine Phenotypes in Prostate Cancer Progression. *Frontiers in Oncology*, 9, 1491.
- 166. Villaume K., Blanc M., Gouysse G. et al. (2010). VEGF Secretion by Neuroendocrine Tumor Cells Is Inhibited by Octreotide and by Inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Neuroendocrinology*, 91(3), 268–278.
- 167. Ton A.-T., Singh K., Morin H. et al. (2020). Dual-Inhibitors of N-Myc and AURKA as Potential Therapy for Neuroendocrine Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(21), 8277.
- 168. Sedlář A., Trávníčková M., Matějka R. et al. (2021). Growth Factors VEGF-A165 and FGF-2 as Multifunctional Biomolecules Governing Cell Adhesion and Proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1843.
- 169. Cao R., Eriksson A., Kubo H. et al. (2004). Comparative Evaluation of FGF-2–, VEGF-A–, and VEGF-C–Induced Angiogenesis, Lymphangiogenesis, Vascular Fenestrations, and Permeability. *Circulation Research*, 94(5), 664–670.
- 170. Grugan K.D., Miller C.G., Yao Y. et al. (2010). Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 11026–11031.
- 171. Sahni A., Francis C.W. (2004). Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires $\alpha\nu\beta3$. *Blood*, **104**(**12**), 3635–3641.

DANH SÁCH PHỤ LỤC

TÊN PHỤ LỤC	TRANG
PHỤ LỤC 1. Phiếu giám định tên khoa học của mẫu nghiên cứu	PL-2
PHỤ LỤC 2. Bảng quy đổi ký hiệu phổ các hợp chất đã phân lập	PL-3
PHỤ LỤC 3. Phổ các hợp chất đã phân lập	PL-4
Phụ lục 3.1. Hợp chất SD1: Stedieltin A C ₁₉ H ₁₅ NO ₆	PL-5
<i>Phụ lục 3.2. Hợp chất SD2: Stedieltin B</i> $C_{17}H_{11}NO_4$	PL-14
<i>Phụ lục 3.3. Hợp chất SD3: oxostephanin C</i> ₁₈ <i>H</i> ₁₁ <i>NO</i> ₄	PL-28
<i>Phụ lục 3.4. Hợp chất SD4: oxostephanosin C</i> ₁₇ <i>H</i> ₉ <i>NO</i> ₄	PL-36
<i>Phụ lục 3.5. Hợp chất SD5: oxocrebanin C</i> ₁₉ <i>H</i> ₁₃ <i>NO</i> ₅	PL-42
<i>Phụ lục 3.6. Hợp chất SD6: aristolactam C</i> ₁₇ <i>H</i> ₁₁ <i>NO</i> ₄	PL-49
<i>Phụ lục 3.7. Hợp chất SD7: crebabin C</i> ₂₀ <i>H</i> ₂₁ <i>NO</i> ₄	PL-55
<i>Phụ lục 3.8. Hợp chất SD8: dehydrocrebabin C</i> ₂₀ <i>H</i> ₁₉ <i>NO</i> ₄	PL-63
Phụ lục 3.9. Hợp chất SD9: 4-hydroxybenzaldehyd C ₇ H ₆ O ₂	PL-71
<i>Phụ lục 3.10. Hợp chất SD10: benzyl β-D-glucopyranosid</i> $C_{13}H_{18}O_6$	PL-75
Phụ lục 3.11. Hợp chất SD11: (6R,9S)-roseosid C ₁₉ H ₃₀ O ₈	PL-82
PHỤ LỤC 4. Sắc ký đồ HPLC	PL-91
Phụ lục 4.1. Đánh giá độ tinh khiết của oxostephanin	PL-92
Phụ lục 4.2. Sắc ký đồ các mẫu khảo sát phương pháp xử lý mẫu	PL-95
Phụ lục 4.3. Sắc ký đồ các mẫu thẩm định phương pháp phân tích	PL-106
PHỤ LỤC 5. Kết quả đánh giá tác dụng gây độc tế bào <i>in vitro</i>	PL-127
Dải nồng độ thử nghiệm của các hợp chất	PL-128
Phụ lục 5.1. Hình thái các dòng tế bào dưới tác dụng của SD1, SD2, SD3,	PL-129
SD4, SD5 tại thời điểm 48h (VK 10X, Zoom 5,6)	
Phụ lục 5.2. Kết quả thử nghiệm MTS	PL-139
PHỤ LỤC 6. Các công bố liên quan đến luận án	PL-142

PHỤ LỤC 1. PHIẾU GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC CỦA MÃU NGHIÊN CỨU



TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI BỘ MÔN THỰC VẬT *****

PHIẾU GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

Số: 43/2019

Người gửi mẫu: Ngày thu mẫu: Noi thu mẫu: Tên địa phương:

Trần Thị Kim Anh, Công ty CP Dược liệu Indochina 06/10/2019 xã Tản Lĩnh, huyện Ba Vì, thành phố Hà Nội Củ dòm

Kết quả giám định: Căn cứ vào các tài liệu thực vật hiện có tại Trường Đại học Dược Hà Nội, với các đặc điểm của các bộ phận mẫu cây, đã xác định mẫu trên có:

- Tên khoa học: Stephania dielsiana Y.C. Wu

- Họ: Menispermaceae
- Tên thường gọi: Củ dòm

Trưởng bộ môn

NHoh

TS. Hoàng Quỳnh Hoa

ThS. Nghiêm Đức Trọng

Hà Nội, ngày 29 tháng 11 năm 2019

Người giám định

Tài liệu tham khảo

- Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), Sách đỏ Việt Nam, Phần II. Thực vật, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ
- 2. Phạm Hoàng Hộ (1999), Cây cỏ Việt Nam, Quyển I, NXB Trẻ
- Qiming Hu, Xianrui Luo, Tao Chen & Michael G. Gilbert (2008), Menispermaceae in: Wu, Z. Y., P. H. Raven & D. Y. Hong (eds.), *Flora of China, Vol. 7 (Menispermaceae through Capparaceae)*, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI Xác nhận: TS. HOT AN A GRAMS LOT AN LA: TAUXA AN STATEMENT LA TAUXA AND THE AND THE

PHỤ LỤC 2. BẢNG QUY ĐỔI KÝ HIỆU PHỔ

CÁC HỢP CHẤT ĐÃ PHÂN LẬP

Ký hiệu hợp chất	Tên hợp chất	Ký hiệu trên phổ
SD1	Stedieltin A	SD08
SD2	Stedieltin B	SD15.1
SD3	Oxostephanin	SD01
SD4	Oxostephanosin	SD06
SD5	Oxocrebanin	SD3.1
SD6	Aristolactam	SD16.1
SD7	Crebanin	SD02
SD8	Dehydrocrebanin	SD10
SD9	4-hydroxybenzaldehyd	SD04
SD10	Benzyl β -D-glucopyranosid	SD13
SD11	(6R,9S)-roseosid	SD14

PHỤ LỤC 3. PHỔ CÁC HỢP CHẤT ĐÃ PHÂN LẬP
Phụ lục 3.1. Hợp chất SD1: Stedieltin ACTPT: $C_{19}H_{15}NO_6$ M = 353,0899Chất bột, màu nâu đỏ

MS

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) COSY HMBC HSQC NOESY





1. PHỔ MS

















5. PHỔ HMBC











7. PHÔ NOESY





PL-13

Phụ lục 3.2. Hợp chất SD2: Stedieltin BCTPT: $C_{17}H_{11}NO_4$ M = 293,0688Chất kết tinh hình kim, màu trắng

MS

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃ + MeOD (9/1 v/v) và DMSO-*d*₆) ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃ + MeOD (9/1 v/v) và DMSO-*d*₆) HMBC HSQC













PL-16

















SD15.1D-DMSO-C13CPD

BRUKER

----- 55.85

		5	∞ - - 4	N	-	040 M	4	6	~ ~
2	6	3	- 22	2	9	0 4 0 m	0	2	0 9
	•	•		•			•	•	
9	-		000	9	m	0011	- 	æ	0 0
5	5	4	444	3	2		-	0	00
-	-	-		-	-		-	-	
			U I J	1					1.1
			- YC			Y			







PL-22



PL-23



PL-24











Phụ lục 3.3. Hợp chất SD3: oxostephanin CTPT: C₁₈H₁₁NO₄ M = 305 Chất bột vô định hình màu vàng cam

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) DEPT COSY HMBC HSQC









2. PHÔ ¹³C-NMR





3. PHÔ DEPT

SD01-DMSO-C13CPD&DEPT



SD01-DMSO-C13CPD&DEPT



DEPT90





SF01 NUC1 P0 P1 P17 PLW1 PLW10 1H 10.20 usec 10.20 usec 500.00 usec 000000 W 320002 W 22.000000 2.543200 GPNAM[1 GPZ1 P16 NT CHANNEL \$210.100 10.00 % 1000.00 usec F1 - Ac TD SF01 FINRES SH FANODE F2 - P1 SI SF WDW SSB LB GB FC F1 - P1 SI MC2 SF WDW SSB LB GB ion parameters 160 160 500.2413 MHz 250.000000 Hz 9.995 ppm QF sing parameters 1024 500.2390000 MHz QSINE 000 Hz 1.00 sing parameters 1024 QF 500.2390000 MHz QSINE Pr 0 0 Hz 0 ppm

00

8.0

7.8

7.6

7.4

7.2

8.2

8.4

8.6

8.8

8

8.6

8.4

8.8

8.2

5. PHỔ HMBC











Phụ lục 3.4. Hợp chất SD4: oxostephanosin

CTPT: $C_{17}H_9NO_4$ M = 291

Chất bột màu nâu đỏ

MS ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) HMBC HSQC



1. PHÔ MS



Display Report - Selected Window Selected Analysis





3. PHÔ ¹³C-NMR





4. PHỔ HMBC





PL-40
5. PHỔ HSQC



Phụ lục 3.5. Hợp chất SD5: oxocrebanin

CTPT: C₁₉H₁₃NO₅ M = 335

Chất rắn màu vàng cam

MS

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) HMBC HSQC



1. PHỔ MS



Display Report - Selected Window Selected Analysis





3. PHÔ ¹³C-NMR





PL-45





5. PHỔ HSQC





Phụ lục 3.6. Họp chất SD6: aristolactam CTPT: C₁₇H₁₁NO₄ M = 293 Chất kết tinh hình kim, màu vàng

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆)
HMBC
HSQC



1. PHÔ¹H-NMR





PL-50

2. PHÔ ¹³C-NMR



BRUKER	
0 2 2	/ 54.83



SD16.1-DMSO-C13CPD









PL-53

4. PHỔ HSQC



Phụ lục 3.7. Hợp chất SD7: crebabin CTPT: C₂₀H₂₁NO₄ M = 339 Bột vô định hình màu nâu

MS ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) HMBC HSQC



1. PHỔ MS











3. PHÔ ¹³C-NMR















5. PHỔ HSQC





Phụ lục 3.8. Hợp chất SD8: dehydrocrebabin

CTPT: C₂₀H₁₉NO₄ M = 337 Chất rắn màu trắng

MS

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) HMBC HSQC



1. PHỔ MS



Display Report - Selected Window Selected Analysis







3. PHÔ ¹³C-NMR















5. PHỔ HSQC





Phụ lục 3.9. Hợp chất SD9: 4-hydroxybenzaldehyd CTPT: C₇H₆O₂

M = 122 Chất rắn màu trắng

MS ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) HMBC HSQC



1. PHỔ MS



Display Report - Selected Window Selected Analysis







4. PHÔ DEPT

SD04-MeOD-C13CPD&DEPT



SD04-MeOD-C13CPD&DEPT



Phụ lục 3.10. Hợp chất SD10: benzyl β-D-glucopyranosid CTPT: C₁₃H₁₈O₆

M = 270 Bột vô định hình màu trắng

MS ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) HMBC HSQC



1. PHỔ MS



Display Report - Selected Window Selected Analysis






3. PHÔ ¹³C-NMR



4. PHỔ HMBC







5. PHỔ HSQC



PL-80



Phụ lục 3.11. Hợp chất SD11: (6R,9S)-roseosid CTPT: C₁₉H₃₀O₈ M = 386 Bột vô định hình màu trắng

MS

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) HMBC HSQC



1. PHỔ MS











3. PHÔ ¹³C-NMR









4. PHỔ HMBC





PL-87





5. PHỔ HSQC





PHỤ LỤC 4. SẮC KÝ ĐỒ HPLC

12/22/2022 9:55:28 AM Page 1 / 1



<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename	: : oxo chuan 25ug L5 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3-2019.lcm						
Vial #	: 1-1	Sample Type	: Unknown				
Injection Volume Date Acquired Date Processed	: 10 uL : 3/20/2019 4:09:16 PM : 12/22/2022 9:47:49 AM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator				

<Chromatogram>





D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 25ug L5 19-3-2019.lcd

SKĐ và phổ UV của oxostephanin

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename	: Mau chiet 6 : : Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH-6 : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3 : oxo-batch-20-03-2019 lch	-20-3-2019.lcd -2019.lcm	
Vial #	: 1-6 : 10 ul	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/21/2019 12:36:52 AM : 12/22/2022 9:44:33 AM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator



D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH-6-20-3-2019.lcd

SKĐ và phổ UV của oxostephanin trong dung dịch thử



==== Shimadzu LabSolutions Data Comparison ====

SKĐ của oxostephanin (Data 1) và dung dịch thử (Data 2)

Phụ lục 4.2. Sắc ký đồ các mẫu khảo sát phương pháp xử lý mẫu Phụ lục 4.2.1. Sắc ký đồ các mẫu khảo sát số lần chiết

7/22/2022 3:37:06 PM Page 1 / 1



	itel. fille	Alea	Tieigiit	CONC.	Unit	IVIAIN	INdille
1	5.488	1742915	65718	0.000			
2	7.915	36344	1141	0.000			
3	8.587	6650	277	0.000		V	
4	9.186	7327	247	0.000		V	
5	10.980	10685	409	0.000			
6	14.676	2320696	67995	0.000			
7	17.055	2757	104	0.000			
8	20.566	218613	4222	0.000		V	
9	24.678	22077	629	0.000			
Total		4368063	140742				

D:\co thuan\oxostephanin\22-06-08\L1.1.lcd

SKĐ dịch chiết lần 1

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename Vial #	: L2.1 : L2.1 : L2.1.lcd : 21-12-01 ĐL oxo trong DL.lcm : batch khao sat so lan chiet 2.lcb : 1-6 : 20.ul	Sample Type	: Unknown
Injection Volume Date Acquired Date Processed	: 20 uL : 08/06/2022 13:17:56 : 08/06/2022 13:42:58	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

Chiet lan 2 mAU PDA Multi 1 254nm,4nm 14.763 15-10-5.555 5-20.588 7.953 0-15 5 10 20 ò min

<Peak Table> PDA Ch1 254nm

I DA C	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	5.555	166853	6238	0.000			
2	7.953	22626	801	0.000			
3	14.763	524905	15330	0.000			
4	20.588	41582	850	0.000			
5	24.693	4222	134	0.000			
Total		760188	23354				

D:\co thuan\oxostephanin\22-06-08\L2.1.lcd

SKĐ dịch chiết lần 2

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename Vial # Injection Volume Date Acquired Date Processed	: L3.1 : L3.1 : L3.1.lcd : 21-12-01 ĐL oxo trong DL.lcm : batch khao sat so lan chiet 2.lcb : 1-9 : 20 uL : 08/06/2022 14:09:02 : 08/06/2022 14:34:05	Sample Type Acquired by Processed by	: Unknown : System Administrator : System Administrator
Date Processed	: 08/06/2022 14:34:05	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>

Chiet lan 3 mAU PDA Multi 1 254nm,4nm 14.813 5.0-5.591 2.5 20.696 7.938 0.0 5 ò 10 15 20 min

<Peak Table>

PDAC	111 23411111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	5.591	52262	1966	0.000			
2	7.938	9209	334	0.000			
3	14.813	220859	6438	0.000			
4	20.696	14891	335	0.000		SV	
Total		297221	9073				

D:\co thuan\oxostephanin\22-06-08\L3.1.lcd

SKĐ cắn chiết lần 3 (hoà tan lại trong MeOH)

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename Vial # Injection Volume Date Acquired Date Processed	: L4.1 : L4.1 : L4.1.icd : 21-12-01 ĐL oxo trong DL.icm : batch khao sat so lan chiet 2.icb : 1-12 : 20 uL : 08/06/2022 15:51:16 : 08/06/2022 16:16:19	Sample Type Acquired by Processed by	: Unknown : System Administrator : System Administrator
Date Processed	: 08/06/2022 16:16:19	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>

<Peak Table> PDA Ch1 254nm

	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	5.593	19783	738	0.000			
2	7.961	1305	107	0.000		V	
3	14.838	59133	1729	0.000			
Total		80220	2574				

D:\co thuan\oxostephanin\22-06-08\L4.1.lcd

SKĐ cắn chiết lần 4 (hoà tan lại trong MeOH)

7/22/2022 3:32:50 PM Page 1 / 1



<Sample Information>

Sample Name	: 25 ml		
Sample ID Data Filename	: 25 ml : 25 ml lcd		
Method Filename	: 21-12-01 ĐL oxo trong DL.lcm		
Batch Filename	: batch khao sat luong DM.lcb		
Vial #	: 1-6	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 20 uL		
Date Acquired	: 10/06/2022 14:57:28	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 10/06/2022 15:22:30	Processed by	: System Administrator
			-

<Chromatogram>

Luong dung moi chiet 25ml



<Peak Table>

PDAC	<u>111 2341111</u>						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	10.191	137158	3123	2.992			
2	12.202	33172	720	0.724			
3	15.040	4413914	123599	96.284		S	
Total		4584244	127442				

D:\co thuan\oxostephanin\22-06-10\25 ml.lcd

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename	: 50 ml : 50 ml : 50 ml.lcd		
Method Filename	: 21-12-01 EL oxo trong DL.icm		
Batch Filename	: batch khao sat luong DM.lcb		
Vial #	: 1-7	Sample Type	: Unknown
Iniection Volume	: 20 uL	1 51	
Date Acquired	· 10/06/2022 15·23·00	Acquired by	 System Administrator
Date Processed	10/06/2022 17:13:40	Processed by	· System Administrator
Bate 1 10000000	. 10,00,2022 11.10.40	i i coccoca by	. eyeten / taniniotrator
Date Acquired Date Processed	: 10/06/2022 15:23:00 : 10/06/2022 17:13:40	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

<Peak Table>

грас	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	10.205	84869	1996	3.201			
2	15.094	2566491	73151	96.799		М	
Total		2651360	75147				

D:\co thuan\oxostephanin\22-06-10\50 ml.lcd

<Sample Information>

Sample Name Sample ID	: 100 ml : 100 ml		
Data Filename	: 100 ml.lcd		
Method Filename	: 21-12-01 ĐL oxo trong DL.lcm		
Batch Filename	: batch khao sat luong DM.lcb		
Vial #	: 1-8	Sample Type	: Unknown
Injection Volume	: 20 uL		
Date Acquired	: 10/06/2022 15:48:33	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 10/06/2022 16:24:16	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>

Luong dung moi chiet 100ml



<Peak Table> PDA Ch1 254nm

	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	10.197	31521	848	0.000			
2	15.139	1308321	37363	0.000		М	
Total		1339842	38211				

D:\co thuan\oxostephanin\22-06-10\100 ml.lcd

7/22/2022 3:43:50 PM Page 1 / 1



<Sample Information>

Date Processed : 24/12/2021 22:09:56 Processed by : System Administrate	Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename Vial # Injection Volume Date Acquired Date Processed	: BV1.1.1 : BV1.1.1 : BV1.1.1.Icd : 21-12-01 ĐL oxo trong DL.Icm : bacth LOQ.Icb : 1-15 : 20 uL : 24/12/2021 21:44:54 : 24/12/2021 22:09:56	Sample Type Acquired by Processed by	: Unknown : System Administrato : System Administrato
---	---	---	--	---

<Chromatogram>

Chiet 3 lan/1 gio



<Peak Table>

						111 2341111	FDAU
Name	Mark	Unit	Conc.	Height	Area	Ret. Time	Peak#
			0.000	5736	131491	5.953	1
	V		0.000	43851	1418867	6.840	2
			0.000	295	8090	8.618	3
			0.000	2041	110404	10.839	4
			0.000	1138	43556	13.103	5
	V		0.000	49747	1901511	15.805	6
				102809	3613920		Tota
	V		0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000	5736 43851 295 2041 1138 49747 102809	131491 1418867 8090 110404 43556 1901511 3613920	5.953 6.840 8.618 10.839 13.103 15.805	1 2 3 4 5 6 Total

D:\co thuan\oxostephanin\21-12-24\BV1.1.1.lcd



Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename Vial # Injection Volume Date Acquired Date Processed	: BV1.2.1 : BV1.2.1 : BV1.2.1.lcd : 21-12-01 ĐL oxo trong DL.lcm : bacth LOQ.lcb : 1-18 : 20 uL : 24/12/2021 23:01:33 : 24/12/2021 23:26:36	Sample Type Acquired by Processed by	: Unknown : System Administrator : System Administrator
Date Acquired Date Processed	: 24/12/2021 23:01:33 : 24/12/2021 23:26:36	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator
		2	

<Chromatogram>

Chiet 3 lan/2h mAU PDA Multi 1 254nm,4nm 6.843 15.824 50 25-063 10.911 13.121 8.554 9.195 0 5 10 15 20 ó min

<Peak Table> PDA Ch1 254pm

FUAC	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	5.962	161631	6976	0.000			
2	6.843	1732498	54357	0.000		V	
3	8.554	17199	486	0.000			
4	9.195	9391	282	0.000		V	
5	10.911	225153	3065	0.000			
6	13.121	42043	1040	0.000		V	
7	15.824	2321195	60469	0.000		SV	
Total		4509110	126674				

D:\co thuan\oxostephanin\21-12-24\BV1.2.1.lcd



<Sample Information>

<Chromatogram>



<Peak Table>

FUAG	111 2041111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	5.976	189101	8055	0.000			
2	6.860	1880223	59733	0.000		V	
3	8.604	10207	384	0.000			
4	10.894	161638	2950	0.000			
5	13.205	30418	807	0.000			
6	15.851	2550826	66340	0.000		SV	
Total		4822412	138268				

D:\co thuan\oxostephanin\21-12-24\BV1.3.1.lcd



<Sample Information>

<Chromatogram>

Chiet 3 lan/4h mAU PDA Multi 1 254nm,4nm 6.859 15.860 50-25 5.969 10.943 13.197 8.587 0 5 10 15 20 ò min

<Peak Table>

FDAG	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	5.969	197032	8234	0.000			
2	6.859	1965026	63142	0.000		V	
3	8.587	11349	432	0.000			
4	10.943	270507	3302	0.000			
5	13.197	39790	900	0.000		V	
6	15.860	2689329	69846	0.000		SV	
Total		5173034	145857				

D:\co thuan\oxostephanin\21-12-24\BV1.4.1.lcd

Phụ lục 4.3. Sắc ký đồ các mẫu thẩm định phương pháp phân tích Phụ lục 4.3.1. Sắc ký đồ các mẫu thẩm định độ phù hợp hệ thống

5/3/2019 12:34:37 PM Page 1 / 1

LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	:						
Sample ID	:						
Data Filename	: oxo chuan 25ug 19-3-2019.lcd						
Method Filename	: oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3-2019.lcm						
Vial #	: : 1-1 : 10 ul	Sample Type	: Unknown				
Date Acquired	: 3/19/2019 7:30:36 PM	Acquired by	: System Administrator				
Date Processed	: 3/19/2019 7:51:39 PM	Processed by	: System Administrator				

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDAC	n i 254nm						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.589	18451	2032	0.000			
2	3.288	5923	131	0.000			
3	14.111	1214153	34814	0.000			
Total		1238527	36978				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 25ug 19-3-2019.lcd

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename	: : oxo chuan 25ug l2 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	3-2019.lcm	
Vial #	: 1-1 : 10.00	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/19/2019 9:36:54 PM : 3/19/2019 9:54:39 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

FDAG	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.596	21346	2332	0.000			
2	3.283	5851	146	0.000			
3	14.148	1219037	35210	0.000			
Total		1246234	37688				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 25ug I2 19-3-2019.lcd



<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename	: : : oxo chuan 25ug L3 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	3-2019.lcm	
Vial #	: : 1-1	Sample Type	: Unknown
Injection Volume Date Acquired Date Processed	: 10 uL : 3/20/2019 3:28:39 PM : 3/20/2019 3:48:13 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

грас	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.603	19549	2199	0.000			
2	3.290	6062	134	0.000			
3	14.334	1215144	35147	0.000			
Total		1240755	37480				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 25ug L3 19-3-2019.lcd

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename	: : oxo chuan 25ug L4 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	3-2019.lcm	
Vial #	: 1-1	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/20/2019 3:49:13 PM : 3/20/2019 4:07:56 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>





<Peak Table>

FDAG	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.604	23228	2472	0.000		V	
2	14.320	1227682	34889	0.000			
Total		1250910	37362				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 25ug L4 19-3-2019.lcd



<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename	: : : oxo chuan 25ug L5 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	3-2019.lcm	
Vial #	1-1	Sample Type	: Unknown
Injection Volume Date Acquired Date Processed	: 10 uL : 3/20/2019 4:09:16 PM : 3/20/2019 4:28:42 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>





<Peak Table>

FDAG	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.601	24672	2461	0.000			
2	14.307	1240081	35070	0.000			
Total		1264753	37530				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 25ug L5 19-3-2019.lcd

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename	: : oxo chuan 25ug L6 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	3-2019.lcm	
Vial #	: 1-1 : 10 ul	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/20/2019 4:29:42 PM : 3/20/2019 4:47:11 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>





<Peak Table>

FDAG	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.596	21153	2352	0.000			
2	3.287	6753	161	0.000			
3	14.300	1227474	34996	0.000			
Total		1255380	37509				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 25ug L6 19-3-2019.lcd

Phụ lục 4.3.2. Sắc ký đồ các mẫu thẩm định khoảng tuyến tính và đường chuẩn

3/21/2019 7:04:43 PM Page 1 / 1



<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename	: : oxo chuan 3.125ug 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	-2019.lcm	
Vial #	1-1	Sample Type	: Unknown
Injection Volume Date Acquired Date Processed	: 10 uL : 3/19/2019 8:37:59 PM : 3/19/2019 8:54:57 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>





<Peak Table>

PDAC	n i 254nm						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.443	1282	147	0.000			
2	2.597	22209	2449	0.000		V	
3	14.185	272443	7965	0.000			
Total		295934	10560				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 3.125ug 19-3-2019.lcd


Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: : oxo chuan 6.25ug 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	8-2019.lcm	
Vial #	: 1-1 : 10 ul	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/19/2019 8:15:58 PM : 3/19/2019 8:36:43 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.243	3210	348	0.000			
2	2.475	3077	408	0.000		V	
3	2.595	23768	2617	0.000		V	
4	14.165	418469	11975	0.000			
Total		448525	15348				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 6.25ug 19-3-2019.lcd



Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: : oxo chuan 12.5ug 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	8-2019.lcm	
Vial #	: 1-1	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 10 UL : 3/19/2019 7:53:40 PM : 3/19/2019 8:14:25 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.589	20242	2277	0.000			
2	14.131	696245	20198	0.000			
Total		716486	22475				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 12.5ug 19-3-2019.lcd

LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: : oxo chuan 25ug 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	-2019.lcm	
Vial #	: 1-1 : 10 ul	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/19/2019 7:30:36 PM : 3/19/2019 7:51:39 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

FDAG	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.589	18451	2032	0.000			
2	3.288	5923	131	0.000			
3	14.111	1214153	34814	0.000			
Total		1238527	36978				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 25ug 19-3-2019.lcd



Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: : oxo chuan 50ug 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	3-2019.lcm	
Vial #	1-1	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/19/2019 7:01:24 PM : 3/19/2019 7:22:26 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

FDAG	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.591	13294	1671	0.000			
2	3.288	6211	181	0.000			
3	14.069	2506725	71991	0.000			
Total		2526229	73842				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 50ug 19-3-2019.lcd

LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: : : oxo chuan 100ug 19-3-2019.lcd : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	-2019.lcm	
Batch Filename	: · 1_1	Sample Type	· Linknown
Injection Volume	: 10 uL	Campie Type	. Shkilown
Date Acquired	: 3/19/2019 6:35:20 PM	Acquired by	: System Administrator
Date Processed	: 3/19/2019 6:56:22 PM	Processed by	: System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA C	h1 254nm						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	0.324	37725	7640	0.000			
2	2.204	1005	151	0.000			
3	2.571	4291	1236	0.000			
4	2.675	12020	1079	0.000		V	
5	3.019	2780	232	0.000			
6	3.236	1322	181	0.000		V	
7	13.725	4900220	135794	0.000			
Total		4959363	146313				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\oxo chuan 100ug 19-3-2019.lcd

3/21/2019 7:04:14 PM Page 1 / 2



<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: Mau chiet 1 : : Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH-1 : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-5	-20-3-2019.lcd 3-2019.lcm	
Vial #	: 0x0-batch-20-03-2019.icb : 1-1	Sample Type	: Unknown
Injection Volume Date Acquired Date Processed	: 10 uL : 3/20/2019 8:19:47 PM : 3/21/2019 10:33:23 AM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>





<Peak Table>

PDA C	h1 254nm						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.385	66361	5673	1.140			
2	2.566	62661	7905	1.076		V	
3	2.942	29148	1771	0.501		V	
4	3.307	26660	3087	0.458		V	
5	3.534	117348	5258	2.015		V	
6	4.414	58706	2205	1.008		V	
7	5.348	918271	34403	15.770		V	
8	6.261	59676	2179	1.025		V	
9	6.783	27163	1178	0.467		V	
10	7.168	15467	605	0.266		V	
11	8.234	8949	330	0.154		V	
12	9.559	4287	208	0.074			
13	12.459	5579	213	0.096			
14	13.981	1424964	40655	24.472		V	
15	24.705	728575	20712	12.513			
16	25.134	58695	7673	1.008		V	
17	25.537	678950	34243	11.660		V	
18	25.818	39216	3841	0.674			
19	26.155	95901	7902	1.647			
20	26.474	173097	11024	2.973		V	
21	26.921	102659	6321	1.763		V	
22	27 154	142367	10071	2 445		V	

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH-1-20-3-2019.lcd



Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: : : Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH -1 : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	- L3.2-22-3-2019.lc -2019.lcm	d
Vial #	. 1-1	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/21/2019 12:12:11 PM : 3/21/2019 12:53:13 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
2.524	61215	4820	0.000			
2.701	71881	6105	0.000		V	
3.143	17396	1272	0.000		V	
3.451	28204	2480	0.000		V	
3.693	121861	4833	0.000		V	
4.627	53057	1991	0.000		V	
5.753	1043674	33001	0.000		SV	
7.147	4348	299	0.000		Т	
7.797	1226	45	0.000		Т	
14.763	1475847	32493	0.000			
24.766	277649	10236	0.000			
25.800	3489806	59826	0.000		V	
26.590	138772	8324	0.000		V	
27.127	104608	4483	0.000		SV	
27.920	12013	708	0.000		V	
28.244	12477	957	0.000		V	
30.440	55875	4795	0.000			
30.610	57859	4211	0.000		V	
31.781	3899	244	0.000			
34.285	83873	3748	0.000		S	
36.504	121968	5345	0.000			
37.408	5642	273	0.000		V	
	Ret. Time 2.524 2.701 3.143 3.451 3.693 4.627 5.753 7.147 7.797 14.763 24.766 25.800 26.590 27.127 27.920 28.244 30.440 30.610 31.781 34.285 36.504 37.408	Ret. Time Area 2.524 61215 2.701 71881 3.143 17396 3.451 28204 3.693 121861 4.627 53057 5.753 1043674 7.147 4348 7.797 1226 14.763 1475847 24.766 277649 25.800 3489806 26.590 138772 27.127 104608 27.920 12013 28.244 12477 30.440 55875 30.610 57859 31.781 3899 34.285 83873 36.504 121968 37.408 5642	Ret. Time Area Height 2.524 61215 4820 2.701 71881 6105 3.143 17396 1272 3.451 28204 2480 3.693 121861 4833 4.627 53057 1991 5.753 1043674 33001 7.147 4348 299 7.797 1226 45 14.763 1475847 32493 24.766 277649 10236 25.800 3489806 59826 26.590 138772 8324 27.127 104608 4483 27.920 12013 708 28.244 12477 957 30.610 57859 4211 31.781 3899 244 34.285 83873 3748 36.504 121968 5345 37.408 5642 273	Ret. Time Area Height Conc. 2.524 61215 4820 0.000 2.701 71881 6105 0.000 3.143 17396 1272 0.000 3.451 28204 2480 0.000 3.693 121861 4833 0.000 5.753 1043674 33001 0.000 7.147 4348 299 0.000 7.797 1226 45 0.000 24.766 277649 10236 0.000 25.800 3489806 59826 0.000 26.590 138772 8324 0.000 27.920 12013 708 0.000 27.920 12013 708 0.000 30.610 57859 4211 0.000 31.781 3899 244 0.000 34.285 83873 3748 0.000 34.285 83873 3748 0.000 34.285 8387	Ret. Time Area Height Conc. Unit 2.524 61215 4820 0.000 0 2.701 71881 6105 0.000 0 3.143 17396 1272 0.000 0 3.451 28204 2480 0.000 0 3.693 121861 4833 0.000 0 4.627 53057 1991 0.000 0 7.753 1043674 33001 0.000 0 7.797 1226 45 0.000 0 24.766 277649 10236 0.000 0 25.800 3489806 59826 0.000 0 26.590 138772 8324 0.000 0 27.920 12013 708 0.000 0 27.920 12013 708 0.000 0 30.610 57859 4211 0.000 0 31.781 3899 244 0.	Ret. Time Area Height Conc. Unit Mark 2.524 61215 4820 0.000 V 2.701 71881 6105 0.000 V 3.143 17396 1272 0.000 V 3.451 28204 2480 0.000 V 3.693 121861 4833 0.000 V 4.627 53057 1991 0.000 V 5.753 1043674 33001 0.000 SV 7.147 4348 299 0.000 T 7.797 1226 45 0.000 T 14.763 1475847 32493 0.000 V 26.590 138772 8324 0.000 V 26.590 138772 8324 0.000 V 27.920 12013 708 0.000 V 28.244 12477 957 0.000 V 30.610 57859 421

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH -1- L3.2-22-3-2019.lcd



Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH -1 oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	- L4-22-3-2019.lcd -2019.lcm	
Vial #	: 1-1 : 10 ul	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/21/2019 1:21:33 PM : 3/21/2019 2:02:35 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

FUAC	111 2341111						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	0.035	5626	464	0.000			
2	1.013	3982	188	0.000			
3	2.553	65492	4714	0.000			
4	2.742	98848	6258	0.000		V	
5	3.682	150838	4732	0.000		V	
6	4.655	50825	1904	0.000		V	
7	5.918	944518	27743	0.000		V	
8	6.923	48059	1604	0.000		V	
9	15.075	1465971	31450	0.000			
10	24.829	329784	10507	0.000			
11	25.612	1515321	54151	0.000		V	
12	25.723	1490014	54495	0.000		V	
13	26.625	131812	9485	0.000		V	
14	27.155	95130	4583	0.000		V	
15	27.666	6076	534	0.000		V	
16	27.968	12281	741	0.000		V	
17	28.275	12172	1017	0.000		V	
18	30.465	59105	5217	0.000			
19	30.647	54430	4255	0.000		V	
20	31.810	4673	279	0.000			
21	34.275	96732	3850	0.000			
22	36.471	114207	5265	0.000			

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH -1- L4-22-3-2019.lcd

LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH -1 oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	- L5-22-3-2019.lcd -2019.lcm	
Vial # Injection Volume	: : 1-1 : 10 uL	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/21/2019 2:33:31 PM : 3/21/2019 3:24:33 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
2.472	61966	4904	0.000			
2.645	71654	6520	0.000		V	
3.062	17740	1337	0.000		V	
3.378	31517	2513	0.000		V	
3.645	125977	4972	0.000		V	
4.566	61275	2128	0.000		V	
5.725	1034714	33587	0.000		SV	
7.008	4271	262	0.000		Т	
13.131	1253	70	0.000			
14.400	1447025	32237	0.000		V	
25.732	3474187	60001	0.000			
26.564	129841	9410	0.000		V	
27.113	103145	4877	0.000		SV	
27.985	11969	694	0.000		V	
28.238	10494	897	0.000		V	
30.436	117703	5333	0.000			
31.639	3938	253	0.000			
34.101	79758	3726	0.000		S	
36.218	119136	5137	0.000			
37.106	8208	342	0.000		V	
42.527	41810	1307	0.000			
46.087	36952	2475	0.000			
	Ret. Time 2.472 2.645 3.062 3.378 3.645 4.566 5.725 7.008 13.131 14.400 25.732 26.564 27.113 27.985 28.238 30.436 31.639 34.101 36.218 37.106 42.527 46.087	Ret. Time Area 2.472 61966 2.645 71654 3.062 17740 3.378 31517 3.645 125977 4.566 61275 5.725 1034714 7.008 4271 13.131 1253 14.400 1447025 25.732 3474187 26.564 129841 27.113 103145 27.985 11969 28.238 10494 30.436 117703 31.639 3938 34.101 79758 36.218 119136 37.106 8208 42.527 41810 46.087 36952	Ret. Time Area Height 2.472 61966 4904 2.645 71654 6520 3.062 17740 1337 3.378 31517 2513 3.645 125977 4972 4.566 61275 2128 5.725 1034714 33587 7.008 4271 262 13.131 1253 70 14.400 1447025 32237 25.732 3474187 60001 26.564 129841 9410 27.113 103145 4877 27.985 11969 694 28.238 10494 897 30.436 117703 5333 31.639 3938 253 34.101 79758 3726 36.218 119136 5137 37.106 8208 342 42.527 41810 1307 46.087 36952 2475	Ret. Time Area Height Conc. 2.472 61966 4904 0.000 2.645 71654 6520 0.000 3.062 17740 1337 0.000 3.378 31517 2513 0.000 3.645 125977 4972 0.000 3.645 125977 4972 0.000 5.725 1034714 33587 0.000 5.725 1034714 33587 0.000 7.008 4271 262 0.000 13.131 1253 70 0.000 25.732 3474187 60001 0.000 26.564 129841 9410 0.000 27.113 103145 4877 0.000 27.985 11969 694 0.000 30.436 117703 5333 0.000 31.639 3938 253 0.000 34.101 79758 3726 0.000 37.106	Ret. Time Area Height Conc. Unit 2.472 61966 4904 0.000 0 2.645 71654 6520 0.000 3.062 17740 1337 0.000 3.378 31517 2513 0.000 3.645 125977 4972 0.000 4.566 61275 2128 0.000 5.725 1034714 33587 0.000 7.008 4271 262 0.000 13.131 1253 70 0.000 25.732 3474187 60001 0.000 26.564 129841 9410 0.000 27.113 103145 4877 0.000 27.985 11969 694 0.000 28.238 10494 897 0.000 31.639 3938 253 0.000 34.101 79758 3726 0.000 34.101 79758 3726 0.000 3	Ret Time Area Height Conc. Unit Mark 2.472 61966 4904 0.000 V 2.645 71654 6520 0.000 V 3.062 17740 1337 0.000 V 3.378 31517 2513 0.000 V 3.645 125977 4972 0.000 V 3.645 125977 4972 0.000 V 3.645 125977 4972 0.000 V 5.725 1034714 33587 0.000 V 5.725 1034714 33587 0.000 V 25.732 3474187 60001 0.000 V 25.732 3474187 60001 0.000 V 27.113 103145 4877 0.000 V 27.113 103145 4877 0.000 V 28.238 10494 897 0.000 V 31.639 3938

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH -1- L5-22-3-2019.lcd

LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: : : Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH -1 : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	- L6-22-3-2019.lcd -2019.lcm	
Vial #	: 1-1 : 10 ul	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/21/2019 3:26:30 PM : 3/21/2019 4:17:33 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA C	h1 254nm						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.462	60832	4927	0.000			
2	2.637	69184	6583	0.000		V	
3	3.083	18437	1248	0.000		V	
4	3.357	29678	2474	0.000		V	
5	3.624	120118	4987	0.000		V	
6	4.526	56323	2049	0.000		V	
7	5.163	24673	1617	0.000		V	
8	5.635	981435	33610	0.000		SV	
9	6.954	4330	316	0.000		Т	
10	14.209	1414563	32250	0.000			
11	25.709	3839197	73047	0.000			
12	26.569	140745	9762	0.000		V	
13	27.099	123744	5362	0.000		SV	
14	27.966	15187	880	0.000		V	
15	28.245	12292	928	0.000		V	
16	29.523	1643	145	0.000			
17	30.460	113882	5349	0.000			
18	31.634	4327	249	0.000			
19	34.057	86463	4001	0.000			
20	34.773	3859	211	0.000		V	
21	36.150	108575	4889	0.000			
22	39.178	80171	950	0.000			

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH -1- L6-22-3-2019.lcd



Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename Batch Filename	: Mauchiet 1 intra : : Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH-1- : oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3 : oxo-batch-20-03-2010 lch	-intra-20-3-2019.lcd -2019.lcm	
Vial #	: 1-1 : 10 ul	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/21/2019 1:28:18 AM : 3/21/2019 12:55:21 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>





<Peak Table>

PDA C	h1 254nm						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.402	67506	5817	1.891		V	
2	2.573	61431	7313	1.721		V	
3	2.962	27971	1721	0.784		V	
4	3.332	27060	2854	0.758		V	
5	3.583	115026	4946	3.223		V	
6	4.500	49723	1987	1.393		V	
7	5.626	939365	33412	26.321		SV	
8	6.644	6022	406	0.169		ΤV	
9	6.965	8627	490	0.242		ΤV	
10	10.166	3386	188	0.095			
11	14.532	1407767	39192	39.445			
12	24.235	5381	791	0.151			
13	24.320	5063	1174	0.142		V	
14	24.549	46373	5401	1.299		V	
15	24.759	61019	6586	1.710		V	
16	24.957	52288	4396	1.465		V	
17	25.167	30661	2717	0.859		V	
18	25.430	17601	2698	0.493		V	
19	25.621	10443	1722	0.293		V	
20	25.809	20653	2146	0.579		V	
21	25.921	6640	1491	0.186		V	
22	26.060	10241	1085	0.287		V	

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH-1-intra-20-3-2019.lcd

5/3/2019 12:34:56 PM Page 1 / 1



<Sample Information>

Sample Name Sample ID							
Data Filename	: Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH th	nêm 120% chuan22	2-3-2019.lcd				
Method Filename	: oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3-2019.lcm						
Batch Filename	:						
Vial #	: 1-1	Sample Type	: Unknown				
Injection Volume	: 10 uL	A ' 11	0 / A / · · / /				
Date Acquired	: 3/21/2019 5:27:25 PM	Acquired by	: System Administrator				
Date Processed	: 3/22/2019 11:16:30 AM	Processed by	: System Administrator				

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA C	h1 254nm						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	13.946	3009994	67919	0.000		Μ	
Total		3009994	67919				

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH thêm 120% chuan22-3-2019.lcd



Sample Name Sample ID			
Data Filename	: Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH th	1êm 100% l2chuan	122-3-2019.lcd
Method Filename	: oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	3-2019.lcm	
Batch Filename	:		
Vial #	· 1-1	Sample Type	· Unknown
Injection Volume	· 10 ul	eample type	
Date Acquired	· 3/21/2019 6·22·17 PM	Acquired by	· System Administrator
Date Processed	· 2/21/2010 7:12:20 DM	Drococood by	: Cystem Administrator
Date Processed	. 3/21/2019 7.13.20 PW	Processed by	. System Auministrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA C	<u>h1 254nm</u>			-			••
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.436	60251	4891	0.000			
2	2.613	71933	6362	0.000		V	
3	3.021	17136	1274	0.000		V	
4	3.312	28826	2479	0.000		V	
5	3.577	113817	4778	0.000		V	
6	4.454	53952	1935	0.000		V	
7	5.467	980322	33596	0.000		SV	
8	6.199	5937	386	0.000		Т	
9	6.816	1586	159	0.000		Т	
10	13.870	2388696	55838	0.000			
11	25.675	3706074	68034	0.000			
12	26.524	139454	10621	0.000		V	
13	27.059	126240	5768	0.000		V	
14	27.659	5878	546	0.000		V	
15	27.952	28118	1255	0.000		V	
16	29.453	2160	182	0.000			
17	29.707	1085	117	0.000		V	
18	30.365	2029093	144158	0.000			
19	31.520	2589	199	0.000		V	
20	31.955	2695	171	0.000			
21	32.574	2387	139	0.000			
22	33.925	202519	10044	0.000			

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH thêm 100% l2chuan22-3-2019.lcd

LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name Sample ID Data Filename Method Filename	: Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH th oxo-MeOH-35-0.1%acid formic-19-3	êm 80% l2chuan2; ;-2019.lcm	2-3-2019.lcd
Vial #	: 1-1 : 10 ul	Sample Type	: Unknown
Date Acquired Date Processed	: 3/21/2019 7:19:15 PM : 3/21/2019 8:10:17 PM	Acquired by Processed by	: System Administrator : System Administrator

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table> PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.408	66155	5329	0.000			
2	2.583	73382	6821	0.000		V	
3	2.997	20538	1454	0.000		V	
4	3.271	32059	2764	0.000		V	
5	3.527	122761	5254	0.000		V	
6	4.384	62822	2286	0.000		V	
7	5.267	1039195	48127	0.000		SV	
8	5.879	14062	1054	0.000		Т	
9	6.400	2672	146	0.000		Т	
10	7.308	4559	263	0.000		Т	
11	8.491	5088	240	0.000			
12	12.476	2378018	57882	0.000			
13	25.639	3410129	58463	0.000			
14	26.473	139190	9723	0.000		V	
15	27.023	99875	4836	0.000		V	
16	27.900	17693	934	0.000			
17	30.264	454125	29388	0.000			
18	31.416	4932	279	0.000			
19	31.830	5890	316	0.000		V	
20	33.790	120889	5286	0.000			
21	35.814	109541	4942	0.000			
22	41.857	31651	1170	0.000			

D:\HLSON\thao-diem\oxo chuan 19-3-2019\Mau chiet 0.5 g trong 50ml MeOH thêm 80% l2chuan22-3-2019.lcd

PHỤ LỤC 5. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO *IN VITRO* PHỤ LỤC 5. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO *IN VITRO*

[CµM]	Dãy nồng độ thử (*) [CµM]									
Chất thử	C1	C2	C3	C4	C5	C6				
SD1 (stedieltin A)	239	119.5	59.75	29.88	14.94	7.47				
SD2 (stedieltin B)	563	281.5	140.75	70.38	35.19	17.6				
SD3 (oxostephanin)	65.5	32.75	16.38	8.19	4.1	2.05				
SD4 (oxostephanosin)	156.4	78.2	39.1	19.55	9.8	4,9				
SD5 (oxocrebanin)	187	93.5	46.75	23.38	11.69	5.85				

Dải nồng độ thử nghiệm của các hợp chất

Tế bào	Dòng tế bào ung thư cổ tử cung Hela										
Chất thử	[C1]	[C2]	[C3]	[C4]	[C5]	[C6]					
SD1											
SD2	A A										
SD3											

Phụ lục 5.1. Hình thái các dòng tế bào dưới tác dụng của SD1, SD2, SD3, SD4, SD5 tại thời điểm 48h (VK 10X, Zoom 5,6)



Hình PL5.1.1. Hình thái dòng tế bào Hela dưới tác dụng của SD1, SD2, SD3, SD4 và SD5 tại thời điểm 48h (VK 10X, Zoom 5,6)

Tế bào		Dòng tế bào ung thư gan HepG2										
Chất thử	[C1]	[C2]	[C3]	[C4]	[C5]	[C6]						
SD1												
SD2												
SD3												



Hình PL5.1.2. Hình thái dòng tế bào HepG2 dưới tác dụng của SD1, SD2, SD3, SD4 và SD5 tại thời điểm 48h (VK 10X, Zoom 5,6)





Hình PL5.1.3. Hình thái dòng tế bào MCF7 dưới tác dụng của SD1, SD2, SD3, SD4 và SD5 tại thời điểm 48h (VK 10X, Zoom 5,6)

Tế bào	Dòng tế bào ung thư dạ dày N87										
Chất thử	[C1]	[C2]	[C3]	[C4]	[C5]	[C6]					
SD1											
SD2											
SD3											



Hình PL5.1.4. Hình thái dòng tế bào N87 dưới tác dụng của SD1, SD2, SD3, SD4 và SD5 tại thời điểm 48h (VK 10X, Zoom 5,6)

Tế bào		Dòng tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-8										
Chất thử	[C1]	[C2]	[C3]	[C4]	[C5]	[C6]						
SD1												
SD2												
SD3												



Hình PL5.1.5. Hình thái các dòng tế bào dưới tác dụng của SD1, SD2, SD3, SD4 và SD5 tại thời điểm 48h (VK 10X, Zoom 5,6)

Phụ lục 5.2. Kết quả thử nghiệm MTS

		Hela/chất thử (*)												
Nồng độ	SI	01	SD2		SI	SD3		SD4		SD5				
thử	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%				
	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2				
[C1]	87.23963	71.91967	85.73939	65.01832	3.851419	10.9586	43.97869	48.25278	46.68319	40.22659				
[C2]	92.13807	79.41749	82.01006	71.32808	4.232491	15.33168	49.3729	55.14117	76.15524	65.06046				
[C3]	89.50202	85.70294	85.89663	76.65727	8.119057	19.21825	65.796	69.9504	83.77298	73.16607				
[C4]	91.97344	73.37353	83.66569	85.21022	43.67346	44.88142	73.86696	77.40283	87.59666	92.30931				
[C5]	88.94336	84.05459	87.41167	85.04003	59.04399	60.09471	80.74846	85.83909	90.19017	89.682				
[C6]	94.26172	92.4876	80.94454	88.52637	70.40993	77.53339	86.75867	83.77257	92.58944	97.2803				
	Chưa xác	định được	Chưa xác	Chưa xác định được		$IC_{50} = 22.4 \pm 0.7$		$IC_{50} = 97.4 \pm 4.6$		$IC_{50} = 160.3 \pm 9.2$				
1 D IC 50	IC	C 50	IC	C50	$R^2 =$	0.99	$R^2 = 0.98$		$R^2 = 0.99$					

Bảng PL5.2.1. Tỷ số tăng sinh (A%) và giá trị IC₅₀ (μM) các hợp chất trên dòng Hela

					HepG2/cł	nất thử (*)					
Nồng độ	độ SD1		SI	SD2		SD3		04	SI	SD5	
thử	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	
	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	
[C1]	84.61947	78.58814	93.9785	91.8382	16.57905	17.81785	42.7326	41.13647	61.7276	65.4921	
[C2]	84.14629	85.91196	87.53137	102.9225	22.95835	23.68913	63.03166	75.18653	79.81924	67.78471	
[C3]	84.34308	86.51733	102.5215	104.1211	25.11361	29.02393	88.27885	83.77535	93.50709	72.36824	
[C4]	91.75032	88.89473	94.18877	101.0313	33.9144	36.51604	90.69442	90.89398	96.78322	78.9222	
[C5]	97.92597	92.65753	110.1014	99.87717	45.58604	45.28229	99.97574	92.11151	93.29173	92.41844	
[C6]	106.1624	91.64349	104.5818	102.6789	77.56613	73.37452	100.769	94.13111	93.64275	96.16598	
TB IC ₅₀	Chưa xác định được IC ₅₀		Chưa xác định được IC ₅₀		$IC_{50} = 3.2 \pm 0.18$ $R^2 = 0.97$		$IC_{50} = 122.9 \pm 5.7$ $R^2 = 0.98$		Chưa xác định được IC ₅₀		

Bảng PL5.2.2. Tỷ số tăng sinh (A%) và giá trị IC₅₀ (μM) các hợp chất trên dòng HepG2

Bảng PL5.2.3. Tỷ số tăng sinh (A%) và giá trị IC₅₀ (μM) các hợp chất trên dòng MCF7

		MCF7/chất thử (*)											
Nồng	SI	D1	SI	02	SI	SD3		SD4)5			
độ thử	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%			
	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2			
[C1]	99.4224	91.5443	99.3188	94.2135	19.4976	21.1046	51.2179	48.2528	70.4539	87.4335			
[C2]	96.1201	90.3802	119.5194	90.4029	21.5138	24.1558	61.5389	55.1412	79.0475	91.6739			
[C3]	88.3494	92.6743	104.7191	92.5151	28.5107	28.6422	86.8509	69.9504	85.0580	94.3977			
[C4]	94.1257	90.1551	118.8437	100.0409	32.6740	35.6600	91.9950	77.4028	94.9649	95.6459			
[C5]	103.2260	94.9775	104.0761	104.8088	37.4367	38.0406	100.1417	85.8391	95.6515	97.9219			
[C6]	102.5176	112.5392	115.6940	107.9191	64.0837	68.1343	108.2230	83.7726	102.5156	103.1217			
ТВ	Chưa xác định được		Chưa xác định		$IC_{50} = 3$	$IC_{50} = 3.1 \pm 0.06$		Chưa xác định được		Chưa xác định được			
IC50	IC	C50	được IC ₅₀		$R^2 =$	$R^2 = 0.99$		IC50		250			

	N87/chất thử (*)									
Nồng	SD1		SD2		SD3		SD4		SD5	
độ thử	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%
	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2
[C1]	80.3796	83.2629	94.4085	92.2155	17.3548	23.1243	27.6201	30.4598	37.2652	36.1925
[C2]	84.9834	86.3968	110.6279	96.3836	22.1961	24.5169	33.7843	34.3151	59.0587	56.8709
[C3]	90.0173	89.9630	86.8964	106.8793	27.7251	24.1467	51.0090	49.9224	72.0398	69.3157
[C4]	86.9289	94.9552	101.2804	103.2175	39.0107	40.4132	64.0826	65.5153	79.6244	85.6204
[C5]	88.8619	97.3391	89.0570	104.7199	41.6365	43.3130	78.5191	87.2256	82.8228	87.7511
[C6]	92.9831	99.3813	98.2570	109.6835	62.4547	72.0745	93.4932	98.3351	90.9250	93.1566
TB IC ₅₀	Chưa xác định		Chưa xác định		$IC_{50} = 33 \pm 0.08$		$IC_{50} = 66.1 \pm 0.9$		$IC_{50} = 115.3 \pm 1.34$	
	được IC ₅₀		được IC ₅₀		$R^2 = 0.98$		$R^2 = 0.98$		$R^2 = 0.97$	

Bảng PL5.2.4. Tỷ số tăng sinh (A%) và giá trị IC₅₀ (μM) các hợp chất trên dòng N87

Bảng PL5.2.5. Tỷ số tăng sinh (A%) và giá trị IC₅₀ (μM) các hợp chất trên dòng OVCAR-8

	OVCAR-8/chất thử (*)									
Nồng độ	SD1		SD2		SD3		SD4		SD5	
thử	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%	A%
	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2
[C1]	72.2376	66.2476	58.1627	68.4644	9.7973	7.9796	36.1331	28.9418	60.6211	77.7205
[C2]	84.2209	84.0850	66.3012	82.4761	14.1768	17.9756	38.9007	41.8109	67.5811	82.5288
[C3]	91.3886	91.5213	75.6472	87.8724	31.3100	35.9778	46.8460	46.8889	70.1748	82.5184
[C4]	90.4885	87.2072	78.6515	89.0325	34.8917	39.9210	50.1352	54.8584	73.3820	85.1430
[C5]	92.4965	87.9185	86.0075	89.7533	43.2571	42.9751	71.7591	67.9742	75.1304	92.8231
[C6]	96.5567	95.2546	87.3793	95.7925	66.1819	72.5355	80.7187	77.5350	91.3785	96.8654
TB IC ₅₀	Chưa xác định		Chưa xác định		$IC_{50} = 3.4 \pm 0.007$		$IC_{50} = 30 \pm 1.4$		Chưa xác định	
	được IC ₅₀		được IC ₅₀		$R^2 = 0.99$		$R^2 = 0.98$		được IC ₅₀	

PHỤ LỤC 6. CÁC CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

TẠP CHÍ Y Dược cổ truyền Việt Nam

JOURNAL OF TRADITIONAL VIETNAMMESE MEDICINE AND PHARMACY

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM

ISSN 2354-1334



Địa chỉ: Số 2, Trần Phú, Hà Đông, Hà Nội Tel: 84-243-3824929 * Fax: 84-243-3824931 - Website: http://www.vutm.edu.vn



Scanned with CamScanner

MỤC LỤC SỐ 06(25) - 2019

BÀI NGHIÊN CỨU

A Nghiên cứu độc tính bản trường diễn của viên nang CTHepaB trên chuột cống trắng Study of semi-chronic toxicities of CTHepaB capsules on white rats

Đậu Xuân Cảnh¹; Lê Thị Tuyết¹; Trần Thị Mỹ Linh²; Vũ Quang Thá^a 'Học viện Y Dược học có truyến Việt Nam

²Học viên cao học ³Bệnh viện Phụ sản

11 Đánh giá mức độ teo thuỳ thái dương trên bệnh nhân Alzheimer bằng chụp MRI tại Bệnh viện Lão khoa Trung ương

Evaluate the temparal lobe atrophy on Alzheimer patients by MRI scans at national geriatric hospital Trần Văn Ngọc¹, Phạm Thắng¹, Vũ Đăng Lưu², Nguyễn Thị Quỳnh Nga³ 'Bệnh viện Lão khoa Trung ương ²Trường Đại học Y Hà Nội ³Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

17 Xác định độc tính cấp và đánh giá tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của viên nang cứng HSN trên động vật thực nghiệm

Determine acute toxicity and evaluate the effect of regulating blood lipid disorders of HSN hard capsules on experimental animals

Đậu Xuân Cảnh, Phạm Thị Vân Anh,Trần Thị Hồng Ngãi, Đỗ Nguyễn Ngọc Anh Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

23 Chăm sóc người bệnh U Lympho không Hogdkin và một số yếu tố liên quan tại Trung tâm Huyết học truyền máu Bệnh viện Bạch Mai 2019

Caring for Lymphoma patients without Hogdkin and some related factors at hematology and blood transfusion center of Bach Mai hospital

Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Lan, Lưu Phương Lan Bệnh viện Bạch Mai

28 Thực trạng nhận thức của sinh viên năm thứ nhất Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam về kỹ năng giao tiếp

Current status of awareness of first-year students of Vietnam university of traditonal medicine about communication skills

Đinh Thị Cẩm Tũ, Đinh Văn Tài, Trần Thị Thu Hà Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

33 Nghiên cứu định lượng rutin trong một số dạng chế biến của nụ hòe (Flos Styphnolobil japonici) bằng phương pháp HPLC

Research on the amount of Rutin in some forrm of processing Flos Styphnolobii japonici by HPLC method

Phạm Thị Hồng Duyên', Trần Thị Thu Hiên', Lê Thị Thu Hảⁱ Nguyễn Thị Hồng Hạnh², Đàm Thị Hồr 'Học viện Y Dược học cổ truyến Việt ^{Nam} ²Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Hà Nội

2 | TẠP CHÍ Y DƯỢC CÓ TRUYỆN VIỆT NAM Số 06(25)-2019

Scanned with CamScanner

40

Nghiên cứu cơ cấu bệnh tật và hoạt động khám chữa bệnh của Bệnh viện Y học cổ truyền Bảo Lộc tỉnh Lâm Đồng năm 2018

Study on disease structure and disease examination activities of bao loc traditional medicine hospital Lam Dong province in 2018

Nguyễn Thùy Lính¹, Trần Thị Minh Tâm², Lưu Minh Châu² 'Bệnh viện Y học cổ truyền Bảo Lộc 'Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

47 Nghiên cứu độc tính cấp và ảnh hưởng của thuốc GANMO đến tình trạng chung và chức năng tạo máu trên động vật thực nghiệm

Study on acute toxicity and effects of GANMO medicine on general state and hematopoietic function of experimental animals

Hà Thị Bích Ngọc, Phạm Bá Tuyến Bệnh viện YHCT Bộ Công an

55 Thực trạng nhiễm giun truyền qua đất của học sinh lớp 3 và 4 tại 3 xã huyện Tân Sơn tỉnh Phú Thọ năm học 2018 - 2019

The situation of soil-transmitted helminth infections of students in grade 3 and 4 at 3 communes of Tan Son district, Phu Tho province in 2018 - 2019

Lê Trường Giang¹, Đoàn Trọng Trung², Lê Thị Tuyết³ ¹Học viên cao học, ²Đại học Y Thái Bình, ³Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

61 Định lượng alkaloid trong phần trên mặt đất của cây củ dòm *(Stephania dielsiana Y.C.Wu)* bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Determining the amount of Alkaloid in the upper part of Stephania dielsiana Y.C.Wu by high performance liquid chromatography

Tống Minh Thảo¹, Trần Thị Thu Hiền¹, Lê Hoàng Sơn² ¹Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam ²Viện Dược liệu

66 Mối liên quan chỉ số non HDL-C, với các thể Y học cổ truyền ở người bệnh rối loạn lipid máu tại Bệnh viện Đa khoa Gò Vấp

Relationship of non-hdl-c index, with some symptoms of traditional medicine in patients with dyslipidemia at go vap general hospital

Trần Đức Lưu¹, Trần Thị Minh Tâm², Lưu Minh Châu² ²Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam ¹Bệnh viện Đa khoa Gò Vấp

73 Tác dụng giảm đau, cải thiện vận động của bài thuốc dưỡng cốt HV kết hợp điện châm ở bệnh nhân đau thắt lưng do thoái hóa cột sống

Analgesis and motion improvement effect of "Duding content the the terms of te

Nguyễn Tiến Chung¹, Nguyễn Thị Quý² ¹Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam ²Bệnh viện Y Dược cổ truyền Thanh Hóa

TẠP CHÍY DƯỢC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM SỐ 06(25)-2019 3



Định lượng alkaloid trong phần trên mặt đất của cây củ dòm (Stephania dielsiana Y.C.Wu) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

DETERMINING THE AMOUNT OF ALKALOID IN THE UPPER PART OF STEPHANIA DIELSIANA Y.C.WU BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Tống Minh Thảo¹, Trần Thị Thu Hiển¹, Lê Hoàng Sơn²

¹Học viện Y Dược học cố truyền Việt Nam Viên Dược liệu

TÓM TẮT

Oxostephanin là một trong những thành phần chính của cây củ dòm – Stephania dielsiana Y.C.Wu, đã được chiết xuất, phân lập và định lượng bằng HPLC. Oxostephanin được trong dược liệu chiết xuất bằng methanol. Phương pháp định lượng có độ đúng và độ chính xác cao. Đường tuyến tính được đánh giá trong khoảng 3,125 – 100 μg/ml với hệ số tương quan 0,9993. Phương pháp này phù hợp để xác định oxostephanin trong cây củ dòm và áp dụng hiệu quả trong tối ưu hóa chiết xuất, phân lập oxostephanin từ S. dielsiana.

SUMMARY

Oxostephanin, as one of the active component from Stephania dielsiana Y.C.Wu, was isolated and analyzed by HPLC. Oxostephanin was extracted using methanol. The proposed method was fully validated proving acceptable prescision and accuracy. A good linearity was observed in concentration range of 3,125 – 100µg/ml with a correlation coefficient of 0,9993. The method was suitable for determination of oxostephanin in Stephania dielsiana, and effectively applicable to following oxostephanin concent in optimzing the isolation and purification of oxostephanin from S. dielsiana.

Keywords: Stephania dielsiana, oxostephanin.

ĐĂT VẤN ĐẾ

Củ dòm (Stephania dielsiana Y.C.Wu, họ Tiết dê – Menispermaceae)[1] là cây thân leo nhỏ, cao 2 – 3m. Rễ phình thành củ. Cành non nâu nhạt, khi già nâu xám. Cây có nhựa màu đỏ. Củ dòm được dân tộc Dao ở Ba Vì dùng để chữa đau dạ dày, phong thấp. Năm 2009, Nguyễn Quốc Huy, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Mai Hương[3] đã công bố oxostephanin gây trên 3 dòng ung thư gan, ung thư phổi và ung thư màng tim. Năm 2010, Nguyễn Quốc Huy[2] đã công bố phân lập được 3 chất từ cây củ dòm là L-tetrahydropalmatin, dehydrocrebain

> Ngày nhận bài: 7/11/2019 Ngày phản biện: 8/11/2019 Ngày chấp nhận đăng: 12/11/2019

TẠP CHÍ Y DƯỢC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM SỐ 06(25)-2019 | 61

BÀI NGHIÊN CỨU 🏅

và oxostephanin. Trong đó, oxostephanin là alkaloid đầu tiên phân lập được công bố tại Việt Nam. Để góp phần tiêu chuẩn hóa dược liệu củ dòm tiến hành đề tài "Nghiên cứu định lượng alkaloid trong phần trên mặt đất của cây củ dòm bằng HPLC".

ĐỔI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CƯU

Nguyên liệu

Thân lá củ dòm thu hái tại Ba Vì, Hà Nội và Quản Bạ, Hà Giang.

Dung môi, hóa chất

- Chất chuẩn oxostephanin (hàm lượng > 98%) do Đại học Dược Hà Nội cung cấp.

Các hóa chất dung môi loại tinh khiết phân tích.

Thiết bị và điều kiện phân tích

 Thiết bị phòng thí nghiệm đã được hiệu chuẩn và đáp ứng yêu cầu GLP và ISO/IEC 17025.

 Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu với detector DAD.

Phương pháp nghiên cứu

Dược liệu xay nhỏ, rây qua rây 315nm được bột mịn, đồng nhất. Tiến hành chiết oxostephanin bằng phương pháp siêu âm, khảo sát các điều kiện (dung môi, thời gian chiết).

Mẫu thử phân tích bằng HPLC và đánh giá sơ bộ để chọn phương pháp chiết tối ưu. Phương pháp xử lý mẫu được chọn như sau:

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,5000g bột dược liệu, chiết với 50ml dung môi nước; ethanol 30, 50, 70, 96%, methanol. Sau đó thêm dung môi vừa đủ với bình định mức 50ml. Siêu âm trong 1 giờ. Lọc dung dịch qua màng lọc 0,45μm trước khi phân tích định lượng.

- Dung dịch chuẩn:

+ Dung dịch gốc: Cân chính xác khoảng 1mg chất chuẩn oxostephanin hòa tan vào 1ml methanol trong bình định mức 1 ml. + Dāy nồng độ chuẩn: Pha dãy chất chuẩn trong bình định mức 1ml với nồng độ 3,125-100 μ g/ml. Nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp

Điều kiện sắc ký

- Cột Supelco C18 (5μm, 250 x 4,6mm).

Detectorm DAD, bước sóng 254nm.

- Pha động: MeOH: Nước có HCOOH 0,1% (35:65).

- Thể tích tiêm mẫu 10μ.

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Thời gian chạy dung môi: 50 phút.

• Thẩm định phương pháp[4]

Quy trình phân tích thẩm định theo AOAC.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Xây dựng phương pháp phân tích Phương pháp chuẩn bị mẫu

Tiến hành khảo sát các điều kiện chiết (dung môi, thời gian chiết), phân tích mẫu thử bằng HPLC và đánh giá sơ bộ để chọn phương pháp chiết tối ưu. Đề tài chọn dung môi methanol để chiết oxostephanin.

Xây dựng phương pháp phân tích

Oxostephanin trong mẫu thử được phân tích bằng HPLC với detector DAD với pha tĩnh C18. Pha động và dung môi được khảo sát, lựa chọn điều kiện tối ưu. Với điều kiện sắc ký này, oxostephanin tách hoàn toàn ra khỏi các chất khác cho phép định tính và định lượng oxostephanin trong dịch chiết từ dược liệu. Kết quả được trình bày ở hình 1.



Hình 1. SKĐ và bước sóng hấp phụ cực đại của oxostephanin

62 | TẠP CHÍ Y DƯỢC CỔ TRUYỆN VIỆT NAM Số 06(25)-2019
Qua tham khảo các nghiên cứu trước đây, để tài chọn bước sóng 254nm để nghiên cứu.

Thẩm định phương pháp

Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu trắng và mẫu thử thêm chuẩn của cây củ dòm. Kết quả trình bày trong hình 2 cho thấy oxost oxostephanin được tách hoàn toàn khỏi chất khác. Thời gian lưu của oxostephanin trong mẫu thử tương tự thời gian lưu chất chuẩn. Phương pháp đủ đặc hiệu để định lượng oxostephanin.



Hình 2. SKĐ tính đặc hiệu của phương pháp ở λ =254nm (1) mẫu trắng, (2) oxostephanin chuẩn, (3) mẫu thử, (4) mẫu thử thêm chuẩn.

Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Mẫu chuẩn oxostephanin pha loãng dần đến khi trên sắc kí đồ có tỷ lệ S/N trong khoảng 2 - 11. Từ đó, xác định LOD và LOQ. Mỗi mẫu lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình. Kết quả thu được tại nồng độ 0,0024 và 0,0079µg/ml tỷ lệ S/N tương ứng là 3 và 10.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của oxostephanin ở nồng độ 0,0024 μg/ml (1) và 0,0079 μg/ml (2)

Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Tiến hành khảo sát sự tương quan tuyến tính giữa nông độ và diện tích pic của oxostephanin, tiêm các dung dịch chuẩn có nông độ từ 3,125 - 100μ g/ml với các điều kiện sắc ký. Kết quả ghi trong bảng 1 và hình 4 cho thấy sự tương quan tuyến tính (với hệ số tương quan R² = 0,993) giữa nông độ và diện tích pic tương ứng trong khoảng nông độ khảo sát.

Bảng 1. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của oxostephanin

STT	Nông dộ oxostephanin (μg∕ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	100	4900220
2	50	2506725
3	25	1214153
4	12,5	696245
5	6,25	418469
6	3,125	272443
		(1100

Phương trình hồi quy: y = 48390x + 65108 Hệ số tương quan hồi quy: R² = 0,9993





Độ thích hợp hệ thống

Tiến hành tiêm dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 25µg/ml, ghi lại sắc ký đồ và tính độ lệch chuẩn tương đối. Kết quả ở bảng 2.

TẠP CHÍ Y DƯỢC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM SỐ 06(25)-2019 63

BÀI NGHIÊN CỨU

Bảng 2. Độ thích hợp hệ thống

		Diện tích pic
STT	Thời gian lưu	(mAU.s)
	(pnut)	1214153
1	14,111	1219037
2	14,148	1215144
3	14,334	1227682
4	14,320	1240081
5	14,307	1227474
6	14,300	1223929
ТВ	14,253	0.804
RSD (%)	0.682	0,001

Độ đúng

Thêm chuẩn ở 3 mức 80, 100 và 120 so với lượng oxostephanin trong mẫu. Tiến hành định lượng mẫu thêm chuẩn bằng phương pháp HPLC. Kết quả cho thấy phương pháp phân tích có độ đúng cao. Kết quả trình bày trong bảng 3

Bảng 3. Kết quả	i khảo	sát độ	đúng của	phương pl	ıáp
-----------------	--------	--------	----------	-----------	-----

Mức thêm chuấn	M _{duợc liệu} (g)	Nông độ thực của được liệu (µg/ml)	Nống độ chuẩn thêm vào (µg/ml)	Nồng độ mẫu khi thêm chuẩn (µg/ml)	Nồng độ chuẩn tìm lại được (µg/ml)	Độ thu hồi (%)	Trung bình (%)	
	0,5001			49,88	21,86	99,36		
80%	0,5002	28,02	22,0	49,92	21,90	99,55	99,45	
	0,5001				49,90	21,88	99,45	
100%	0,5001			55,46	27.44	98,00		
	0,5002	28,02	28,0	28,0	55,68	27,66	98,79	98,29
	0,5001			55,48	27,46	98 ,0 7		
120%	0,5001	28,02	28,02 33,0	60,88	32,86	99,56		
	0,5002			60,90	32,88	99,64	99,57	
	0,5001			60,86	32,84	99,52		

Độ chính xác

Độ lặp lại

Tiến hành phân tích 6 mẫu thử độc lập, xác định hàm lượng oxostephanin. Kết quả được ghi ở bảng 4 cho thấy phương pháp có độ lặp lại cao.

64 | TẠP CHÍ Y DƯỢC CỔ TRUYỆN VIỆT NAM Số 03(25)-2019



CIT	Khối	Diện tích pic	Hàm
511	lượng (g)	(mAU.s)	lượng (%)
1	0,5001	1424964	0,281
2	0,5002	1444767	0,285
3	0,5007	1475847	0,291
4	0,5001	1465971	0,289
5	0,5003	1447025	0,286
6	0,5001	1414563	0,279
Trung bình hàm lượng (%)			0,285
	1,605		

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại

Độ chính xác trung gian

Tiến hành phân tích 6 mẫu thử độc lập vào các ngày khác nhau, xác định hàm lượng oxostephanin. Kết quả ghi trong bảng 5.

	Khối	Diện tích pic	Hàm
SIL	lượng (g)	(mAU.s)	lượng(%)
1	0,5001	1424964	0,281
2	0,5002	1444767	0,285
3	0,5005	1447125	0,280
4	0,5001	1414563	0,280
5	0,4999	1414231	0,280
6	0,5001	1414565	0,286
Trung bình hàm lượng (%)			0,282
RSD (%)			0,977

Bảng 5. Kết quả độ chính xác trung gian

Áp dụng phương pháp HPLC đã thẩm định để định lượng oxostephanin trong một số mẫu Kất quả trình hày trong bảng 6

Kết quả trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng oxostephanin trong các mẫu thân, lá cây củ dòm thu hái ở Ba Vì (Hà Nội) và Quản Bạ (Hà Giang)

Mẫu thu hái	Hàm lượng (%)
Lá thu hái ở Quản Bạ	0,32

Thân thu hái ở Quản Bạ	0,04
Lá thu hái ở Ba Vì	0,34
Thân thu hái ở Ba Vì	0,08

KẾT LUẬN

Trong quá trình nghiên cứu phương pháp chiết xuất, việc định tính và định lượng các hoạt chất là không thể thiếu để đánh giá được hiệu suất chiết, từ đó định hướng cải thiện và nâng cao hiệu suất chiết. Vì vậy, việc xây dựng quy trình phân tích phù hợp với điều kiện có sẵn là hết sức quan trọng. Trong nghiên cứu này, để tài đã xây dựng phương pháp định lượng oxostephanin đơn giản có độ đúng và độ chính xác cao. Phương pháp đã áp dụng để định lượng oxostephanin trong một số mẫu thân lá củ dòm với hàm lượng oxostephanin trong lá cao hơn ở thân đồng thời có sự khác biệt không lớn về hàm lượng oxostephanin giữa 2 vùng trồng được liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

 Viện Dược liệu (2004), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Tập 1, NXB Khoa học Kỹ thuật.

2. Nguyễn Quốc Huy (2010), "Nghiên cứu về thực vật, thành phần hóa học, một số tác dụng sinh học của một số loài thuộc chi Stephania Lour. ở Việt Nam", Luận án Tiến sĩ Dược học.

3. Nguyễn Quốc Huy, Phạm Thanh Kỳ, Lê Mai Hương (2009), "Nghiên cứu tác dụng gây độc tế bào của 10 hợp chất phân lập từ một số loài bình vôi (Stephania Lour.) ở Việt Nam", Tạp chí Thông tin Y Dược, Bộ Y tế.

4. Bộ Y tế (2009), "Hướng dẫn của Asean về thẩm định quy trình phân tích, Phụ lục 7 – Thông tư 22/2009/TT-BYT Quy định về đăng ký thuốc".

TẠP CHÍ Y DƯỢC CỔ TRUYỆN VIỆT NAM Số 05(25)-2019 | 65

Dual roles of oxostephanine as an Aurora kinase inhibitor and angiogenesis suppressor

THU-HIEN THI TRAN^{1*}, LE-DUY BA VU^{2*}, HUY QUOC NGUYEN¹, HANH BICH PHAM², XUAN-PHUONG THI DO², UYEN THI TRANG THAN³, THU-HUONG THI PHAM⁴, LINH DIEU DO², KIM-VAN THI LE⁵, THAO PHUONG NGUYEN⁶ and MY-NHUNG THI HOANG^{2,3}

¹Department of Pharmacognosy, Vietnam University of Traditional Medicine; ²Department of Cell Biology, Faculty of Biology, VNU University of Science, Vietnam National University; ³Center of Applied Sciences, Regenerative Medicine and Advance Technologies, Vinmec Healthcare System; ⁴The Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science, Vietnam National University; ⁵Faculty of Apothecary, National Institute of Medicinal Materials; ⁶Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi 10000, Vietnam

Received April 15, 2022; Accepted August 24, 2022

DOI: 10.3892/ijmm.2022.5189

Abstract. The Aurora kinases, including Aurora A, B and C, play critical roles in cell division. They have been found overexpressed in a number of types of cancer and may thus be potential targets in cancer therapy. Several Aurora kinase inhibitors have been identified and developed. Some of these have been used in clinical trials and have exhibited certain efficacy in cancer treatment. However, none of these has yet been applied clinically due to the poor outcomes. Oxostephanine is an aporphine alkaloid isolated from several plants of the genus Stephania. This compound has been reported to inhibit Aurora kinase activity in kinase assays and in cancer cells. The present study aimed to investigate the real-time effects of oxostephanine extracted from Stephania dielsiana Y.C. Wu leaves on the growth of an ovarian cancer cell line (OVCAR-8, human ovarian carcinoma); these effects were compared to those of the well-known Aurora kinase inhibitor, VX-680. The effects of oxostephanine on stromal cells, as well as endothelial cells were also examined. The results demonstrated that oxostephanine was an Aurora kinase inhibitor through the prevention of histone H3 phosphorylation at serine 10, the mislocalization of Aurora B and the induction of aneuploidy. Moreover, this substance was selectively cytotoxic to human umbilical vein endothelial cells (hUVECs), whereas it was less cytotoxic to human fibroblasts and umbilical cord-derived

Correspondence to: Dr My-Nhung Thi Hoang, Department of Cell Biology, Faculty of Biology, VNU University of Science, Vietnam National University, 334 Nguyen Trai Street, Hanoi 10000, Vietnam E-mail: hoangthimynhung@hus.edu.vn

*Contributed equally

Key words: Aurora kinases, Aurora kinase inhibitor, ovary cancer cell line, angiogenesis, endothelial cells, growth factors

mesenchymal stem cells. In addition, this compound significantly attenuated the migration and tube formation ability of hUVECs. Taken together, the present study demonstrates that oxostephanine plays dual roles in inhibiting Aurora kinase activity and angiogenesis. Thus, it may have potential for use as a drug in cancer treatment.

Introduction

The Aurora kinases, including Aurora A, B and C, are serine/threonine kinases that play a central role in regulating cell division and multiple signaling pathways. Aurora A functions in the formation of a typical bipolar spindle (1), the maturation of centrosomes, which is necessary for G2/M transition (2), and the formation and stimulation of the cyclin B-CDK1 complex (3). Moreover, Aurora A helps to increase both size and microtubule-nucleating capacity just before mitotic entry (3). Aurora B plays a function in the chromosome biorientation on the mitotic spindle. It mediates the attachment of the microtubule to the kinetochores and regulates the spindle assembly checkpoint (SAC) (4,5). The improper attachment of kinetochores promotes Aurora B to recruit and phosphorylate its substrates at the kinetochores to depolymerize the uncorrected attachment, allowing other microtubules to capture the unattached kinetochores. The inhibition of Aurora B can impair the chromosome arrangement at the mitotic spindle equator (6).

Furthermore, Aurora B phosphorylates histone H3 at the serine 10 (H3S10ph) residue at the beginning of the prophase and leads to a peak in H3S10ph at the prometaphase and metaphase. This phosphorylation contributes to the active chromosome conformation at the entry of mitosis (7). Other studies have reported that H3S10ph may involve chromosome condensation and Aurora B recruitment to the centromere (8,9). Most notably, Aurora B is the only enzymatic member of the chromosomal passenger protein complex (CPC). All members of CPC share the co-localization during mitosis: They concentrate in the kinetochore during the prophase, prometaphase and metaphase; transfer to the midzone with anaphase onset; and remain in the midbody in telophase and cytokinesis (10). The mislocalization of any CPC members, including Aurora B, can lead to a defection in mitosis and cytokinesis (10,11). Apart from the pivotal functions in cell division, Aurora A and B kinases are also involved in tumor angiogenesis. These enzymes phosphorylate MYCN, regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) production, and inhibit the proliferation and tube formation of human endothelial cells (12-14). Aurora C kinase has been found in cells that undergo meiosis and has a unique physiological role in spermatogenesis (15). The limitation in understanding the role of Aurora C may stem from the high sequence homology between this kinase and Aurora B, leading to the overlapping in the function of these proteins (16). Aurora C can rescue the genetic stability of the cells in case Aurora B is absent (17). Previously, it was demonstrated that the overexpression of Aurora C induces abnormal cell division, resulting in centrosome amplification and multinucleation in cells (17).

The overexpression of Aurora kinases has been observed in a broad range of human solid tumors, such as gliomas, and colorectal, breast, ovarian and pancreatic cancer (18), as well as in liquid tumors such as diffuse large B-cell lymphoma (19). Moreover, Aurora kinases have been found to be associated with genetic instability and aneuploidy in tumors (20). Hence, it is not surprising that Aurora kinases have become attractive targets in cancer treatment. The development of Aurora inhibitors has drawn the attention of several scientists from academic institutes and pharmaceutical companies. Over the first two decades of the 21st century, a series of Aurora kinase inhibitors were produced, which were Aurora A- or B-selective, or pan inhibitors. Although these compounds exhibit preclinical and clinical efficacy, no Aurora kinase inhibitor has yet been approved for clinical use due to their poor outcomes (18). Thus, there is an urgent need for the identification of novel small molecule inhibitors.

Oxostephanine is a substance belonging to the group of aporphine alkaloids isolated from several plants of the genus Stephania. Previous studies have demonstrated that this substance exerts a potent cytotoxic effect on several cancer cell lines, such as KB (human epithelial carcinoma), HepG2 (human hepatocellular carcinoma), GLC4/Adr (human small cell lung adriamycin-resistant carcinoma), K562 (human chronic myelogenous leukemia) and K562/Adr (human chronic myelogenous leukemia resistant to adriamycin) (21), whereas it has a minimal toxic effect on normal cells (MRC-5; human fetal lung fibroblasts) (22). In addition, oxostephanine has been shown to exhibit potent activity against breast cancer cells and MOLT-3 acute lymphoblastic leukemia cells (21). Moreover, Knockleby et al (23) revealed that oxostephanine inhibited the activity of Aurora kinase A and B by the competition of ATP binding sites in an in vitro kinase assay.

The aim of the present study was to examined the effects of oxostephanine extracted from Vietnamese *Stephania dielsiana* Y.C. Wu (*S. dielsiana*) as a novel Aurora kinase inhibitor on an ovarian cancer cell line (OVCAR-8). As demonstrated herein, *S. dielsiana* may prove to be a potent Aurora kinase inhibitor, as well as an anti-angiogenic agent with potential to be developed into an anticancer drug.

Materials and methods

Compound preparation. The stems and leaves of S. dielsiana were collected in Ba Vi District, Hanoi, Vietnam in October, 2019 and identified by the Department of Botany, Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam. A voucher specimen (no. SD10/2019) has been deposited at the Department of Botany and Pharmacognosy, Vietnam University of Traditional Medicine, Hanoi, Vietnam. The process used for the isolation and characterization of oxostephanine from the leaves of S. dielsiana in Vietnam has been previously published (22,23). In brief, the leaves of S. dielsiana (7 kg) were extracted with 95% MeOH (3x15 liters, 3 days each) at room temperature. The extracts were concentrated in vacuo to yield a MeOH extract (680 g), which was suspended in H₂O (2.5 liters) and adjusted to pH 3 with 10% HCl. The acidic aqueous phase was filtered off. The filtrate was loaded on ion-exchange resin, eluted with 20% MeOH until the eluate approached colorless to give the nonalkaloid parts, and then eluted with 2% NaOH in 65% MeOH solution (five-fold of retention volume) to yield the crude total alkaloids. The alkaloid-containing solution was acidified to pH 5 with 10% HCl and partitioned with EtOAc (3x2 liters) to yield the EtOAc extract (65 g).

The EtOAc-soluble portion was subjected to silica gel column chromatography eluted with gradient systems of CH_2Cl_2 -MeOH (100:0, 100:10, 100:30 and 100:50, v/v). The eluted fractions were evaluated and pooled according to thin layer chromatography (TLC) analysis, resulting in six major fractions (SDE.1-SDE.6). The purification of SDE.6 over Sephadex LH-20 (100% MeOH) was performed using the same methodology, and subsequent preparative TLC, eluted with CH_2Cl_2 -MeOH (20:1) yielded oxostephanine (8.6 mg). The purification of oxostephanine by repeating recrystallization in a mixture of methanol and ethanol yielded pure oxostephanine compound as an amorphous yellow-orange powder (purity 99.0% as a percentage of the peak area using a HPLC-DA system (Agilent 1260 Infinity II; Agilent Technologies, Inc.).

Cell lines and culture. OVCAR-8 (human ovarian carcinoma-8) and HeLa (Aurora B-GFP) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Human dermal fibroblasts (hFBs) were cultured in DMEM/F12 medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.), 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Human umbilical vein endothelial cells (hUVECs) were cultured in EBM-2 medium (Lonza Group, Ltd.). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) were grown on the surface of culture flasks coated by CELLstart[™] CTS[™] (CELLstart) in StemMACS[™] MSC Expansion medium (StemMACS) (Miltenyi Biotec). All the cells were cultured in an incubator at 37°C with 5% CO₂. The hUVECs, hFBs and UC-MSCs were provided by Vinmec Research Institute of Stem cell and Gene Technology, and they were not immortalized cell lines. The protocols for cell isolation were approved by the Ethics Committee of Vinmec International Hospital (Document no. 40/2020/QD-Vinmec for hUVECs and UC-MSCs, signed and dated on December 24, 2020; Document no. 311/2018/QD-Vinmec for hFBs, signed

and dated on September 11, 2018). The HeLa (Aurora B-GFP) cells were kindly provided as a gift from Professor Stefan Dimitrov at Institute Albert Bonniot (present name is Institute for Advanced Biosciences) (11,24).

Cell viability assay. Cell viability was assessed using sulforhodamine B (SRB) assay. The cells were seeded at a density of $3x10^3$ cells/well in 96-well plates and incubated with oxostephanine for 24, 48 and 72 h at six concentrations differed by five from the highest of 25 to 5, 1, 0.2 and 0.04 μ M. Subsequently, the medium was removed, and the cells were stained with 4% SRB (Millipore, Sigma) for 10 min at room temperature after fixing with 10% TCA (MilliporeSigma) for 1 h at 4°C. The absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (BioTech Power Wave XS; BioTek Instruments, Inc.).

Real-time analysis of cell proliferation using the xCELLigence system. The proliferation assay was performed using the xCelligence system (ACEA Biosciences; Agilent Technologies, Inc.). Media (100 μ l/well) were added to each 96-well of an E-plate (ACEA Biosciences; Agilent Technologies, Inc.) to take the background reading for 15 min. In the meantime, the cells were resuspended in medium, and 80 μ l cell suspension were added to yield a cell density of $3x10^3$ cells/180 µl/well. Following incubation for 30 min at room temperature, the E-plate was placed into the RTCA SP station in an incubator. After 24 h, the cells were treated with oxostephanine (125, 25, 5, 1 and 0.2 μ M) and VX-680 (Vertex and Merck; 25, 5, 1, 0.2 and 0.04 μ M). Dynamic cell proliferation was monitored in 30-min intervals from the seeding point till the end of the experiment with a total of >200 h. The electrical impedance was measured using RTCA-integrated software of the xCEL-Ligence system as a dimensionless parameter termed cell index (CI). Normalized CI values were used to obtain the IC₅₀ values, doubling times and other evaluations.

Immunofluorescence. The cells were grown on glass coverslips for 24 h before being treated with either oxostephanine (5 μ M) or VX-680 (0.2 μ M) with or without paclitaxel (0.035 μ M; Millipore, Sigma) and incubated for 15 h in an incubator at 37°C with 5% CO₂. Paclitaxel was used to synchronize the cells to the M phase in the cell cycle, in order to obtain dividing cells. The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde and 2% sucrose for 15 min at 37°C, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, blocked with 5 mg/ml BSA, and incubated with primary antibodies for 2 h at room temperature. Phosphorylated histone H3 was detected using a polyclonal rabbit antibody (ab183626, Abcam), at a dilution of 1:500. Aurora B was detected using mouse monoclonal antibodies (36-5200, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), at a dilution of 1:250. DNA was visualized with 5 μ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) or $2 \mu g/ml$ propidium iodide (PI; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Images were collected using a ZEISS 510 Laser Scanning Confocal (LSM) microscope with 40X or 63X objectives (Carl Zeiss AG). For the HeLa (Aurora B-GFP), the cells were grown on a Lab-Tek chamber coverglass (Nalge Nunc International). Following 24 h of treatment with the compounds at concentrations of oxostephanine (5 μ M) or VX-680 (0.2 μ M), cells were observed without fixing.

As regards the cell nuclear morphological examination, the cells were incubated with either oxostephanine (5 μ M) or VX-680 (0.2 μ M) for 48 h. The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde and 2% sucrose for 15 min at 37°C, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min and stained with 5 μ g/ml Hoechst 33342. Following incubation for 15 min, the cells were collected, washed with phosphate-buffered saline (PBS; Millipore, Sigma), and observed using a LSM microscope. Images were analyzed using LSM Image Browser (Carl Zeiss AG).

Apoptosis assay. Apoptosis assay was performed using the Alexa Fluor 488 Annexin V/dead cell apoptosis kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). As mentioned in the kit, Annexin V is a phospholipid binding protein, and it specifically binds to negatively charged phosphatidylserine molecules exposure on the surface of apoptotic cells. Following treatment of the cells with either 0.5 μ M oxostephanine or 0.2 μ M VX-680 for 48 h, the cells were harvested and prepared for apoptosis analysis. Briefly, the cells were washed with PBS, then suspended in Annexin-binding buffer to obtain a density of 10⁶ cells/ml. The cell solution was then incubated with 5 μ l Alexa Fluor[®] 488-Annexin V and 100 μ l PI working solution for 15 min at room temperature. Subsequently, 400 μ l Annexin-binding buffer were gently mixed into the solution with and the cell solution was analyzed on a FACS Canto II System (BD Biosciences). For the visualization of apoptotic marker expression, following 24 h of treatment with the compounds, the cells were incubated with Alexa Fluor® 488-Annexin V for 30 min and observed under a LSM microscope.

Multicellular tumor spheroid assay. OVCAR-8 spheroids were created using the hanging drop method as previously described (25). A total of 15 μ l of the medium that contained $5x10^3$ cells were added to each circle on the inverted cover of a 96-well plate to create one spheroid. The cover was then placed upside down on the plate coated with sterile agarose 1.5% (w/v) containing 200 μ l complete medium. Following 48 h of incubation in a humidified chamber with 5% CO₂ at 37°C, spheroids were transferred from the cover into each well of the agarose-coated plate and further cultured in DMEM (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) supplemented with 10% FBS (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Spheroids were treated with oxostephanine under two conditions: i) The compound was added to the cell preparation before making the hanging drop; and ii) the compound was added after transferring the formed spheroids into the culture wells. Two concentrations at 5 and 1 μ M of Oxostephanine were used in both conditions. Images were obtained using an Axiovert 40CFL microscope (Carl Zeiss AG) with Powershot G9 camera. These images were analyzed using Axio version 4.5 software (Carl Zeiss AG) to determine the spheroid diameter. The approximated volume (V) of each spheroid was calculated as follows: V= (4/3) x π x (D1/2) x (D2/2)², where D1 and D2 were the longest and shortest diameters, respectively (26).

RNA extraction and reverse transcription-quantitative PCR (*RT-qPCR*). Total RNA was extracted from the five cell lines using the RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH) according to the

Gene	Accession no.	Primer sequence	Amplicon size (bp)	(Refs.)
Aurora A	NM_198433.3	Fw 5'-TTCCAGGAGGACCACTCTCTGT-3'	69	(27)
		Rv 5'-TGCATCCGACCTTCAA TCATT-3'		
Aurora B	NM_001313950.2	Fw 5'-CGCAGAGAGATCGAAATCCAG-3'	85	(28)
		Rv 5'-AGATCCTCCTCCGGTCATAAAA-3'		
VEGF	NM_001025366.3	Fw 5'-AGGAGGAGGGCAGAATCATCAC-3';	90	(29)
		Rv 5'-ATGTCCACCAGGGTCTCGATTG-3'		
β-actin	NM_001101.5	Fw 5'-ACAGAGCCTCGCCTTTG-3'	110	(30)
		Rv 5'-CCTTGCACATGCCGGAG-3'		
Fw, forward;	Rv, reverse.			

Table I. Sequences of specific primers used for RT-qPCR.

manufacturer's instructions. A total of 1 μ g total RNA from each sample was converted into cDNA using the M-MLV cDNA Synthesis kit (Enzynomics, Inc.). The reaction was performed at 25°C for 10 min, 42°C for 60 min, 95°C for 5 min, and held at 4°C on a SimpliAmp[™] Thermal Cycler (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The cDNA products from each sample were used to perform qPCR. A total of 1 µl five-time diluted cDNA was used for qPCR, and reagents were mixed followed by PCR using the SensiFAST SYBR® Lo-ROX kit (Bioline Pty Ltd, Meridian Bioscience, Inc.). The primers used are listed in Table I. β-actin mRNA was used as an internal control gene to normalize the data. RT-qPCR was performed for the initial activation at 95°C for 20 sec, followed by 40 cycles at 95°C for 10 sec, 63°C for 30 sec, and 70°C for 1 sec. The melting curve was analyzed using the instrument default setting. The assays were performed in triplicate on a Light Cycle[®] 96 system (Roche Diagnostics). The DDCq method (31) was used for the quantification of mRNA expression.

Wound healing assay. The hUVECs and hFBs were cultured in EGM-2 endothelial cell growth medium-2 Bulletkit (Lonza Bioscience) and DMEM/F12 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) supplemented with 10% FBS, respectively, to reach the completed confluence in 24-well plates. The cells were then supplemented with mitomycin C (5 μ g/ml) to inhibit cell proliferation. Thereafter, the cells were cultured in serum-free medium for 24 h (hUVECs) and 48 h (hFBs). Scratches were created using cell scrapers SPLScar (SPL Life Sciences Co., Ltd.), and floating cells were removed by washing the wells twice with PBS. Oxostephanine was incubated with the cells at three concentrations of 25, 5 and 1 µM for 24 h (hUVECs) and 48 h (hFBs). Images were captured every 6 h (Olympus IX73 Inverted Microscope, Olympus Corporation) from the scars created. The cell migration ability was analyzed using ImageJ software (version 1.53e, National Institutes of Health).

Colony formation assay. The hUVECs and hFBs were seeded in a six-well plate at a density of 1×10^3 cells/well and treated with oxostephanine at four different concentrations (25, 5, 1 and 0.2 μ M) for 24 h. The medium was refreshed, and the cells were then incubated in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C for a further 10 days. The cells were then stained with Giemsa (Millipore, Sigma) for 5 min at room temperature after fixing with 70% methanol for 10 min at room temperature. The formation of colony units of endothelial cells (CFU-ECs) and fibroblasts (CFU-Fs) was observed, photographed and counted using an Axiovert 40 Inverted Microscope (Carl Zeiss AG) (magnification, x4). The number of colonies was determined per 1,000 cells at seeding.

Growth factor analysis using luminex assay. Growth factors, including VEGF-A, fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and hepatocyte growth factor (HGF), were analyzed using Luminex assay with ProcartaPlexTM Multiplex Immunoassays (Human Custom ProcartaPlex 4-Plex kit; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The conditioned media was prepared by culturing cells to 90% confluency in an appropriate medium without supplement or FBS for 48 h. The conditioned medium was then collected and kept on ice prior to use. Reagents and procedures were processed following the manufacturer's instructions. The luminescent signals of the growth factors were detected using a LuminexTM 100/200TM system equipped with the xPONENT 3.1 software (Luminex Co., Ltd).

Tube formation assay. The tube formation assay was performed using Angiogenesis Assay kit (ab204726, Abcam). Briefly, extracellular matrix solution (Matrigel, supplied with the kit, Abcam) was added to a 96-well plate and incubated for 1 h at 37°C to allow the solution to form a gel. hVUECs were seeded at 1.5×10^4 cells/well (three replicates per group) on the gel and incubated with oxostephanine at two concentrations of 5 and 1 μ M. For the background control wells, no Matrigel was added. Suramin (supplied with the kit, Abcam) was used as an angiogenesis suppressor control. Following 8 h of incubation at 37°C in the incubator, the tube formation was examined using an inverted microscope. The total tube length, total branching points and mean tube length were analyzed using Wimasis software (Web-based version, wimasis.com).

Statistical analysis. All statistical analyses were performed using R software version 3.4.4. The differences between groups were assessed using an unpaired t-test, two-way ANOVA and Tukey's HSD tests. A P-value <0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. All data are presented as the mean \pm SD.

Results

Real-time analysis of the effects of oxostephanine on OVCAR-8 cancer cells. The present study performed a cytotoxicity analysis of oxostephanine using the OVCAR-8 cell line with the xCELLigence RTCA system. During >200 h of incubation, the viability, number, morphology and adherent ability of the cells were recorded and visualized as a graph (Fig. 1A). The utilities in the RTCA Control Unit software allowed for the creation of a dose-response curve and the calculation of the IC₅₀ value of the drug at different time points. The results revealed that oxostephanine and VX-680 exerted a similar effect on cell proliferation; the higher concentrations of the compounds the greater the inhibitory effects on cell growth. In the control wells, the cell index values gradually increased and peaked at the time point of 140 h, with a CI of 32 (Fig. 1A). In the wells treated with the two highest concentrations of 125 and 25 μ M oxostephanine, cell proliferation was entirely inhibited compared to the control with the CI values decreasing after 3 h of incubation, indicating that the cells could not grow, but were killed. At the oxostephanine concentration of 5 μ M, the cell proliferation rate was approximately half that of the control, with the time to get the peak of CI values was 165 h. At the oxostephanine concentration of 1 μ M, the peak was reached at the same time but with a smaller value equivalent to 78% of the control. At the smallest concentration of 0.2 μ M oxostephanine, the cell proliferation was lower than that of the control. For the wells treated with VX-680, while all cells were killed at the two highest concentrations, the CI values at the peaks associated with the other concentrations were smaller and were observed at later time points than those of the control (Fig. 1A). Using RTCA software, the IC₅₀ values at different time points of incubation from 24 to 120 h were calculated. The IC₅₀ values were from 3.8-7.3 μ M for oxostephanine and 0.2-0.6 μ M for VX-680 (Table II).

The doubling time of the OVCAR-8 cells was also affected by these two compounds. Following treatment with VX-680, the cells did not grow and died rapidly following the addition of the substance expressed by the minus values of the doubling time at the three highest concentrations. In terms of oxostephanine, the majority of the doubling time was higher compared to the controls, indicating that the proliferation of cells was inhibited (Fig. 1B). Of note, a change in the size of the cells treated with oxostephanine and VX-680 at low concentrations was observed. The cells increased their size following the incubation time. Not only the cell size, but the immunostaining of these cells also indicated that there was a significant increase in the nuclei area (Fig. 1C). Additionally, the morphology of the cell nuclei was changed, with the nuclei becoming heterogeneous, multi-lobed and enlarged, that were not homogeneous or oval-shaped as in the controls (Fig. 1C). Using the LSM image browser software, the nuclear area was measured. The data indicated that the nucleic size of the cells treated with oxostephanine or VX-680 was three-fold larger than that in the control group (Fig. 1D). Taken together, these results demonstrated that oxostephanine inhibited the proliferation of OVCAR-8 cells in the micromolar range. The real-time effects of oxostephanine were comparable to those of VX-680, an Aurora kinase inhibitor.

Apoptosis induction is a characteristic of Aurora kinase inhibitors (18,23). Hence, the present study examined whether oxostephanine could induce the apoptosis of OVCAR-8 cancer cells. At the oxostephanine concentration of 5 μ M, we observed the expression of phosphatidylserine molecule, an apoptosis marker, that binding to Annexin-V on the cell surface after 24 h of incubation (Fig. 1E). The rate of cells positive with Annexin-V was calculated from the sum of Q1-1 (early apoptosis) and Q2-1 (late apoptosis) quadrants in the flow cytometry plots (Fig. 1F). Accordingly, the percentage of oxostephanine (5 μ M)-treated cells positive for Annexin-V was 30.4±6.8%, which was 7.4-fold higher than that of the control (4.1±0.8%). Moreover, a 33.7±5.1% cell population was positive for Annexin-V when treated with 0.2 μ M VX-680 (Fig. 1F).

Oxostephanine inhibits the growth of OVCAR-8 spheroids. The effects of oxostephanine on the growth of OVCAR-8 cells in 3D culture were investigated. When adding the substance at the time of spheroid preparation, this compound prevented 70% spheroid formation at 5 μ M and 58% spheroid formation at 1 μ M. A similar result was obtained with VX-680; only 22.5% of spheroids could be formed at the concentration of 0.2 μ M (Fig. 2A). Moreover, the volume of the formed spheroids was smaller than that of the control (Fig. 2B). After transferring the spheroids into agar plates, the growth was unaltered at the concentration of $1 \mu M$, whereas this decreased at the concentration of 5 μ M following the time of culture even with the absence of the compound (Fig. 2C). For the other treatments, oxostephanine was added and maintained in the medium after the spheroids were transferred into the agar plate. Under this condition, after 7 days, the substance inhibited the growth of spheroids, with the size decreasing 4.3-fold at 5 μ M and 2.7-fold at 1 μ M. The effect of oxostephanine on spheroid growth was even more prominent than that of VX-680 at 0.2 μ M, with a decrease of 2.1-fold in the volume on day 7 of treatment. Moreover, the control increased the spheroid volume 3-fold on day 7 of culture on agar (Fig. 2C). Furthermore, the morphology of the treated spheroids was also changed into loose cell clusters with numerous cells separately surrounded, in contrast to the tight and impact control spheroids (Fig. 2D).

Oxostephanine inhibits Aurora kinase expression and activity. To characterize oxostephanine as a novel Aurora kinase inhibitor, the effect of this compound on the phosphorylation of H3S10ph was evaluated in OVCAR-8 cancer cells. To collect cells at the mitotic phase, the cell population was synchronized by the addition of paclitaxel followed by incubation with oxostephanine and VX-680 at concentrations of 5 and 0.2 μ M, respectively. The images revealed that the fluorescence signal of H3S10ph was markedly decreased in mitotic cells incubated with oxostephanine and VX-680, even with or without paclitaxel (Fig. 3A).

In addition, the distribution of Aurora B was affected by these compounds. In mitotic OVCAR-8 cells, this protein was not expressed at the centromere, but was diffused on the whole chromosomes at the metaphase. Moreover, Aurora B presented as bright dots in the centromere in the control cell group (Fig. 3B). Additionally, RT-qPCR revealed that the mRNA



Figure 1. (A) Real-time analysis of OVCAR-8 cell proliferation following treatment with oxostephanine and VX-680. On the plot, the normalized cell index (CI) is shown at 15 h, which is the adding point of the substance. The horizontal axis of the graph was the time of the experiment. (B) Population doubling times of OVCAR-8 cells were calculated on RTCA system after 48, 72, 96 and 120 h of incubation with the two compounds at five concentrations, as indicated in the figures. Of note, the minus values of PDT indicated that the cells died when exposed to the compound at an early stage and no cell growth was counted. (C) Image of cell nuclei following incubation with oxostephanine and VX-680 for 48 h. (D) The average sizes of cell nuclear area were calculated and presented as the mean ± SD. Data were collected from three repeated experiments. (E) Oxostephanine induced the apoptosis of OVCAR-8 cancer cells. Immunofluorescence images of control and oxostephanine-treated cells stained with Annexin V-FITC indicated the higher expression of phosphatidylserine molecules on the cell surface in treated cells (green color). (F) Quantitative analysis of the percentage apoptosis in the oxostephanine- and VX-680-treated cells. *P<0.05, vs. control.



Table II. IC₅₀ values of oxostephanine and VX-680 in OVCAR-8 cancer cells with different incubation times.

Figure 2. Oxostephanine inhibits the formation and growth of OVCAR-8 spheroids. (A) Spheroid formation in the presence of the compounds. (B) The spheroid volume was reduced following incubation with the compounds. (C) The growth of tumor spheroids was prevented by the two types of treatment: The addition of the compound at the spheroid preparation (pre) and after spheroid formation (post). The days were counted from the time of transferring the spheroid form the hanging drop to the agar plates (day 1, etc.). (D) The morphology of spheroids of cells treated under the two conditions mentioned above. Pre, compounds were added at the time of spheroid preparation; post, compounds were added and maintained in the medium for spheroid growth in the agar plate. Scale bars, $100 \ \mu m$. *P<0.05 and **P<0.01, vs. control. Oxo, oxostephanine; VX, VX-680.

expression of Aurora B was decreased following incubation with oxostephanine in OVCAR-8 cells (Fig. 3C).

To determine the effects of oxostephanine on the localization of Aurora B kinase, HeLa cells stably expressing Aurora kinase B-GFP were used. Notably, the diffusion of Aurora B was observed in both living and fixed HeLa cells (Fig. 4). Furthermore, in mitotic cells treated with oxostephanine and VX-680, Aurora B-GFP was observed on the entire chromosomes when the cells were at metaphase.

In summary, these data illustrated that the treatment of the cells with oxostephanine affected the behavior of Aurora B

during the cell cycle in a similar manner to VX-680, but with a lower efficiency.

Oxostephanine is selectively cytotoxic on different cell types. The present study also selected three cell lines, including human UC-MSCs, hUVECs and hFBs for the examination of oxostephanine cytotoxicity. Firstly, the expression of Aurora A and Aurora B kinase genes relative to the actin gene control was examined in normal and cancer cells. The results revealed that these genes were highly expressed at the mRNA level, with the highest levels observed in 8



Figure 3. The phosphorylation of histone H3 at serine 10 and the localization of Aurora B kinase were disrupted in OVCAR-8 cancer cells treated with oxostephanine and VX-680. (A) H3S10ph (green) was suppressed in the presence of oxostephanine (5 μ M) and VX-680 (0.2 μ M) for 15 h. In the case of synchronization to the pro-metaphase, cells were pre-treated with paclitaxel (0.3 μ g/ml) for 8 h, then incubated with the two substances as mentioned above. (B) Aurora B was deconcentrated on the chromosomal centromeres following treatment with the substances. (C) The expression of Aurora A and Aurora B was decreased at the mRNA level following treatment with oxostephanine and VX-680. *P<0.05, vs. control.

the hUVECs and OVCAR-8 cells, and the lowest in hFBs (Fig. 5A).

Secondly, the cells were incubated with oxostephanine for the analysis of cell death. Following 24 h of incubation with oxostephanine, the death of hUVECs was observed at the two highest concentrations. After 48 and 72 h, the cell death number increased continuously in these wells containing hUVECs. Similar results were detected in UC-MSCs. On the other hand, in the wells of hFBs, no cell death was observed (Fig. 5B). Additionally, the IC₅₀ values were consistent with these observations. The IC₅₀ values from the hUVECs were 7.9±0.6, 3.1±0.5 and 1.9±0.5 μ M after 24, 48 and 72 h of incubation, respectively. However, the IC₅₀ values from the hFBs could not be determined after 24 and 48 h, but were 17.1±0.8 μ M after 72 h of incubation. Notably, the cytotoxicity effect of oxostephanine on UC-MSCs was lower than that on hUVECs, but higher than that on hFBs, with IC₅₀ values at 48 and 72 h were 4.7±0.8 and 5.1±0.7 μ M, respectively (Fig. 5C). These data, as well as the results of the mRNA levels indicated that the oxostephanine may be more toxic to OVCAR-8 cancer cells and hUVECs, but less on hFBs and UC-MSCs.



Figure 4. Effects of oxostephanine and VX-680 on the expression of Aurora kinase B in mitotic cells. The Aurora B distribution was determined on living HeLa cells stably expressing Aurora B-GFP and on fixed HeLa cells. Of note, in the control cells, this protein was located as bright dots on chromosomes at the metaphase; in treated cells, the protein was diffused in the whole chromosomes, particularly in VX-680-treated cells.



Figure 5. Oxostephanine is selectively cytotoxic to different cell types. (A) mRNA expression of Aurora A and Aurora B kinase in normal and cancer cell lines. (B) Proliferation of hUVECs and hFBs treated with various concentrations of oxostephanine after 24, 48 and 72 h of incubation. (C) Dose-response growth inhibition curve for oxostephanine in the three cell types. hUVECs, human umbilical vein endothelial cells; hFB, human dermal fibroblasts.

Oxostephanine reduces colony formation and growth factor secretion by hUVECs and hFBs. The effects of Oxostephanine on the capacity of endothelial progenitor cells and fibroblast precursor cells to form colonies were then examined. As shown in Fig. 6A, both the number of colonies and the density of cells/colonies were reduced in



Figure 6. Oxostephanine reduces the colony formation and growth factor secretion by hUVECs and hFBs. (A) Images of CFU-Fs (hFBs) and CFU-ECs (hUVECs) and cell morphology in each type of CFU. CFUs were reduced in both the number of CFU and the number of cells per CFU. (i and iii) Macroscopic images of hFBs and hUVECs culture plates, respectively, following Giemsa staining; (ii and iv) microscopic of a single stained colony in hFBs and hUVECs, respectively. Scale bars, 200 μ M. (B) The colony formation ability of hUVECs and hFBs treated with the indicated concentrations of oxostephanine. (C) The secretion of three types of growth factors (VEGF-A, HGF and FGF-2) in the presence of oxostephanine at various concentrations. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001, vs. control. hUVECs, human umbilical vein endothelial cells; hFB, human dermal fibroblasts; CFU, colony-forming units.



Figure 7. Oxostephanine inhibits the migration of hUVECs and hFBs. (A) Images of cell migration toward the gap in the presence of oxostephanine at the indicated concentrations. (B) Quantitative analysis of gap covering (%) after a time of cell migration. Experiments were repeated in triplicate and data are presented as the mean \pm SD. *P<0.05 and ***P<0.001. hUVECs, human umbilical vein endothelial cells; hFB, human dermal fibroblasts.

the treated wells compared to the controls. The numbers of CFU-ECs and CFU-Fs were significantly decreased with the two highest concentrations (25 and 5 μ M) (P<0.01). Colony formation was also disrupted with the lower concentrations of oxostephanine, with a smaller number of colonies compared to the control in hUVECs (P<0.05) (Fig. 6B, left panel. In addition, the inhibitory effects of oxostephanine on colony formation were more prominent in hUVECs than in hFBs, with a smaller number of CFUs relative to the control (%) in the endothelial cells compared to that in the fibroblasts (P<0.05) (Fig. 6B, right panel).

Three types of growth factors, including VEGF-A, FGF-2 and HGF, were measured in the cell culture medium after treating the cells with oxostephanine at 1 and 5 μ M. The data indicated that the secretion of these proteins was differed between the cell types. In the controls, both the hUVECs and hFBs secreted HGF with values of 4.5, and $1,333\pm243.2 \ \mu g/ml$, respectively (Fig. 6C). Additionally, both the hFbs and hUVECs produced VEGF-A into the medium at a concentration of around ~1,270 pg/ml. The hUVECs secreted a high amount of FGF-2 (2,285.8±240.1 pg/m). Following incubation with oxostephanine, the capacity of growth factor secretion by the cells was consistent with the control regarding the factor component that only hUVECs could secrete all three factors (VEGF-A, HGF and FGF-2) and hFBs secreted only VEGF-A and HGF. However, the amount of all tested growth factors decreased (P<0.05), apart from VEGF-A secreted by hUVECs treated with 5 μ M oxostephanine (Fig. 6C). These results demonstrated that oxostephanine affected the secretion of growth factors by cells.

Oxostephanine inhibits the migration of hUVECs and hFBs. Fibroblast and endothelial cell migration is a critical step in the wound healing and angiogenesis processes (32). Thus, in the present study, a wound healing assay was performed to examine the capacity of oxostephanine to regulate the migration of endothelial cells and fibroblasts. In the control group, both hUVECs and hFBs expressed their ability to migrate to close the gap at a more rapid rate; the hUVECs exhibited a greater migratory ability (covering 100% of the wound after 24 h) compared to the hFBs (covering 46.1% of the wound after 24 h) (Fig. 7). When the cells were treated with oxostephanine, a significant decrease in the migration of hUVECs and hFBs were observed (P<0.05; Fig. 7). As regards the hUVECs, the percentage of the wound covered by cells treated with oxostephanine at the concentrations of 25 and $5 \,\mu\text{M}$ was ~11% compared to 100% of that in the control group after 24 h, which indicated that the compound inhibited the migration of hUVECs >10-fold (Fig. 7). This inhibitory effect was less prominent in hFBs at the two highest concentrations (5.7-fold decrease at 25 μ M and 3.2-fold decrease at 5 μ M at 48 h). However, at the concentration of 1 μ M, the compound exerted more prominent inhibitory effects on the migration of hFBs than that of hUVECs. These results demonstrated that oxostephanine significantly inhibited the migration of hUVECs and hFBs.

Oxostephanine suppresses angiogenesis in vitro. The effect of oxostephanine on the angiogenesis of hUVECs was examined using tube formation assay. As shown in Fig. 8A, the hUVECs formed a capillary-like network on the Matrigel, with the



Figure 8. Effect of osxostephanine on the tube formation assay of hUVECs. (A) Representative images and (B) quantification of the tube formation when seeding hUVECs on Matrigel in the presence of the test compounds. (C) Tube formation capacity relative to the control (%) of hUVECs incubated with oxostephanine. Experiments were repeated in triplicate and data are presented as the mean \pm SD. *P<0.05 and **P<0.01.

highest number of total tube lengths and tube branching points after 10 h. By contrast, the tube-formation capacity significantly decreased when the cells were treated with 5 μ M oxostephanine (P<0.05) (Fig. 8B). The total tube length, tube branching, tube segments and the number of junctions were 72.9±2.1, 62.5±8.4, 36.4±7.2, and 52.1±5.6%, respectively, compared to the control group. The majority of hUVECs clustered, and very few tube-like structures were observed. When the cells were treated with 1 μ M oxostephanine, the percentage of total tube length, branching, segments, and number of junctions reached 80.8±10, 76.2±12, 52.7±12.2, and 70.3±12.3%, respectively, compared to the control (Fig. 8C). These findings suggested that oxostephanine suppressed angiogenesis *in vitro*.

Discussion

12

The crucial role of Aurora kinases, particularly Aurora A and B, in cell division, as well as the overexpression of these kinases in a wide range of cancers, renders them a potential target in cancer treatment (18). Oxostephanine extracted from the *Stephania* plant was first reported by Makarasen *et al* (21) for its activity in inhibiting the growth of a variety of cancer cell lines. The present study first aimed to characterize oxostephanine, extracted from *S. dielsiana* leaves in Vietnam, as a novel Aurora inhibitor by comparing the real-time effects of this substance on cancer cells to those of VX-680, a well-known Aurora kinase inhibitor (33). An ovarian cancer cell line (OVCAR-8), was used to examine the effects of oxostephanine, since Aurora kinase has been reported to be overexpressed in epithelial ovarian cancer, in addition to two recent clinical trials that have used Aurora kinase inhibitors to treat ovarian cancer (34-36). In the present study, the analysis using the xCelligence system revealed similar responses of the OVCAR-8 cells to both compounds (oxostephanine and VX-680) in real-time growth dose-response curves, cell population doubling time and cellular size change.

Of note, at low tested concentrations of oxostephanine (<5 μ M) and VX-680 (1 μ M), the cells became an euploidy with an increase in their size, but not in their number. Previous research has indicated that when Aurora kinase activity is inhibited, the mitotic SAC is activated, which leads to mitotic arrest. However, this SAC could be overridden, which causes the mitotic slippage of cells in the presence of Aurora kinase inhibitors. This phenomenon eventually led to cells becoming an euploidy or apoptotic (37). In the present study, OVCAR-8 cells treated with oxostephanine and VX-680 at low concentrations expressed enlarged and lobed nuclei. Moreover, as shown by immunofluorescence assay, both compounds downregulated the phosphorylation of protein histone H3 at serine 10 in cancer cells. These data are consistent with those of the study by Knockleby *et al* (23), demonstrating that oxostephanine expression inhibited H3S10ph in HeLa cells (23). As the phosphorylation followed b

inhibited H3S10ph in HeLa cells (23). As the phosphorylation of histone H3 at serine 10 is considered a marker of activated Aurora B kinase (7,8), hence oxostephanine could prevent the function of this kinase. Previous studies have indicated that the activity of

Aurora B is associated with auto-phosphorylation and centromere distribution (5,23). Under normal conditions, Aurora B must concentrate at the kinetochore to phosphorylate some proteins in the conserved outer kinetochore KNL1/Mis12 complex/Ndc80 complex (KMN) network, which plays a role in the kinetochore-microtubule attachment (4-6). The present study demonstrated that oxostephanine affected the normal localization of Aurora B kinase; thus, it may inhibit the auto-phosphorylation activity of this enzyme. In the presence of oxostephanine and VX-680, Aurora B diffused to all chromosome arms and in the cytoplasm. This phenomenon ocurred in all fixed and living OVCAR-8 and HeLa cells. By observing living HeLa cells that express Aurora B-GFP, it was noted that the cells that have chromosomes with diffused Aurora B remained longer in metaphase and eventually became aneuploidy. This phenomenon of Aurora B has been mentioned with the other inhibitors (24,25). This could be explained by the fact that Aurora B did not concentrate at the kinetochore, leading to an effect on the correct attachment of the chromosome to the microtubule and subsequently activating the SAC, consequently leading to mitotic slippage, as discussed above. Moreover, oxostephanine decreased the expression of both Aurora A and Aurora B at the mRNA level as did VX-680. The reduction in the levels of these proteins contributed to defects in cell division functions. Taken together, these data demonstrated that oxostephanine was an Aurora kinase inhibitor, and this compound was cytotoxic to OVCAR-8 cells in both monolayer culture and tumor spheroids. It is worth noting that Knockleby et al (23) indicated the effect of Oxostephanine on both Aurora A and Aurora B in the kinase assay. The present study first focused on Aurora B in OVCAR-8 cells. In future studies, the authors aim to continue to test the effects of oxostephanine on Aurora A kinase in cell culture.

Cancer-associated mesenchymal stem cells and fibroblasts have been proven to facilitate tumor progression. Recent research has revealed the function of mesenchymal stem cells in glioblastoma resistant to Aurora kinase inhibitor, leading to the recurrence of tumors (38). In acute myeloid leukemia (AML), one mechanism of mesenchymal stem cells used to protect leukemic cells from chemotherapeutic agents is activating Aurora A by increasing IL-6 secretion (39). In a co-culture system, fibroblasts have been shown to induce the upregulation of Aurora A in non-small cell lung carcinoma to protect the cancer cells from gefitinib treatment (40,41). Fibroblasts can be activated by Aurora B through Wilms tumor 1 signaling, leading to an induction of fibrogenesis (42). Moreover, the downregulation of Aurora B stimulates cellular senescence in hFBs (43). Aurora kinase and stromal cells exert synergistic effects on the development of cancer cells. Moreover, angiogenesis is necessary for the progression of tumors (44). Hence, in the present study examined the effects of oxostephanine on four cell types (UC-MSCs, hFBs, hUVECs and OVCAR-8). Firstly, it was found that all tested cells highly expressed Aurora A and B, with the highest expression level observed in OVCAR-8 cells and hUVECs, followed by UC-MSCs, and finally hFBs. Accordingly, the IC₅₀ values of oxostephanine in these cell lines were the lowest in the OVCAR-8 cells and hUVECs, higher in the MSCs, and highest in the hFBs. Moreover, the reduction in the colony-forming units indicated that oxostephanine could inhibit the proliferation of endothelial progenitor cells and fibroblasts. One limitation of the present study was that the presentation of colonies needed improvement as the location of the closely clustered colonies could not be seen. However, the number of colonies could still be counted. At the concentration of 5 μ M, oxostephanine significantly inhibited the colony formation of hUVECs; however, the colony-forming inhibitory effect was less prominent in hFBs (~30% CFUs). Additionally, in the wound healing assay, oxostephanine also exerted a more prominent inhibitory effect on the migration of hUVECs than hFBs. These results demonstrated the selective activity of oxostephanine toward hUVECs. The targeting of the compound to different cell types may result from the expression of Aurora kinase in these cells. Higher levels of Aurora kinase are associated with a more prominent effect of oxostephanine on the cells. Apart from cell growth, the function of hUVECs in angiogenesis was also disrupted by oxostephanine. These cells could not successfully form tubes in Matrigel in the presence of 5 μ M oxostephanine. The anti-angiogenic effect of Aurora kinase inhibitors has been previously reported (13) through their involvement in a signaling pathway that enhances angiogenesis (45) and stabilizes N-Myc, which is a well-known oncogene (46,47). These results indicate that oxostephanine functions as a suppressor of angiogenesis.

Furthermore, the data indicated that oxostephanine decreased the production of VEGF-A, HGF and FGF-2, which functions in the proliferation, migration and tube formation processes (48-51), by both hUVECs and hFBs. Notably, in the present study, in hUVECs, the mRNA expression of VEGF-A in cells treated with oxostephanine was not considerably altered; however, the expression of FGF-2 was significantly decreased compared to the control. This activity of oxostephanine differed from VX-680, which has been shown to inhibit VEGF-A expression (13). Nonetheless, the decrease in the levels of FGF-2 and HFG was sufficient to inhibit the growth and function of hUVECs.

Of note, the effects of oxostephanine one growth factor secretion by cells have not yet been clarified. In addition, the involvement of Aurora kinases in angiogenesis have not yet been elucidated. However, it can be hypothesized that Aurora kinase inhibitors, such as oxostephanine, are cytotoxic toward ovarian cancer cells and endothelial cells, which leads to the inhibition of tumor angiogenesis. Furthermore, even though this compound was less cytotoxic to the other stromal cells such as hFBs and UC-MSCs, it prevented the cell functions that can result in stromal cells being inefficient in supporting tumor growth. This hypothesis was encouraged by a published study on the antitumor activity of the methanol fractional extraction from S. dielsiana roots on Swiss mice bearing Sarcoma-180 tumors, which reported a 4-fold decrease in tumor volume in the treated mine (52). It is necessary to examine the effects of oxostephanine in vivo using animal models transplanted with human tumor cells. The authors aim to perform such experiments in the future.

In conclusion, the findings of the present study indicate that oxostephanine is a potential Aurora kinase inhibitor. It inhibited the proliferation of ovarian cancer OVCAR-8 cells and multicellular tumor spheroids. Moreover, oxostephanine exhibited selective cytotoxicity to normal cells by inducing a high expression of Aurora kinase A and B. Furthermore, this compound downregulated the expression of growth factors, prevented the migration of hUVECs and hFBs, and reduced tube formation. However, further studies are required for oxostephanine to be developed as an anticancer drug. This compound needs to be tested on other ovarian cancer cell lines, particularly primary cell lines, to confirm its effects on ovarian cancer. In addition, the expression of Aurora A and B in different cell types needs to be quantified using effective methods, such as western blot analysis, in order to determine to the association of Aurora kinase expression and the effects of oxostephanine. More importantly, in the long term, experiments using in vivo tumor models need be performed to confirm the efficiency of oxostephanine.

Acknowledgments

Not applicable.

Funding

The present study was funded by the Administration of Science Technology and Training-Ministry of Health-Vietnam (according to Decision no. 2721/QD-BYT, dated June 28, 2019, and Contract no. 09/HD-K2DT, dated September 18, 2019).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

THTT and LDBV were involved in the study experimental design and performance, data analysis and in the writing of the manuscript. XPTD, LDD and HBP were involved in performing the experiments and in data analysis. UTTT and THTP were involved in the guidance of the experimental design and in manuscript revision. KVTL and TPN were involved in the guidance of the experimental operations. MNTH and HQN were involved in the conceptualization of the study, in the provision of resources, in the experimental design, data analysis and in the writing and revision of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The hUVECs, hFBs and UC-MSCs were provided by the Vinmec Research Institute of Stem cell and Gene Technology, and they were not immortalized cell lines. The protocols for cell isolation were approved by the Ethics Committee of Vinmec International Hospital (Document no. 40/2020/QD-Vinmec for hUVECs and UCMSCs, signed and dated on December 24, 2020; Document no. 311/2018/QD-Vinmec for hFBs, signed and dated on September 11, 2018).

Patient consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Cowley DO, Rivera-Pérez JA, Schliekelman M, He YJ, Oliver TG, Lu L, O'Quinn R, Salmon ED, Magnuson T and Van Dyke T: Aurora-A kinase is essential for bipolar spindle formation and early development. Mol Cell Biol 29: 1059-1071, 2009.
- Barretta ML, Spano D, D'Ambrosio C, Cervigni RI, Scaloni A, Corda D and Colanzi A: Aurora-A recruitment and centrosomal maturation are regulated by a Golgi-activated pool of Src during G2. Nat Commun 7: 11727, 2016.
- Carmena M, Ruchaud S and Earnshaw WC: Making the Auroras glow: Regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. Curr Opin Cell Biol 21: 796-805, 2009.
- Gurden MD, Anderhub SJ, Faisal A and Linardopoulos S: Aurora B prevents premature removal of spindle assembly checkpoint proteins from the kinetochore: A key role for Aurora B in mitosis. Oncotarget 9: 19525-19542, 2016.
- Shimada M, Goshima T, Matsuo H, Johmura Y, Haruta M, Murata K, Tanaka H, Ikawa M, Nakanishi K and Nakanishi M: Essential role of autoactivation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. Nat Commun 7: 12059, 2016.
- Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, Hunt DF, Walczak CE and Stukenberg PT: Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. Curr Biol 14: 273-286, 2004.
- 7. Mallm JP and Rippe K: Aurora kinase B regulates telomerase activity via a centromeric RNA in stem cells. Cell Rep 11: 1667-1678, 2015.
- Rosasco-Nitcher SE, Lan W, Khorasanizadeh S and Stukenberg PT: Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. Science 319: 469-472, 2008.
- 9. Wang F, Dai J, Daum JR, Niedziałkowska E, Banerjee B, Stukenberg PT, Gorbsky GJ and Higgins JMG: Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. Science 330: 231-235, 2010.
- Vader G, Medema RH and Lens SMA: The chromosomal passenger complex: Guiding Aurora-B through mitosis. J Cell Biol 173: 833-837, 2006.
- Delacour-Larose M, Thi MNH, Dimitrov S and Molla A: Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis. Cell cycle 6: 1878-1885, 2007.
- Otto T, Horn S, Brockmann M, Eilers U, Schüttrumpf L, Popov N, Kenney AM, Schulte JH, Beijersbergen R, Christiansen H, *et al*: Stabilization of N-myc is a critical function of aurora A in human neuroblastoma. Cancer Cell 15: 67-78, 2009.
- neuroblastoma. Cancer Cell 15: 67-78, 2009.
 13. Sun X, Niu S, Zhang Z, Wang A, Yang C, Guo Z, Hao Y, Li X and Wang X: Aurora kinase inhibitor VX-680 suppresses the proliferation and migration of HUVECs and angiogenesis. Mol Med Rep 19: 3841-3847, 2019.
- Romain CV, Paul P, Lee S, Qiao J and Chung DH: Targeting Aurora kinase A inhibits hypoxia-mediated neuroblastoma cell tumorigenesis. Anticancer Res 34: 2269-2274, 2014.
- Tang ČJC, Lin CY and Tang TK: Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. Dev Biol 290: 398-410, 2006.
- Balboula AZ and Schindler K: Selective disruption of aurora C kinase reveals distinct functions from aurora B kinase during meiosis in mouse oocytes. PLoS Genet 10: e1004194, 2014.
- Quartuccio SM and Schindler K: Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer. Front Cell Dev Biol 3: 50, 2015.
- Bavetsias V and Linardopoulos S: Aurora kinase inhibitors: Current status and outlook. Front Oncol 5: 278, 2015.
- Inamdar KV, O'Brien S, Sen S, Keating M, Nguyen MH, Wang X, Fernandez M, Thomazy V, Medeiros LJ and Bueso-Ramos CE: Aurora-A kinase nuclear expression in chronic lymphocytic leukemia. Mod Pathol 21: 1428-1435, 2008.

- 20. Giet R, Petretti C and Prigent C: Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? Trends Cell Biol 15: 241-250, 2005.
- Makarasen A, Sirithana W, Mogkhuntod S, Khunnawutmanotham N, Chimnoi N and Techasakul S: Cytotoxic and antimicrobial activities of aporphine alkaloids isolated from stephania venosa (Blume) spreng. Planta Med 77: 1519-1524, 2011.
- Thien DD, Thuy TT, Huy NQ, Van TH, Duong LTT and Tam NT: Cytotoxic alkaloids from stephania dielsiana. Chem Nat Compd 54: 613-616, 2018.
- 23. Knockleby J, Pradines B, Gendrot M, Mosnier J, Nguyen TT, Trinh TT, Lee H and Le PM: Cytotoxic and anti-plasmodial activities of stephania dielsiana Y.C. Wu extracts and the isolated compounds. Molecules 25: 3755, 2020.
- 24. Hoang TMN, Favier B, Valette A, Barette C, Nguyen CH, Lafanechère L, Grierson DS, Dimitrov S and Molla A: Benzo[e] pyridoindoles, novel inhibitors of the aurora kinases. Cell Cycle 8: 765-772, 2009.
- Hoang NTM, Phuong TT, Nguyen TTN, Tran YTH, Nguyen ATN, Nguyen TL and Bui KTV: In vitro characterization of derrone as an aurora kinase inhibitor. Biol Pharm Bull 39: 935-945, 2016.
- McMillan KS, McCluskey AG, Sorensen A, Boyd M and Zagnoni M: Emulsion technologies for multicellular tumour spheroid radiation assays. Analyst 141: 100-110, 2016.
- Lin YS, Su LJ, Yu CT, Wong FH, Yeh HH, Chen SL, Wu JC, Lin WJ, Shiue YL, Liu HS, *et al*: Gene expression profiles of the aurora family kinases. Gene Expr 13: 15-26, 2006.
 He J, Qi Z, Zhang X, Yang Y, Liu F, Zhao G and Wang Z: Aurora
- He J, Qi Z, Zhang X, Yang Y, Liu F, Zhao G and Wang Z: Aurora kinase B inhibitor barasertib (AZD1152) inhibits glucose metabolism in gastric cancer cells. Anticancer Drugs 30: 19-26, 2019.
- Romain C, Paul R, Kim KW, Lee S, Qiao J and Chung DH: Targeting Aurora kinase-A downregulates cell proliferation and angiogenesis in neuroblastoma. J Pediatr Surg 49: 159-165, 2014.
- Roy JG, McElhaney JE and Verschoor CP: Reliable reference genes for the quantification of mRNA in human T-cells and PBMCs stimulated with live influenza virus. BMC Immunol 21: 4, 2020.
- Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25: 402-408, 2001.
- 32. Bi H, Li H, Zhang C, Mao Y, Nie F, Xing Y, Sha W, Wang X, Irwin DM and Tan H: Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process. Stem Cell Res Ther 10: 302, 2019.
- 33. Li Y, Zhang ZF, Chen J, Huang D, Ding Y, Tan MH, Qian CN, Resau JH, Kim H and The BT: VX680/MK-0457, a potent and selective Aurora kinase inhibitor, targets both tumor and endothelial cells in clear cell renal cell carcinoma. Am J Transl Res 2: 296-308, 2010.
- Pérez-Fidalgo JA, Gambardella V, Pineda B, Burgues O, Piñero O and Cervantes A: Aurora kinases in ovarian cancer. ESMO Open 5: e000718, 2010.
 Cervantes A, Elez E, Roda D, Ecsedy J, Macarulla T,
- 35. Cervantes A, Elez E, Roda D, Ecsedy J, Macarulla T, Venkatakrishnan K, Roselló S, Andreu J, Jung J, Sanchis-Garcia JM, *et al*: Phase I pharmacokinetic/pharmacodynamic study of MLN8237, an investigational, oral, selective Aurora a kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res 18: 4764-4774, 2012.
- 36. Falchook G, Coleman RL, Roszak A, Behbakht K, Matulonis U, Ray-Coquard I, Sawrycki P, Duska LR, Tew W, Ghamande S, *et al*: Alisertib in combination with weekly paclitaxel in patients with advanced breast cancer or recurrent ovarian cancer: A randomized clinical trial. JAMA Oncol 5: e183773, 2019.
- Brito DA, Yang Z and Rieder CL: Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. J Cell Biol 182: 623-629, 2008.

- Willems E, Lombard A, Dedobbeleer M, Goffart N and Rogister B: The unexpected roles of aurora A kinase in gliobastoma recurrences. Target Oncol 12: 11-18, 2017.
- 39. Wang JD, Zhang W, Zhang JW, Zhang L, Wang LX, Zhou HS, Long L, Lu G, Liu Q and Long ZJ: A novel aurora kinase inhibitor attenuates leukemic cell proliferation induced by mesenchymal stem cells. Mol Ther Oncolytics 18: 491-503, 2020.
- 40. Wu CC, Yu CTR, Chang GC, Lai JM and Hsu SL: Aurora-A promotes gefitinib resistance via a NF-κB signaling pathway in p53 knockdown lung cancer cells. Biochem Bioph Res Commun 405: 168-172, 2011.
- 41. Chen J, Lu H, Zhou W, Yin H, Zhu L, Liu C, Zhang P, Hu H, Yang Y and Han H: AURKA upregulation plays a role in fibroblast-reduced gefitinib sensitivity in the NSCLC cell line HCC827. Oncol Rep 33: 1860-1866, 2015.
- 42. Kasam RK, Ghandikota S, Soundararajan D, Reddy GB, Huang SK, Jegga AG and Madala SK: Inhibition of Aurora kinase B attenuates fibroblast activation and pulmonary fibrosis. EMBO Mol Med 12: e12131, 2020.
- 43. Kim HJ, Cho JH, Quan H and Kim JR: Down-regulation of Aurora B kinase induces cellular senescence in human fibroblasts and endothelial cells through a p53-dependent pathway. FEBS Lett 585: 3569-3576, 2011.
- 44. Lugano R, Ramachandran M and Dimberg A: Tumor angiogenesis: Causes, consequences, challenges and opportunities. Cell Mol Life Sci 77: 1745-1770, 2020.
- 45. Wang Z, Zhao Y, An Z and Li W: Molecular links between angiogenesis and neuroendocrine phenotypes in prostate cancer progression. Front Oncol 9: 1491, 2020.
- 46. Villaume K, Blanc M, Gouysse G, Walter T, Couderc C, Nejjari M, Vercherat C, Cordier-Bussat M, Roche C and Scoazec JY: VEGF secretion by neuroendocrine yumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway. Neuroendocrinology 91: 268-278, 2010.
- 47. Ton AT, Singh K, Morin H, Ban F, Leblanc E, Lee J, Lallous N and Cherkasov A: Dual-inhibitors of N-Myc and AURKA as potential therapy for neuroendocrine prostate cancer. Int J Mol Sci 21: 8277, 2020.
- 48. Sedlář A, Trávníčková M, Matějka R, Pražák Š, Mészáros Z, Bojarová P, Bačáková L, Křen V and Slámová K: Growth factors VEGF-A165 and FGF-2 as multifunctional biomolecules governing cell adhesion and proliferation. Int J Mol Sci 22: 1843, 2021.
- 49. Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y and Thyberg J: Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-Cinduced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. Circ Res 94: 664-670, 2004.
- 50. Grugan KD, Miller CG, Yao Y, Michaylira CZ, Ohashi S, Klein-Szanto AJ, Diehl JA, Herlyn M, Han M, Nakagawa H and Rustgi AK: Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion. Proc Natl Acad Sci USA 107: 11026-11031, 2010.
- 51. Sahni A and Francis CW: Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires alphavbeta3. Blood 104: 3635-3641, 2004.
- 52. Huy NQ and Trang NTM: Evaluation the anti-tumor activity of SM2 fraction extracted from Stephania dielsiana Y.C.Wu on Swiss mice bearing S180 sarcoma tumor. Vietnam Pharm J 55: 42-45, 2015 (In Vietnamese).



Cytotoxic effects of aporphine alkaloids from the stems and leaves of

Stephania dielsiana Y.C.Wu

Tran Thi Thu Hien ^{a,1}, Le Ba Vinh ^{b,c,1}, Nguyen Quoc Huy ^a,

Nguyen Phuong Thao^b, Ki Yong Lee^{c,*}, Le Thi Kim Van^{d,*}

^a VietNam University of Traditional Medicine, 2 Tran Phu, Ha Dong, Hanoi, Vietnam

^b Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

^c College of Pharmacy, Korea University, Sejong, Republic of Korea

^d National Institute of Medicinal Materials, 3B- Quang Trung, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

¹ Two authors contributed equally to this paper.

* Corresponding authors.

Prof. Ki Yong Lee

College of Pharmacy, Korea University, Sejong, 30019, Republic of Korea Tel: +82-44-860-1623 Fax: +82-44-860-1606 Email: <u>kylee11@korea.ac.kr</u>

Dr. Le Thi Kim Van

National Institute of Medicinal Materials, 3B-Quang Trung, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam Tel: +84-911-016-536 Email: <u>lethikimvannimm0@gmail.com</u>

The English in this document has been checked by at least two professional editors, both nativespeakersofEnglish.Foracertificate,pleasesee:http://www.textcheck.com/certificate/nNZxgR

ABSTRACT

Phytochemical studies of the stems and leaves of *Stephania dielsiana* Y.C.Wu yielded two new aporphine alkaloids (**1** and **5**), along with six known alkaloids (**2–4** and **6–8**). Their structures were characterised based on analyses of spectroscopic data, including one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and high-resolution electrospray ionisation mass spectrometry (HR-ESI-MS). The cytotoxic activities of the isolated compounds against a small panel of tumour cell lines were assessed by MTT assay. Interestingly, compound **2** exhibited particularly strong cytotoxic activities against HepG2, MCF7 and OVCAR8 cancer cell lines, with IC₅₀ values of 3.20 ± 0.18 , 3.10 ± 0.06 and $3.40 \pm 0.007 \mu$ M, respectively. Furthermore, molecular docking simulations were carried out to explore the interactions and binding mechanisms of the most active compound (compound **2**) with proteins. So that, this study demonstrated that aporphine alkaloids from *S. dielsiana* could be promising as candidates for the development of new anti-cancer drugs.

Keyword: Stephania dielsiana Y.C.Wu, Menispermaceae, Aporphine alkaloids, Cytotoxicity

1. Introduction

According to the World Health Organization, cancer and cardiovascular disease are the two major causes of mortality worldwide. An overview summarised cancer incidence and mortality rates by sex and age in 2020, for 38 cancer sites in 185 nations and territories worldwide (Ferlay et al. 2021). Numerous disorders, including allergies, oxidative stress, chronic inflammation, cardiovascular diseases and disorders that promote aberrant cell growth, are linked to cancer (Khansari et al. 2009). Although there are a variety of treatment options for cancer, including surgery, chemotherapy and radiotherapy, there is a great deal of research interest in more affordable options using natural ingredients to both prevent and treat cancer (Li et al. 2022, Vinh et al. 2020). Therefore, identification of novel therapeutic components in folk medicines is crucial in the battle against cancer (Duyen et al. 2022, Thang Hoang et al. 2021).

Alkaloids are a large class of organic molecules containing at least one nitrogen atom that exist naturally in both plants and marine organisms. Alkaloids have diverse pharmacological properties, including anti-inflammatory, anticancer, antibacterial and antioxidant properties (Li et al. 2022). Numerous alkaloids have been identified and used in traditional and modern medicine, or have served as the basis for new drug development (e.g. morphine and other opium alkaloids found in opium poppies) (Matos et al. 2022). In addition, berberine, an alkaloid derived from the *Berberis* genus, has historically been employed in Ayurvedic, Chinese and Middle Eastern folk medicines for its effects against a range of pathogens, including bacteria, viruses, fungi, protozoa and helminths (Kong et al. 2022).

The Menispermaceae plant family, which contains the genus *Stephania* Lour., is a significant source of medicinal plants (Deng et al. 2011). The alkaloids from this genus are divided into six main groups: hasubanan, aporphine, proaporphine, protoberberine, bisbenzylisoquinoline and morphinandienone (Zhou et al. 2018).

From Stephania dielsiana Y.C.Wu, which is one species of the genus, twenty seven alkaloids were isolated and annouced, such as: sinoacutin, stephanin, ayuthianin, dehydrostephanin, cephamorphinanin, aknadinin, liriodenin. sinomenin. Ltetrahydropalmatin, (-) corydalmin, oxocrebanin, nor-canelillin, crebanin, dehydrocrebanin, stesakin, isolaurelin, oxoputerin, (+)-O-methylbulbocapnin, 8demethyldehydrocrebanin, vireakin, dehydroisolaurelin, sukhodianin, crebanin N-oxid, và dehydroroemerin, oxostephanin, palmatin, thailandin.

Especially, alkaloids from *Stephania dielsiana* Y.C.Wu exhibited diverse pharmacological effects, such as cytotoxic, anticancer, anthelmintic and antimicrobial activities (Knockleby et al. 2020, Zhou et al. 2018). As part of an ongoing effort to discover bioactive components from herbal medicine as possible anticancer treatments (Tuan Anh et al. 2021,

Vinh et al. 2019a, Vinh et al. 2019b, Vinh et al. 2020), we describe the structure, extraction, and isolation of two new aporphine alkaloids (**1** and **5**), along with six known alkaloids (**2**–4 and **6**–**8**), from the leaves of *S. dielsiana*. The anticancer properties of isolated compounds were also evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) protocol using the HepG2, MCF7 and OVCAR8 human cancer cell lines. The results showed that compound **2** exhibited particularly strong cytotoxic activities against HepG2, MCF7 and OVCAR8 cancer cell lines, with IC₅₀ values of 3.20 ± 0.18 , 3.10 ± 0.06 and $3.40 \pm 0.007 \mu$ M, respectively. Furthermore, molecular docking simulations of active compounds were performed to further support our *in vitro* findings.

2. Results and discussion

2.1. Structure and identification of new compounds

Dried stems and leaves of *S. dielsiana* (7.0 kg) were extracted with 95% MeOH (15 L \times 3 times) at ambient temperature. MeOH residue was produced after the solvent evaporated under reduced pressure (680 g).

Utilising several chromatographic separation methods, two new alkaloids, stedieltines A–B (1 and 5), and six known alkaloids (oxostephanine (2), oxocrebanine (3), oxostephanosine (4), aristolactam (6) (Achari et al. 1984), crebanine (7) and dehydrocrebanine (8) (Thien et al. 2018)) were purified from the ethylacetate (EtOAc) fraction. Spectroscopic techniques clearly revealed their structures by comparison with previously published data.

Stedieltine A (1) was obtained as a yellowish amorphous powder. It showed a positive reaction to Dragendorff's reagent, indicating that it was an alkaloid. Its molecular formula, $C_{19}H_{15}NO_6$, with an index of hydrogen deficiency of 13, was defined based on a protonated molecular ion at m/z 354.0979 [M + H]⁺ (calcd C₁₉H₁₆NO₆⁺, 354.0977) using high-resolution electrospray ionisation mass spectrometry (HRESIMS) (Fig. S9), and from the ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) data. Analysis of the ¹H NMR and ¹H-¹H COSY spectra (Table S1, Fig S3) revealed the presence of deshielded aromatic proton signals [$\delta_{\rm H}$ 7.00 (1H, dd, J = 8.0, 1.0 Hz, H-9), 6.81 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-10) and 6.67 (1H, dd, J = 8.0, 1.0 Hz, H-11)] characteristizing of an aporphine moiety. A pair of AB doublets [$\delta_{\rm H}$ 7.81 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-4) and 8.28 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-5)] were characteristic signals of H-4 and H-5 oxoaporphine derivatives. In addition, two methoxy groups [$\delta_{\rm H}$ 3.14 (3H, s, 7-OCH₃) and 3.83 (3H, s, 8-OCH₃)], and one isolated aromatic singlet at $\delta_{\rm H}$ 7.44 (1H, s), were attributed to H-3, while the singlet at $\delta_{\rm H}$ 6.14 (2H, s, H-12) was consistent with two hydrogens of a methylenedioxy group in the ¹H NMR spectrum. The ¹³C NMR spectra revealed 19 carbon signals, including 15 aromatic carbons, 1 aromatic O-methyl group [$\delta_{\rm C}$ 55.9 (8-OMe)], and 1 methylenedioxy [$\delta_{\rm C}$ 101.9 (C-12)], and a methoxy group [δ_C 51.2 (7-OCH₃)] from one ester [δ_C 167.0 (C = O)] were also observed.

The above data suggested that 1 has an aporphine skeleton and is structurally similar to oxostephanine (2) (Thien et al. 2018), differing only in terms of the replacement of the ketone at C-7 in **2** by a methoxycarbonyl [($\delta_{\rm H}$ 3.14/ $\delta_{\rm C}$ 51.2, (OCH₃) and $\delta_{\rm C}$ 167.0 (-COO-)]. This was supported by the present of a methoxy signal at $\delta_{\rm H}$ 3.14 (3H, s,7- OCH₃), correlation from $\delta_{\rm H}$ 3.14 to $\delta_{\rm C}$ 167.0 (C-7). An hydroxyl group has been revealed by the chemical signal at $\delta_{\rm C}$ 145.0 (C-7a), interpreted for an oxygenated aromatic carbon. Additonally, an oxygenated hydrogen signal was demonstrated by a boarden signal on ¹H-NMR spectrum at 8.60 ppm in **1**. The Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (HMQC) data revealed the correlations beetween $\delta_{\rm H}$ 7.44 (s, H-3) and $\delta_{\rm C}$ 102.1 (C-3); $\delta_{\rm H}$ 7.81 (d, J=5.5, H-4) and $\delta_{\rm C}$ 121.9 (C-4); $\delta_{\rm H}$ 8.28 (d, J= 5.5, H-5) and $\delta_{\rm C}$ 139.9 (C-5); $\delta_{\rm H}$ 7.00 (dd, J=8.0, 1.0, H-9) and $\delta_{\rm C}$ 111.8 (C-9); $\delta_{\rm H}$ 6.81 (t, J=8.0, H-10) and $\delta_{\rm C}$ 118.1 (C-10); $\delta_{\rm H}$ 6.67 (dd, J=8.0, 1.0, H-11) and $\delta_{\rm C}$ 123.7 (C-11); $\delta_{\rm H}$ 6.11 (s, H-12) and $\delta_{\rm C}$ 101.9 (C-12); $\delta_{\rm H}$ 3.14 (s, 3H, 7-OCH₃) and $\delta_{\rm C}$ 51.2 (C-OCH₃); The Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) data showed correlations: from $\delta_{\rm H}$ 6.14 (H-12) to $\delta_{\rm C}$ 150.0 (C-1), 147.5 (C-2); from $\delta_{\rm H}$ 7.44 (H-3) to $\delta_{\rm C}$ 150.0 (C-1), 147.5 (C-2), 135.5 (C-3a), 121.9 (C-4), and 121.1 (C-6b); $\delta_{\rm H}$ 7.81 (H-4) to $\delta_{\rm C}$ 102.1 (C-3), 135.5 (C-3a), 139.9 (C-5), and 121.1 (C-6b); $\delta_{\rm H}$ 8.28 (H-5) to $\delta_{\rm C}$ 135.5 (C-3a), 121.9 (C-4), and 150.2 (C-6a); $\delta_{\rm H}$ 6.67 (H-11) to $\delta_{\rm C}$ 112.7 (C-11b), 145.0 (C-7a), and 111.8 (C-9); $\delta_{\rm H}$ 3.83 (8-OCH₃) to $\delta_{\rm C}$ 147.5 (C-8); $\delta_{\rm H}$ 7.00 (H-9) to $\delta_{\rm C}$ 145.0 (C-7a), 147.5 (C-8) and 123.7 (C-11) (Figure 2 and S5, S7) further suggested the existence of an aporphine skeleton. The planar structure of 1 was fully assigned and further confirmed by detailed analysis of its two-dimensional NMR spectrums including HMQC, HMBC, ¹H-¹H COSY (COrrelated SpectroscopY) (Fig. S6) and NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) (Fig. S8). Based on its structure, 1 was characterised as a new aporphine alkaloid, named Stedieltine A.

Stedieltine B (**5**) was obtained as a brown solid, and the molecular formula $C_{17}H_{13}NO_5$ was determined by HRESIMS from the protonated molecular ion observed at m/z 294.0766 [M + H]⁺ (calcd $C_{17}H_{14}NO_5^+$, 294.0766). In the ¹H NMR spectrum of **5**, the aromatic hydrogen signals at δ_H 6.95 (1H, dd, J = 8.0, 1.0 Hz, H-9), 7.10 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-10) and 7.74 (1H, dd, J = 8.0, 1.0 Hz, H-11) indicated the existence of a 1,2,3-substituted benzene moiety. Three signals of aromatic singlet hydrogens at δ_H 6.91 (1H, s, H-3), δ_H 7.06 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-4) and 7.82 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-5), as well as the HMBC correlations from H-3 (δ_H 6.91) to C-1 (δ_C 140.8), C-2 (δ_C 152.7) C-3a (δ_C 137.3) and C-6b (δ_C 112.2); H-4 to C-3 (δ_C 101.2), C-3a (δ_C 137.3), C-5 (δ_C 140.2) and C-6b (δ_C 112.2); and H-5 to C-3a (δ_C 137.3), C-4 (δ_C 115.7) and C-6a (δ_C 157.3), revealed the existence of one pentasubstituted and tetrasubstituted benzene moiety. In addition, a singlet downfield hydrogen signal at δ_H 6.20 (2H, s, 1-OCH₂O-2) indicated the presence of a methylenedioxy moiety, and a methoxy group at C-8 by { δ_H 3.93

(s; $\delta_{\rm C}$ 56.3; -OCH₃). The ¹³C NMR and HSQC spectra of 5 indicated the occurrence of 17 carbons, including 1 sp³ methylene, 15 sp² carbons and 1 methoxy group. The 15 sp² carbons could be ascribed to the presence of one double bond and two benzene ring moieties that accounted for 9 of the 12 degrees of unsaturation. The remaining three indices of hydrogen deficiency were assigned to three additional ring systems in 5. The above spectroscopic data analysis revealed that the structure of 5 resembled that of oxostephanine (2). The difference between 5 and oxostephanine (2) was revealed by comparing the NMR spectral data of 5 (Table 1) with that of oxostephanine, which showed that the carbonyl group at C-7 in oxostephanine was replaced by a bond to an oxygen atom in 5. This assignment was confirmed by the chemical shifts at $\delta_{\rm C}$ 157.3 (C-6a) and 141.3 (C-7a) as well as by high-resolution electrospray ionisation mass spectrometry (HR-ESI-MS) data. Additionally, HMQC has showed a signal between H-9 $(\delta_{\rm H} 6.95)$ and C-9 $(\delta_{\rm C} 113.1)$, that has meant for the lack of one -OCH₃ at position 9 in comparing with oxostephanine. Thus, the structure of 5 was determined as shown in Figure 1. The complete and unambiguous NMR assignments of oxostephanine (2), oxocrebanine (3), oxostephanosine (4), aristolactam (6) (Achari et al. 1984), crebanine (7) and dehydrocrebanine (8) (Thien et al. 2018) were accomplished by comparison of the spectroscopic data (NMR and MS) with literature values.

2.2 Biological evaluation

The potential cytotoxicity of compounds **1–8** was examined using three human cancer cell lines: HepG2, MCF7 and OVCAR8 (Tuan Anh et al. 2021). Compound **2** exhibited particularly strong cytotoxic activities against HepG2, MCF7 and OVCAR8 cells, with IC₅₀ values of 3.20 ± 0.18 , 3.10 ± 0.06 and $3.40 \pm 0.007 \mu$ M, respectively (Table 2). Other compounds showed weaker or no significant cytotoxic effects on the human cancer cell lines.

Based on the potential cytotoxic effects of compound **2**, a computational study was performed to support the results of the *in vitro* experiment. The interaction and binding mechanism of active compound **2** with proteins related to cancer were investigated by molecular docking simulations. The results showed that compound **2** had good binding energies of -9.8, -8.0 and -9.8 kcal/mol for HepG2 (PDB ID: 5EQG), MCF7 (PDB ID: 3ERT) and OVCAR8 (PDB ID: 3OG7), respectively (Figure 3). Furthermore, compound **2** exhibited a hydrogen bond with TRP412 in the active site for HepG2 (PDB ID: 5EQG). Therefore, compound **2** from *S*. *dielsiana* is a potential candidate for the development of novel anticancer therapeutic agents.

Previously, alkaloids isolated from the genus *Stephania* were reported to show remarkable antiinflammatory, antinociceptive and anticancer activities (Deng et al. 2011, Knockleby et al. 2020). In this study, eight compounds (1–8), including two new aporphine alkaloids (1 and 5), were identified in the methanol (MeOH) extract of *S. dielsiana* by combined column chromatography (CC). Compound **2** may have anticancer effects. Our results suggested that the alkaloids in *S. dielsiana* might have potential for the treatment of cancer and related diseases.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

The ¹H (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) spectra were recorded in deuterated solvents on an AVANCE III HD 500 spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA), operating at 125 MHz for ¹³C and 400 MHz for ¹H. Chemical shifts are reported in ppm (δ) and coupling constants (*J*) as Hz, relative to those of the solvent signal. Tetramethylsilane (TMS) was used as an internal reference. HRESIMS data were acquired using a 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Medium-pressure liquid chromatography (MPLC) was carried using a Biotage-Isolera One system (SE-751 03; Biotage, Uppsala, Sweden). CC was performed using silica gel 65-250 or 230-400 mesh silica gel (Sorbent Technologies, Atlanta, GA, USA), porous polymer gel (Diaion HP-20, 20-60 mesh; Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan), Sephadex LH-20 (Supelco, Bellefonte, PA, USA), octadecyl silica (ODS, 50 μm, COSMOSIL 140 C₁₈-OPN; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) and RP-18 (30-50 μm, YMC*GEL; Fuji Silysia Chemical, Kasugai, Japan). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on precoated silica gel 60 F₂₅₄ (1.05554.0001; Merck, Darmstadt, Germany) and RP-18 F_{254S} plates (1.15685.0001; Merck) and visualised under short wavelength ultraviolet (254 nm) and long wavelength ultraviolet (365 nm). The isolated compounds were visualised by spraying with 10% H₂SO₄ in water and then heating for 1.5–2 minutes. All procedures were carried out with solvents purchased from commercial sources used without further purification.

Cancer cell lines: HepG2, MCF7 and OVCAR8 cell lines were provided by the American Type Culture Collection (ATCC), then stored in nitrogen liquid in Biology Department, Natural Sciences University, Hanoi National University. The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc).

3.2. Identification of plant S. dielsiana

The study materials, which had harvested whole aerial parts from the first branch of trunk of *Stephania dielsiana*, were collected in Ba Vi district, Hanoi, Vietnam, in October 2019 and a voucher specimen (SD10/2019) was kept at the Department of Botany and Pharmacognosy, Vietnam University of Traditional Medicine, Hanoi, Vietnam.

3.3. Extraction of plant and column chromatography isolation of S. dielsiana

The stems and leaves of *S. dielsiana* (7 kg) were extracted with 95% MeOH (3×15 liters, 3 days each) at room temperature. The extracts were concentrated in vacuo to give a MeOH extract (680 g), which was suspended in H₂O (2.5 liters) and adjusted to pH 3 with 10% HCl.

The acidic aqueous phase was filtered off. The filtrate was loaded onto ion-exchange resin, eluted with 20% MeOH until the eluate became colourless to yield the nonalkaloid parts, and then eluted with 2% NaOH in 65% MeOH solution (5× retention volume) to afford the crude total alkaloids. The alkaloid-containing solution was acidified to pH 5 with 10% HCl and partitioned with ethyl acetate (EtOAc) (3 × 2L) to afford the EtOAc extract (65 g).

The EtOAc-soluble portion was subjected to silica gel column chromatography (CC) eluted with gradient systems of CH₂Cl₂-MeOH (100:0, 100:10, 100:30, 100:50, v/v). The eluted fractions were pooled according to TLC analysis, yielding six major fractions (SDE.1–SDE.6). The SDE.1 fraction was separated by silica gel CC and eluted with *n*-hexane-acetone (10:1, v/v) to afford **8** (8.8 mg). The SDE.3 fraction was subjected to silica gel CC and eluted with CH₂Cl₂-acetone (80:1, v/v), using the same methodology as described above for the initial CC of the alkaloid fraction. Subsequent preparative TLC was eluted with *n*-hexane-acetone (6:1, v/v) to give compound **7** (5 mg). Compounds **1** (5.5 mg) and **4** (3.9 mg) were obtained from fraction SDE.4 by silica gel CC (CH₂Cl₂-acetone, 18:1) and further separated by RP-18 (MeOH-H₂O, 1:2). Purification of SDE.6 over Sephadex LH-20 (100% MeOH), using this same methodology followed by preparative TLC, and eluted with CH₂Cl₂-MeOH (20:1), yielded compounds **2** (8.6 mg), **3** (2.8 mg) and **5** (3.5 mg). Finally, compound **6** (2.3 mg) was separated from fraction SDE.8 by chromatography on a Sephadex LH-20 column, using MeOH as the eluent, and further isolated and purified by silica gel CC (CH₂Cl₂-MeOH (10:1).

Stedieltine A (1): yellowish amorphous powder (for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table S1); HR-ESI-MS m/z 354.0979 [M + H]⁺ (calcd C₁₉H₁₆NO₆⁺, 354.0977).

Stedieltine B (5): brown solid (for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Table S1); HR-ESI-MS m/z 294.0766 [M + H]⁺ (calcd C₁₇H₁₄NO₅⁺, 294.0766).

3.4. Cytotoxicity assay

The MTS assay. Cells HepG2, MCF7 and OVCAR8 were seeded at a concentration of 1 x 10^5 cells/mL, 200 mL/well, into 96-well flat-bottomed tissue culture plates in eight replicates. The MTS assay was carried out using the MTS Cell Proliferation Colorimetric Assay Kit (BioVision, Inc., Milpitas, CA) following the manufacturer's instruction. In brief, after the cells were cultured with medium for 24 hours, then washed out and replaced with 200 µL fresh warmed the culture medium before adding 20 µL of MTS reagent (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*) into each well. The cells were further incubated for 2–4 h at 37°C in standard culture conditions. Then the absorbance was detected at 490 nm with a microplate reader. (Wang Y et al. 2020)

3.5. Molecular docking simulation

The docking study was carried out as described previously (Duyen et al. 2022). Briefly, molecular docking studies were carried out using AutoDock Vina 1.1.2 to determine the binding affinity and interaction of the most active compound (compound **2**) with proteins related to cancer, using protocols reported previously (Phong et al. 2022, Phong et al. 2021). The X-ray crystallographic structures of proteins related to cancer, i.e. HepG2 (PDB ID: 5EQG), MCF7 (PDB ID: 3ERT) and OVCAR8 (PDB ID: 3OG7), were obtained from the RCSB Protein Data Bank. Energy minimisation of the active compound was accomplished using Chem 3D Ultra version 20. The molecular docking results were visualised using Discovery Studio 20.1 (Dassault Systemes Biovia, San Diego, CA, USA).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This research is funded by the Administration of Science Technology and Training – Ministry of Health – Vietnam (according to Decision no. 2721/QD-BYT, dated June 28, 2019, and Contract no. 09/HD-K2DT, dated September 18, 2019).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at

References

- Achari B, Bandyopadhyay S, Chakravarty AK, Pakrashi SC. 1984. Carbon-13 NMR spectra of some phenanthrene derivatives from Aristolochia indica and their analogues. Org Magn Reson. 22:741-746.
- Deng Y, Yu Y, Luo H, Zhang M, Qin X, Li L. 2011. Antimicrobial activity of extract and two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *Stephania dielsiana*. Food Chem. 124:1556-1560.
- Duyen NT, Vinh LB, Phong NV, Khoi NM, Long PQ, Hien TT, Dat NT, Lee KY. 2022. Steroid glycosides isolated from *Paris polyphylla* var. *chinensis* aerial parts and paris saponin II induces G1/S-phase MCF-7 cell cycle arrest. Carbohydr Res. 519:108613.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. Int J Cancer. 149:778-789.
- Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. 2009. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 3:73-80.
- Knockleby J, Pradines B, Gendrot M, Mosnier J, Nguyen TT, Trinh TT, Lee H, Le PM. 2020. Cytotoxic and anti-plasmodial activities of *Stephania dielsiana* YC Wu extracts and the isolated compounds. Molecules. 25:3755.
- Kong Y, Li L, Zhao L-G, Yu P, Li D-D. 2022. A patent review of berberine and its derivatives with various pharmacological activities (2016–2020). Expert Opin Ther Pat. 32:211-223.
- Li C, Wang J, Ma R, Li L, Wu W, Cai D, Lu Q. 2022. Natural-derived alkaloids exhibit great potential in the treatment of ulcerative colitis. Pharmacol Res. 175:105972.
- Matos AC, Marques IA, Pires AS, Valentim A, Abrantes AM, Botelho MF. 2022. The potential effect of lidocaine, ropivacaine, levobupivacaine and morphine on breast cancer preclinical models: a systematic review. Int J Mol Sci. 23:1894.
- Phong NV, Anh DTN, Chae HY, Yang SY, Kwon MJ, Min BS, Kim JA. 2022. Antiinflammatory activity and cytotoxicity against ovarian cancer cell lines by amide alkaloids and piperic esters isolated from *Piper longum* fruits: in vitro assessments and molecular docking simulation. Bioorg Chem.106072.
- Phong NV, Oanh VT, Yang SY, Choi JS, Min BS, Kim JA. 2021. PTP1B inhibition studies of biological active phloroglucinols from the rhizomes of *Dryopteris crassirhizoma*: Kinetic properties and molecular docking simulation. Int J Biol Macromol. 188:719-728.

- Thang Hoang D, Hien Truong TT, Viet Duc N, Anh Hoang LT, Do TT, Vinh LB, Young Yang S, Dan G, Tuan Anh L. 2021. Hepatoprotective effects of extract of *Helicteres hirsuta* Lour. on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. Appl Sci. 11:8758.
- Thien DD, Thuy TT, Huy NQ, Thuy HV, Duong LTT, Tam NT. 2018. Cytotoxic alkaloids from *Stephania dielsiana*. Chemistry of Natural Compounds. 54:613-616.
- Tuan Anh HL, Le Ba V, Do TT, Phan VK, Pham Thi HY, Bach LG, Tran MH, Tran Thi PA, Kim YH. 2021. Bioactive compounds from *Physalis angulata* and their antiinflammatory and cytotoxic activities. J Asian Nat Prod Res. 23:809-817.
- Vinh LB, Jang H-J, Phong NV, Dan G, Cho KW, Kim YH, Yang SY. 2019a. Bioactive triterpene glycosides from the fruit of *Stauntonia hexaphylla* and insights into the molecular mechanism of its inflammatory effects. Bioog Med Chem Lett. 29:2085-2089.
- Vinh LB, Park JU, Duy LX, Nguyet NTM, Yang SY, Kim YR, Kim YH. 2019b. Ginsenosides from Korean red ginseng modulate T cell function via the regulation of NF-ATmediated IL-2 production. Food Sci Biotechnol. 28:237-242.
- Vinh LB, Phong NV, Ali I, Dan G, Koh YS, Anh HLT, Van Anh DT, Yang SY, Kim YH. 2020. Identification of potential anti-inflammatory and melanoma cytotoxic compounds from *Aegiceras corniculatum*. Med Chem Res. 29.
- Wang Y, Nguyen DT, Yang G, et al.: An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium proliferation assay to overcome the interference of hydralazine. Assay Drug Dev Technol 2020;18:379–384
- Zhou D-X, Liang Y, Liu X-B, Zheng N, Xu W-f, Li J, Yang R-Y. 2018. Aporphine alkaloids from *Stephania dielsiana*. Chem Nat Compd. 54:1202-1204.

보낸사람: <u>rpsupport@tandf.co.uk</u>

받는사람: <u>syyang@sangji.ac.kr</u>

참조:

날짜: 2022-09-21 22:37:01

제목: Submission received for Natural Product Research (Submission ID: 229357444)

Dear Seo Young Yang,

Thank you for your submission.

Submission ID	229357444
Manuscript Title	Cytotoxic effects of aporphine alkaloids from the leaves of Stephania dielsiana
Journal	Natural Product Research

You can check the progress of your submission, and make any requested revisions, on the <u>Author Portal</u>.

Thank you for submitting your work to our journal. If you have any queries, please get in touch with <u>GNPL-peerreview@journals.tandf.co.uk</u>.

Kind Regards, Natural Product Research Editorial Office

Taylor & Francis is a trading name of Informa UK Limited, registered in England under no. 1072954.

Registered office: <u>5 Howick Place, London, SW1P</u> 1W.

보낸사람: "Natural Product Research" <<u>onbehalfof@manuscriptcentral.com</u>>

받는사람: <u>syyang@sangji.ac.kr</u>

참조:

날짜: 2022-10-12 17:11:07

제목: 229357444 (Natural Product Research) A revise decision has been made on your submission

12-Oct-2022

Dear Dr Seo Young Yang:

Your manuscript entitled "Cytotoxic effects of aporphine alkaloids from the leaves of Stephania dielsiana" which you submitted to Natural Product Research, has been reviewed. The reviewer comments are included at the bottom of this letter.

The reviewer(s) would like to see some revisions made to your manuscript before publication. Therefore, I invite you to respond to the reviewer(s)' comments and revise your manuscript.

To submit a revision, go

to <u>https://rp.tandfonline.com/submission/flow?submissionId=229357444&step=1</u>. If you decide to revise the work, please submit a list of changes or a rebuttal against each point which is being raised when you submit the revised manuscript.

If you have any questions or technical issues, please contact the journal's editorial office at <u>armandodoriano.bianco@uniroma1.it</u>.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to Natural Product Research, your revised manuscript should be uploaded by23-Nov-2022. If it is not possible for you to submit your revision by this date, we may have to consider your paper as a new submission.

Sincerely, Professor Bianco Editor-in-Chief, Natural Product Research armandodoriano.bianco@uniroma1.it

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author The authors presented a paper on the Cytotoxic effects of aporphine alkaloids from the leaves of *Stephania dielsiana*.

The topic is interesting and well within the aims and scopes of the Journal.

Yet, the manuscript needs some corrections and implementations and I have a serious concern about the real existence in nature of compound 1.

For these reasons, I recommend a Major Revision.

My comments are reported below one by one:

TITLE:

- Please write the complete botanical name of the species here i.e., *Stephania dielsiana* Wu.

ABSTRACT:

- Line 1: Please write the complete botanical name of the species here.

- Last sentence: It is not so simple. Please use the conditional mode here. KEYWORDS:

- Please write the complete botanical name of the species here.

- Please use the alkaloids and not alkaloid.

INTRODUCTION:

- Line 2: Ferlay et al not cited in the text as requested by the Journal.

- Please write the complete botanical name of the genus the first time you cite it.

- Please write the complete botanical name of the species the first time you cite it.

- Compound must not be start in capital.

- What about previous phytochemical studies on the species? Main results must be showed.

- In the abstract, you wrote about the stems. And where are their phytochemical results?

- Please add a few lines describing the morphological features of this plant (at least about the leaves and stems if they are included).

RESULTS AND DISCUSSION:

- Line 5: The names of the known alkaloids must be reported here together with their references.

- These parts should be: "...[δH 7.00 (1H, dd, J = 8.0, 1.0 Hz, H-9)..." and "...[δH 3.14 (3H, s, 7-OCH3) and 3.83 (3H, s, 8-OCH3)]...".

- "...[δC 1.1.9 (C-12)]." What is this?

- "Besides, the latter coming... was also observed." What?

- "The above data suggested that 1 has an aporphine skeleton and is structurally similar to oxostephanine..." Actually, I do not see much similarity.

- "This was supported by the absence of a methoxy signal at δ H 3.14 (1H, s), and by the HMBC correlation from δ H 3.14 (-OCH3) to δ C 167.0 (C-7) (Figure S1)." What does this mean exactly?

- "The other HMBC correlations...further suggested the existence of an aporphine skeleton." Check this part. Some are not real because the atoms are too far. In addition, the correlations between H-12 and C-1 and C-2 which are important, are also missing. - "The planar structure of 1 was fully assigned and further confirmed by detailed

analysis

of its two-dimensional NMR spectrum." How exactly?

- Compound 5. Attention, the molecular formula is wrong. The same as before about the HMBC correlations.

- "This assignment was confirmed by the chemical shifts at δ C 157.3 (C-6a) and 141.3 (C-7a)..." Really?

- What about the presence of the other compounds in previous studies on the species, genus and family? This aspect must be developed.

- "...on the> human..." What is this?

- And the positive controls and their values for the cytotoxic activity?

- What about comparing these values with those from other similar alkaloids?

- "Natural products are... for the treatment of cancer and related diseases." This part is

not for this section.

EXPERIMENTAL:

- More details are needed for the experimental settings of your MS instrument.

- Please provide the geographical coordinates and the altitude of the collection site.

- How was the botanical identification exactly carried out? By morphological

comparisons with books, monographs or other? And who did it?

- Why all these passages with pH? You have surely created artifacts and given your methodology, your compound 1 may be an artifact of extraction. Please use ethanol for the extraction and repeat the procedure in order to verify its real existence.

- v/v must be written in Italics and must be always present near concentration ratios.

Please specify the amount of silica gel used as well as all the concentration ratios and volumes of all the eluting systems used during the chromatography procedures.
Where did you get the cancer cell lines?

CONCLUSIONS:

- This section is not present as requested by the Journal. REFERENCES:

- Some references are incomplete.

- I remind you that plant names must be written in Italics also here.

SUPPLMENTARY MATERIAL:

- Please modify the title, abstract and keywords as previously suggested.

Reviewer: 2

Comments to the Author

The manuscript by Yang et al. is well-written and easy to trace, however it can be accepted for publication after considering few points:

1- Is compound 1 an artifact of 2, did you run any LCMS profiling for the total extract? 2- Did you use a positive control? Kindly add its values against different cell lines and tabulate all cytotoxicities in the suppl. material.

3- some minor corrections are required:

- P2 L20 remove the brackets
- P4 L5 remove the brackets
- P5 L34 give ref.
- P5 Revise L31-33
- P5 L46 correct 1.1.9

보낸사람: "Natural Product Research" <<u>onbehalfof@manuscriptcentral.com</u>>

받는사람: <u>syyang@sangji.ac.kr</u>

참조:

날짜: 2022-12-04 02:09:47

제목: 229357444.R1 (Natural Product Research) - changes required to your submission

03-Dec-2022

Dear Dr Seo Young Yang:

Your above referenced manuscript, entitled "Cytotoxic effects of aporphine alkaloids from the stems and leaves of Stephania dielsiana Y.C.Wu" has been unsubmitted for the below reason;

1)As per the journal guidelines, supplementary material should be indicated by the 'S' prefix e.g., Table S1, Figure S1, and so on, in order to differentiate it from the figures and tables that will actually be appearing in the main document of the article. Kindly include the prefix S to the table's citations and tables if they belong to the supplementary file.

Please visit the instructions to authors to complete your submission and re-submit the manuscript for consideration of publication.

To re-submit your manuscript, please go to your author dashboard at <u>https://rp.tandfonline.com/dashboard/</u>, locate the manuscript and click 'Resume'.

Sincerely, Ms Vinodhini Sundaram Natural Product Research 보낸사람: <u>rpsupport@tandf.co.uk</u>

받는사람: <u>syyang@sangji.ac.kr</u>

참조:

날짜: 2022-12-07 10:31:59

제목: Submission received for Natural Product Research (Submission ID: 229357444)

Dear Seo Young Yang,

Thank you for your submission.

Submission ID	229357444
Manuscript Title	Cytotoxic effects of aporphine alkaloids from the stems and leaves of Stephania dielsiana Y.C.Wu
Journal	Natural Product Research

You can check the progress of your submission, and make any requested revisions, on the <u>Author Portal</u>.

Thank you for submitting your work to our journal. If you have any queries, please get in touch with <u>GNPL-peerreview@journals.tandf.co.uk</u>.

Kind Regards, Natural Product Research Editorial Office

Taylor & Francis is a trading name of Informa UK Limited, registered in England under no. 1072954.

Registered office: <u>5 Howick Place, London, SW1P</u> 1W.