

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT CHIẾT TÁCH TỪ LÁ ĐU ĐỦ

HỒ THỊ HÀ, ĐỖ THỊ HOA VIÊN, LÊ QUANG HÒA

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Ở nước ta, cây đu đủ (*Carica papaya* L.) được trồng khắp nơi để lấy quả. Đây là loài cây có nhiều tác dụng tốt cho sức khỏe. Trên thế giới, kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học đã cho thấy, dịch chiết lá cây đu đủ thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định đối với cả chủng Gram (-) và Gram (+), ngoài ra còn có tác dụng kháng viêm, chống oxy hóa. Dịch chiết lá cây đu đủ đã được chứng minh là có hoạt tính chống ung thư và tác dụng điều hòa miễn dịch. Qua tiến hành thử hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính enzyme caspase 3 và 7 trên dòng tế bào ung thư phổi LU-1, hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và thử hoạt tính chống oxy hóa của một số hợp chất chiết tách từ lá đu đủ (gồm: axit plucholic, danielone, apocynol A, carpaine, pseudocarpaine), các tác giả bài báo đã đưa ra được các kết quả: có hai hợp chất là carpaine và pseudocarpaine thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư rất mạnh (IC_{50} từ 1,13-3,49 $\mu\text{g/ml}$) đối với 4 dòng tế bào ung thư: KB, HL-60, MCF-7, LU-1, đồng thời cũng gây độc đối với tế bào thường 3T3, bên cạnh đó, hai hợp chất này còn thể hiện khả năng kích hoạt enzym caspase 3 và 7 ở nồng độ thử cao nhất.

Từ khóa: dịch chiết lá cây đu đủ, kháng vi sinh vật kiểm định, kháng viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, điều hòa miễn dịch

THE STUDY ON BIOACTIVE PROPERTIES OF SOME COMPOUNDS FROM CARICA PAPAYA L. LEAVES

Summary

Carica papaya L. is grown in most of our country to get papaya fruit. This is the kind of plant with a lot of benefits for our health. The world's research results have shown that, the extract of *Carica papaya* L. leaves expresses the anti-microbial properties with both Gram (-) and Gram (+) strain; besides, it also has the ability of antiphlogistic and antioxidation. The extract is also proven that it contains the ability of anticancer and immune harmonization. Through the testing on the properties of cell intoxication and caspase 3 and 7 enzymes on lung cancer cells LU-1; anti-microbial and antioxidation properties of some compounds (including: plucholic, danielone, apocynol A, carpaine, pseudocarpaine acids), the authors have given out some findings such as the 2 compounds carpaine and pseudocarpaine expressing very strong cancer cell intoxication property (IC_{50} of 1.13-3.49 $\mu\text{g/ml}$) for 4 strains of cancer cells: KB, HL-60, MCF-7, LU-1, also intoxicating normal cells 3T3. In addition, these 2 compounds can also activate caspase 3 and 7 enzymes at the highest testing concentration.

Key words: the extract of *Carica papaya* L. leaves, the anti-microbial property, antiphlogistic and antioxidation, anticancer, immune harmonization

Đặt vấn đề

Cây đu đủ có tên khoa học là *Carica papaya* L. Cây cao khoảng 2-3 m, thân thẳng không phân nhánh, lá to mọc so le tập trung ở ngọn, cuống rất dài, xẻ 5-7 thùy sâu, gốc hình tim, đầu nhọn, mỗi thùy lại chia tiếp thành những thùy nhỏ không đều, gân lá hình chân vịt, hai mặt nhẵn. Ở nước ta, cây đu đủ (*Carica papaya* L.) được trồng khắp nơi để lấy quả. Đây là loại cây có nhiều tác dụng tốt cho sức khỏe. Quả đu đủ chín là món ăn bổ dưỡng, quả xanh có tác dụng nhuận tràng và lợi tiểu nhẹ. Nhựa mủ quả xanh có tác dụng trừ giun và chống đông máu. Hạt đu đủ có tác dụng

trừ giun, ngoài ra còn có các tác dụng khác như hạ sốt, lợi trung tiện. Rễ cây đu đủ có tác dụng hạ sốt, tiêu đờm và giải độc. Lá đu đủ dùng tiêu mụn nhọt, đun với nước để rửa vết loét, vết thương.

Kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới cho thấy, dịch chiết lá cây đu đủ thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định đối với cả chủng Gram (-) và Gram (+), ngoài ra còn có tác dụng kháng viêm, chống oxy hóa. Dịch chiết lá cây đu đủ đã được chứng minh là có hoạt tính chống ung thư và tác dụng điều hòa miễn dịch. Trong bài báo này, chúng tôi đánh giá hoạt tính gây độc tế bào, kích hoạt enzyme caspase 3 và 7, kháng khuẩn và chống oxy hóa của một số hợp chất tách chiết từ lá đu đủ.



Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

5 hợp chất tách chiết từ lá đu đủ: axit plucholic, danielone, apocynol A, carpaine, pseudocarpaine.

Các dòng tế bào ung thư: KB, HL-60, LU-1, MCF-7 và tế bào thường 3T3.

Các chủng vi sinh vật và nấm kiểm định: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Lactobacillus fermentum* (Lp B14), *Enterococcus faecium* (B 650) và nấm men *Candida albicans* (ATCC 10231).

Các loại môi trường nuôi cấy tế bào, vi sinh vật.

Phương pháp nghiên cứu

Phép thử sinh học xác định tính độc tế bào (cytotoxic assay):

Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD - Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỷ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn.

Phương pháp xác định hoạt tính enzyme caspase 3 và 7:

Được thực hiện dựa trên bộ kit Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3 và 7 Assay (Promega) theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Cho 50 µl hỗn dịch tế bào LU-1 ra đĩa 96 giếng với nồng độ tế bào thích hợp. Nồng độ tế bào được khuyến cáo sử dụng là $2 \cdot 10^5$ CFU/ml. Tiếp theo, bổ sung 50 µl mẫu thử ở các nồng độ vào các giếng thí nghiệm, chất đối chứng dương được sử dụng là Tamoxifen, đối chứng âm được bổ sung bằng 50 µl dung môi pha mẫu. Ủ mẫu trong 5 h ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂.

Thêm 100 µl Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagent cho tất cả các giếng thí nghiệm. Để đĩa thí nghiệm ở nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian từ 1-18 h. Đọc kết quả trên máy Tecan GENios Pro microplate reader, đo cường độ huỳnh quang (fluorescence - RFU) ở bước sóng: 485 ± 20 nm (excitation wavelength range) và 530 ± 25 nm (emission wavelength). Khả năng kích hoạt enzyme caspase 3 và 7 của mẫu được đánh giá thông qua công thức:

Hoạt tính caspase = Giá trị RFU của mẫu thử - Giá trị RFU của đối chứng âm.

Song song với việc xác định khả năng kích hoạt enzyme caspase 3 và 7 của mẫu thí nghiệm, phương pháp nhuộm Sulforhodamine B (SRB) cũng được tiến hành để xác định tính độc tế bào của mẫu ở cùng nồng độ trên thí nghiệm caspase, với cùng thời gian ủ mẫu và các điều kiện thí nghiệm khác.

Phương pháp xác định khả năng kháng vi sinh vật kiểm định:

Nguyên tắc: hoạt tính kháng vi sinh vật và nấm kiểm định được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ (Multimicrodilution assay). Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật và nấm nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử bằng cách đo độ đục (turbidity) của môi trường nuôi cấy tế bào vi sinh vật, thông qua các giá trị thể hiện hoạt tính là MIC (nồng độ nhỏ nhất của chất thử ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh

vật), IC_{50} (nồng độ chất thử ức chế 50% sự phát triển của vi sinh vật), MBC (nồng độ nhỏ nhất của chất thử diệt vi sinh vật). Trong đó, giá trị MIC được đọc bằng mắt thường và giá trị IC_{50} được tính theo công thức:

$$IC = 100\% \times \frac{OD_{mẫu thử} - OD_{control (-)}}{OD_{control (+)} - OD_{control (-)}}$$

Trong đó, control (-): môi trường nuôi cấy, control (+): môi trường chứa vi sinh vật.

Thực nghiệm: các mẫu thử nghiệm được tiến hành pha loãng thành dãy nồng độ từ cao xuống thấp. Nồng độ chất thử lần lượt là 128 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ và 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Dung dịch vi khuẩn ủ nấm với nồng độ 5.10^5 CFU/ml được ủ cùng dãy chất thử ở 37°C trong 24 h. Đọc và xử lý kết quả bằng máy quang phổ TECAN ở bước sóng 595 nm và phần mềm raw data trên máy tính. Các chất kháng sinh đối chứng: Ampicillin, Streptomycin, Amphotericin B.

Phương pháp thử hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp thu dọn gốc tự do DPPH:

Nguyên tắc: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là gốc tự do được dùng để sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của các chất nghiên cứu. Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua việc làm giảm màu DPPH của chất thử, được xác định bằng phép đo độ hấp thụ quang ở bước sóng $\lambda = 517$ nm trên máy quang phổ Genios Tecan (Áo).

Cách tiến hành: pha dung dịch DPPH có nồng độ 1 mM trong Methanol. Chất thử được pha trong DMSO 100% sao cho nồng độ cuối cùng đạt được một dãy các nồng độ 128 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ và 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Để thời gian phản ứng 30 phút ở 37°C, đọc kết quả là độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm.

Giá trị SC% (% quét gốc tự do) = $(OD_{trắng} - OD_{mẫu thử}) / OD_{trắng} (\%)$. Trong đó, $OD_{trắng}$ là độ hấp thụ của giếng chỉ có DPPH, $OD_{mẫu thử}$ là độ hấp thụ của giếng có DPPH và mẫu thử; EC_{50} (nồng độ có hiệu quả 50%) được tính theo đồ thị tương quan giữa giá trị SC với các nồng độ khác nhau của chất thử tính bằng phần mềm Excell.

Kết quả và thảo luận

Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào

Kết quả trình bày trong bảng 1 cho thấy hợp chất carpaine và pseudocarpaine có hoạt tính gây

Bảng 1: kết quả thử khả năng gây độc tế bào của các hợp chất tách từ lá đu đủ

Dòng tế bào	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)					
	Axit plucholic	Apocynol A	Danielone	Carpaine	Pseudocarpaine	Ellipticine (đối chứng dương)
KB	>100	>100	>100	1,13	1,66	0,86
HL-60	>100	>100	94,67	2,94	3,49	0,74
LU-1	>100	>100	>100	1,29	2,17	0,73
MCF7	>100	>100	>100	1,34	2,34	0,84
3T3	>100	>100	>100	1,40	1,88	0,73

độc tế bào ung thư mạnh (IC_{50} từ 1,13 đến 3,49) đối với tế bào ung thư KB, HL-60, LU-1, MCF-7, đồng thời gây độc với tế bào thường 3T3. Các hợp chất còn lại không có hoạt tính gây độc tế bào ung thư.

Kết quả thử hoạt tính enzyme caspase 3 và 7 trên dòng tế bào ung thư phổi LU-1

Kết quả xác định khả năng kích hoạt enzyme caspase 3 và 7 của hợp chất carpaine trên dòng tế bào ung thư phổi (LU-1) được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: kết quả xác định khả năng kích hoạt enzyme caspase 3 và 7 của hợp chất carpaine trên dòng tế bào ung thư phổi (LU-1)

Nồng độ hợp chất carpaine ($\mu\text{g/ml}$)	Hoạt tính caspase (RFU)	Tỷ lệ tế bào sống sót so với đối chứng
20	386,5	84,67
10	108,3	86,24
2	23,6	89,97
0,4	2,5	90,44

Kết quả trên cho thấy, hợp chất carpaine thể hiện khả năng kích hoạt enzyme caspase 3 và 7 ở nồng độ thử cao nhất (20 $\mu\text{g/ml}$) là 386,5 RFU. Chất đối chứng dương Tamoxifen hoạt động ổn định trong thí nghiệm với hoạt tính caspase ở nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ là 3.100 RFU. Các kết quả trên là chính xác với $r^2 \geq 0,99$.

Thông qua thí nghiệm xác định độ độc của hoạt chất lên dòng tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nhuộm SRB, kết quả tỷ lệ tế bào sống sót so với đối chứng của hoạt chất ở nồng độ thử nghiệm nằm trong khoảng 84,67-90,44% cho thấy, hợp chất carpaine không gây chết tế bào trên diện rộng nhưng cũng đã có tác động nhất định lên tế bào. Kết quả xác định khả năng kích hoạt enzyme caspase 3 và 7 của hợp chất pseudocarpaine được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3: kết quả xác định khả năng kích hoạt enzyme caspase 3 và 7 của hợp chất pseudocarpaine trên dòng tế bào ung thư phổi (LU-1)

Nồng độ hợp chất pseudocarpaine ($\mu\text{g/ml}$)	Hoạt tính caspase (RFU)	Tỷ lệ tế bào sống sót so với đối chứng
30	778	89
15	216	91
3	29,6	92
0,6	5,2	96

Kết quả trên cho thấy, hợp chất, pseudocarpaine thể hiện khả năng kích hoạt enzyme caspase 3 và 7 ở nồng độ thử cao nhất (30 $\mu\text{g/ml}$) là 778 RFU. Chất đối chứng dương Tamoxifen hoạt động ổn định trong thí nghiệm với hoạt tính caspase ở nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ là 3.100 RFU. Các kết quả trên là chính xác với $r^2 \geq 0,99$.

Thông qua thí nghiệm xác định độ độc của hoạt chất lên dòng tế bào nuôi cấy bằng phương pháp nhuộm SRB, kết quả tỷ lệ tế bào sống sót so với đối chứng của hoạt chất ở nồng độ thử nghiệm nằm trong khoảng 89-96% cho thấy, hợp chất pseudocarpaine không gây chết tế bào trên diện rộng nhưng cũng đã có tác động nhất định lên tế bào.

Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Bảng 4: kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật và nấm kiểm định của các hợp chất tách từ lá đu đủ

STT	Chất thử	Nồng độ ức chế 50% sự phát triển của vi sinh vật và nấm kiểm định - IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)						
		Gram (+)			Gram (-)			Nấm
		S.a	B.s	L.f	S.e	E.c	P.a	C.a
1	Axit plucholic	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
2	Apocynol A	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
3	Danielone	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
4	Carpaine	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
5	Pseudocarpaine	80	>128	>128	>128	>128	>128	>128
6	Chất kháng sinh							
	Ampicilin	1,0	1,05	1,02	NT	1,2	NT	NT
	Streptomycin	NT	NT	NT	12,5	NT	12	NT
	Amphotericin B	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,8

Kết quả trình bày trong bảng 4 cho thấy, 4 trong 5 hợp chất tách từ lá đu đủ đều không có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định. Riêng hợp chất pseudocarpaine có hoạt tính yếu đối với chủng vi khuẩn Gram (+) *staphylococcus aureus*, tuy nhiên lại không thể hiện hoạt tính đối với các chủng vi sinh vật thử nghiệm còn lại.

Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa

Kết quả nghiên cứu được chỉ ra ở bảng 5 cho thấy cả 5 hợp chất tách từ lá đu đủ đều không thể hiện hoạt tính chống oxy hóa.

Bảng 5: kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa của các hợp chất chiết tách từ lá đu đủ

STT	Chất thử	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
1	Axit plucholic	>128
2	Apocynol A	>128
3	Danielone	>128
4	Carpaine	>128
5	Pseudocarpaine	>128
6	Chất tham khảo: Resveratrol	8,3

Kết luận

Qua đánh giá một số hoạt tính sinh học của 5 hợp chất tách chiết từ lá đu đủ, kết quả cho thấy:

- Có hai hợp chất là *carpaine* và *pseudocarpaine* thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư rất mạnh (IC_{50} từ 1,13-3,49 $\mu\text{g/ml}$) đối với 4 dòng tế bào ung thư: KB, HL-60, MCF-7, LU-1, đồng thời cũng gây độc đối với tế bào thường 3T3.

- Hai hợp chất *carpaine* và *pseudocarpaine* cũng thể hiện khả năng kích hoạt enzym caspase 3 và 7 ở nồng độ thử cao nhất.

- Cả 5 hợp chất này đều không thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và chống oxy hóa ■

Tài liệu tham khảo

1. C. Baskaran, V. Ratha bai, S. Velu, Kubendiran Kumaran. *The efficacy of Carica papaya leaf extract on some bacterial and a fungal strain by well diffusion method*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease (2012).
2. Đặng Thị Thu (chủ biên). *Cơ sở công nghệ sinh học, Tập 2 - Công nghệ hóa sinh*. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, Hà Nội. 2009.
3. Nguyễn Thị Thu Hà, Bá Thị Châm, Nguyễn Thanh Trà, Phạm Thùy Linh, Dương Anh Tú, Hồ Đắc Hùng, Đỗ Thị Hoa Viên, Nguyễn Văn Tuyển (2010). *Hoạt tính kháng khuẩn của một số loài thực vật ở Việt Nam*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Tập 48 số 6A, 2010 (số đặc biệt Hội thảo lần thứ 2 - Nghiên cứu và phát triển các sản phẩm tự nhiên), tr.30-36.