

THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH TÁI TẠO XƯƠNG TỪ PHÂN ĐOẠN DỊCH CHIẾT ETHYL ACETAT CỦA CÂY XƯƠNG KHỈ *CLINACANTHUS NUTANS*

CHEMICAL COMPOSITION AND OSTEOPOROSIS ACTIVITY FROM ETHYL ACETATE EXTRACT OF *CLINACANTHUS NUTANS*

Đỗ Thị Thanh Xuân¹, Quách Thị Minh Thu¹, Nguyễn Ngọc Anh¹,
Nguyễn Quang Tâm¹, Đặng Vũ Lương¹, Thành Thị Thu Thủy^{1,*}, Ngô Văn Quang¹

DOI: <https://doi.org/10.57001/huih5804.49>

TÓM TẮT

Từ dịch chiết ethylacetat của cây *Clinacanthus nutans* đã phân lập được ba hợp chất, myricitrin (1), myricetin (2) và lupeol (3). Cấu trúc của Hóa học của chúng được xác định dựa trên phương pháp phổ 1D, 2D-NMR và khối phổ, cũng như so sánh với dữ liệu NMR được báo cáo trong tài liệu. Trong nghiên cứu này, hoạt tính tái tạo xương của các hợp chất được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình *in vitro* trên tế bào nguyên bào xương MC3T3-E1. Phát hiện cho thấy rằng lupeol đã chứng minh hoạt tính tạo xương thông qua việc tăng cường phosphatase kiềm (ALP) của tế bào nguyên bào xương lên đến 31,2%, 21% và 12% ở nồng độ 5, 10 và 20 µg/mL và hoạt tính khoáng hóa được tăng lên đến 170, 230, 185 và 117% ở nồng độ lần lượt là 5, 10, 20 và 40 µg/mL ($p < 0,05$).

Từ khóa: *Clinacanthus nutans*, flavonoids, tái tạo xương.

ABSTRACT

Phytochemical studies on ethyl acetate extract of *Clinacanthus nutans* led to three compounds, myricitrin (1), myricetin (2), and lupeol (3) were isolated. Their structures were determined based on NMR and MS spectra, as well as a comparison with the NMR data reported in the literature. In this study, bone regeneration activity of compounds was assessed using an *in vitro* model of osteoblast cells MC3T3-E1. The finding revealed that the compounds lupeol demonstrated the osteogenic activity through enhancement of alkaline phosphatase (ALP) of osteoblast cells up to 31.2%, 21% and 12% at concentrations of 5, 10 and 20 µg/mL and the mineralization activity was increased up to 170, 230, 185, and 117% at concentration of 5, 10, 20 and 40 µg/mL, respectively ($p < 0.05$).

Keywords: *Clinacanthus nutans*, flavonoids, osteogenic activity.

¹Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: thuyttt@ich.vast.vn

Ngày nhận bài: 15/8/2022

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 10/10/2022

Ngày chấp nhận đăng: 27/10/2022

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Loãng xương là một căn bệnh phổ biến trên toàn cầu với hơn 200 triệu người trên thế giới mắc phải, đặc biệt là ở

phụ nữ và người cao tuổi [1-2]. Việc sử dụng các loại thuốc tổng hợp hiện nay để điều trị loãng xương có thể gây ra các phản ứng phụ, chẳng hạn như đau bụng, chóng mặt và buồn nôn [1, 3-4]. Do đó, các hợp chất tự nhiên có khả năng điều trị loãng xương hiệu quả, duy trì độ chắc khỏe của xương với ít tác dụng phụ không mong muốn là những lựa chọn thay thế đầy hứa hẹn. Thực vật rất giàu chất chuyển hóa thứ cấp, do đó nó sẽ là nguồn tiềm năng để phân lập các tác nhân tạo xương mới và hiệu quả có khả năng tạo ra sự biệt hóa nguyên bào xương và do đó, tăng cường tái tạo xương mới [1, 4].

Clinacanthus nutans Lindau là một loài thực vật có hoa trong họ Acanthaceae. Cây này đã được sử dụng làm thuốc thảo dược ở các nước châu Á [5-7]. Nó được coi là phương pháp chữa trị chính đối với chứng viêm và tổn thương da do vi rút gây ra, chẳng hạn như vi rút viêm gan và herpes [8] hoặc chống ung thư [5, 9]. Đây cũng là một loại thuốc nam truyền thống của Việt Nam để điều trị gãy xương. Thành phần hóa học của cây này đã được nghiên cứu bao gồm flavonoid, steroid, triterpenoids, cerebroside, glycolipid, glycerid [10-12]. Mặc dù *C. nutans* đã được sử dụng để chữa lành xương gãy, cơ chế hoạt động chữa lành xương của nó vẫn chưa được làm rõ. Do đó, *C. nutans* có thể chứa các chất có khả năng tái tạo xương mới. Trong nghiên cứu này, hoạt tính tạo xương của lupeol, một hợp chất tự nhiên chính được phân lập từ cây này đã được nghiên cứu trên mô hình *in vitro* để bước đầu đưa ra thông báo về công dụng truyền thống của nó.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu

Cây Xương khỉ được thu hái tại Đà Lạt vào 6/2020 được TS. Nguyễn Quốc Bình, Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam định danh và mẫu tiêu bản VHH2020 lưu tại Trung tâm Phổ ứng dụng - Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

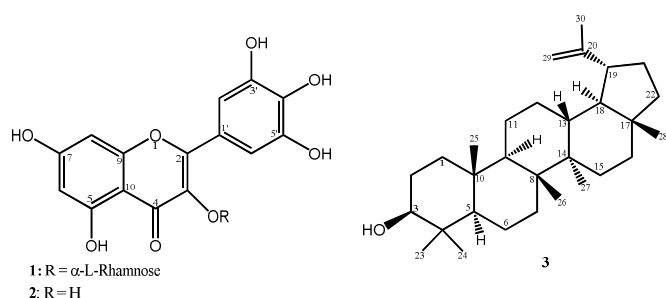
Tế bào tiền nguyên bào xương MC3T3-E1 được tổ chức tiêu chuẩn và trung tâm tài nguyên sinh học Mỹ - ATCC

(Manassas, VA, USA) cấp. Môi trường nuôi cấy (MEMα) được mua từ hãng Gibco BRL, Life Technologies (Mỹ). Thuốc thử MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), trypsin - EDTA, penicillin/streptomycin, chất nền *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP), axit ascorbic, dexamethasone, β -glycerol photphat, và huyết thanh bò thai (FBS) được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Hoa Kỳ).

2.2. Chiết tách và phân lập chất

Nghiên cứu khảo sát chỉ ra rằng phân đoạn dịch chiết ethylacetate (EtOAc) của cây *C. nutans* cho hoạt tính tạo xương mạnh nhất [13]. Do đó, chúng tôi đã lựa chọn phân đoạn này để phân lập chất và đánh giá hoạt tính sinh học. Mẫu *C. nutans* khô (3kg) nghiền thành bột, chiết với EtOH 96% ở nhiệt độ phòng trong 72 giờ ($3 \times 3\text{L}$), dịch chiết quay khô loại dung môi thu cao (47,65g). Cao chiết ethanol hòa vào nước sau đó được chiết lại bằng EtOAc ($3 \times 3\text{L}$), thu được cặn EtOAc (11,26g). Cặn đưa vào sắc ký cột silica gel (CC) sử dụng hệ dung môi *n*-hexan: axeton 5: 1 (v/v) thu sáu phân đoạn (F1.1 - F1.6). Phân đoạn F1.2 tiếp tục lên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan: ethyl axetat 7: 1 (v/v) thu được 3 hợp chất sạch, hợp chất **1** (25mg), hợp chất **2** (31mg), hợp chất **3** (138mg).

Myricitrin (**1**): chất bột màu vàng nhạt; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125MHz); xem bảng 1; Positive ESI-MS ở giá trị m/z 464,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, Negative ESI-MS m/z 462,9 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Myricetin (**2**): tinh thể hình kim màu vàng nhạt; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125MHz); xem bảng 1; Positive ESI-MS m/z 319 $[\text{M}+\text{H}]^+$, Negative ESI-MS m/z 317 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Lupeol (**3**): tinh thể hình kim màu trắng; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125MHz); xem bảng 1; Positive ESI-MS m/z 302,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, Negative ESI-MS m/z 300,8 $[\text{M}-\text{H}]^-$.



Hình 1. Cấu trúc của các hợp chất 1 - 3

2.3. Nuôi cấy tế bào và thử nghiệm khả năng sống của tế bào

Tế bào được nuôi cấy trong môi trường MEMα chứa 10% FBS và kháng sinh, ủ ở 37°C trong tủ CO_2 . Để tạo ra sự biệt hóa tạo xương trong tế bào MC3T3-E1, môi trường nuôi cấy đã được thay đổi thành môi trường ODM (MEMα được bổ sung với $50\mu\text{g}/\text{mL}$ axit ascorbic, 10^{-8}M dexamethasone và 10mM β -glycerolphosphat). Sau đó, các tế bào được ủ với chất thử nghiệm nồng độ cuối cùng là $0,5\text{mg}/\text{mL}$ MTT trong 4 giờ ở 37°C . Các tinh thể formazan sau đó được hòa tan trong DMSO và mật độ quang (OD) được đo ở bước sóng 570nm sử dụng đầu đọc

vi tấm (mô hình PowerWave XS; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Các tế bào chưa được xử lý được sử dụng làm đối chứng.

2.4. Hoạt tính của enzym phosphatase kiềm (ALP)

Để đánh giá hoạt tính của ALP, tế bào được cấy vào đĩa 96 giếng trong môi trường ODM được bổ sung 10% FBS. Môi trường nuôi cấy sau đó được thay thế bằng môi trường ODM mới có bổ sung / không có tác nhân cần thử nghiệm và ủ tiếp tục trong 7 ngày. Sau đó, các tế bào được rửa bằng đệm phosphat (PBS) và $100\mu\text{L}$ pNPP được thêm vào trong phản ứng. Cuối cùng, hoạt độ ALP được đo ở bước sóng 405nm bằng máy quang phổ (Evolution 201 UV-Vis, Thermo Scientific).

2.5. Hoạt tính khoáng hóa

Mức độ khoáng hóa được xác định bằng phương pháp nhuộm alizarin red-S trong các đĩa 96 giếng trong 14 ngày. Các tế bào nhuộm màu cho thấy sự hình thành khoáng hóa. Tế bào MC3T3-E1 được nuôi cấy trong môi trường DMEM có chứa vitamin C ($50\mu\text{g}/\text{mL}$) và β -glycerolphosphate (10mM) trong 3 tuần có / không có nồng độ thích hợp của mẫu cần khảo sát. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS, cố định bằng etanol 70% (v/v) trong 1 giờ, sau đó nhuộm với 40mM Alizarin red-S (pH 4,2) trong 1 giờ và rửa kỹ bằng nước. Sau đó, các tế bào được hủy trong 15 phút với 10% cetylpyridyl clorua trong dung dịch đệm PBS 10mM (pH 7,0). Mật độ quang được đo ở bước sóng 562nm để xác định mức độ nhuộm tế bào trong mẫu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** thu được dưới dạng bột màu vàng nhạt. Công thức phân tử của **1** được dự đoán là $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ dựa trên phổ khối lượng đo ở chế độ positive với pic ion phân tử $[\text{M}+\text{H}]^+$ ở giá trị m/z 464,9 và negative ở giá trị $[\text{M}-\text{H}]^-$ là m/z 462,9. Dữ kiện trên phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **1** gợi mở rằng đây là một hợp chất flavonoid có gắn với một phân tử đường rhamnose. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **1** (bảng 1) cho thấy các tín hiệu của một liên kết đôi meta có độ dịch chuyển hóa học ở δ_{H} 6,22 (1H; d; $J = 2,0\text{Hz}$) và δ_{H} 6,38 (1H; d; $J = 2,0\text{Hz}$), các tín hiệu này được gán cho vị trí H-6 và H-8 của vòng A khung flavonoid; một tín hiệu singlet của proton vòng thơm có giá trị tích phân là 2 ở độ dịch chuyển hóa học δ_{H} 7,36 (2H; s) đã được gán cho vị trí H-2' và H-6' trên vòng B tương ứng; tín hiệu proton methyl của gốc đường rhamnoside xuất hiện với độ dịch chuyển δ_{H} 0,99 (3H; d; $J = 6,0\text{Hz}$); bên cạnh đó tín hiệu của proton anome (H-1'') của đường rhamnoside xuất hiện ở δ_{H} 5,34 (1H; d; $J = 1,5\text{Hz}$). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 21 cacbon: gồm một nhóm carbonyl có độ dịch chuyển hóa học δ_{C} 178,29; sáu nhóm methine ở δ_{C} 70,76; 98,43; 93,31; 108,22; 102,23ppm; một nhóm methyl ở δ_{C} 16,25ppm; ba nhóm oxygenate methine của gốc đường có độ dịch chuyển từ δ_{C} 70,49 đến 71,98ppm; mười tín hiệu của cacbon bậc 4. Dựa trên dữ kiện phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của **1** và so sánh với dữ kiện phổ NMR trên tài liệu tham khảo [7], cấu trúc của hợp chất **1** đã được xác định là myricitrin.

Bảng 1. Số liệu phổ ^1H (500MHz) và ^{13}C -NMR (125MHz) của hợp chất **1-3**

C	$^a\delta_c$	Hợp chất 1		$^b\delta_c$	Hợp chất 2		C	$^c\delta_c$	Hợp chất 3	
		δ_c^b	δ_H^b (mult., J = Hz)		δ_c^d	δ_H^d (mult., J = Hz)			δ_c^a	δ_H^a (mult., J = Hz)
1							1	38,88	38,87	1,68 (1H, m); 0,90 (1H, m)
2	157,4	158,1		146,8	148,0		2	27,43	27,43	1,68 (1H, m); 1,57 (1H, m)
3	134,2	134,9		135,9	137,3		3	79,05	79,03	3,19 (1H, dd, 5,0; 11,0Hz)
4	177,7	178,3		175,7	177,2		4	38,73	38,73	-
5	161,3	161,8		160,7	162,4		5	55,33	55,33	0,69 (1H, d, 2,0Hz)
6	98,6	98,4	6,22 (1H; d; 2,0)	98,2	99,2	6,20 (1H; d; 2,0)	6	18,34	18,33	1,38 (1H, m); 1,52 (1H, m)
7	164,2	164,5		164,1	165,5		7	34,31	34,31	1,39 (2H, m)
8	93,5	93,3	6,38 (1H; d; 2,0)	93,2	94,3	6,40 (1H; d; 2,0)	8	40,86	40,86	-
9	156,4	157,1		156,1	158,2		9	50,47	50,47	1,25 (1H, m)
10	104,0	104,5		102,8	104,5		10	37,20	37,19	-
1'	119,6	120,6		120,7	123,1		11	20,95	20,95	1,25 (1H, m); 1,40 (1H, m)
2'	107,9	108,2	6,97 (1H; s)	107,1	108,5	7,36 (1H; s)	12	25,17	25,18	1,05 (1H, m); 1,66 (1H, m)
3'	145,7	145,5		145,7	146,7		13	38,08	38,08	1,66 (1H, m)
4'	136,4	136,5		135,8	136,9		14	42,86	42,85	-
5'	145,7	145,5		145,7	146,7		15	27,47	27,47	1,54 (1H, m); 1,59 (1H, m)
6'	107,9	108,2	6,97 (1H; s)	107,1	108,5	7,36 (1H; s)	16	35,61	35,60	1,37 (1H, m); 1,48 (1H, m)
1''	101,9	102,2	5,34 (1H; d; 1,5)				17	43,02	43,01	-
2''	70,0	70,5	4,24 (1H; dd; 1,5; 2,0)				18	48,34	48,33	1,36 (1H, s)
3''	70,4	70,6	3,81 (1H; dd; 3,5; 9,5)				19	48,00	48,00	2,38 (1H, d, 6,5Hz)
4''	71,3	71,9	3,6 (1H; m)				20	150,98	150,98	-
5''	70,6	70,7	3,53 (1H; m)				21	29,87	29,87	1,31 (1H, m); 1,92 (1H, m)
6''	17,5	16,3	0,99 (3H; d; 6,0)				22	40,02	40,01	1,37 (1H, m); 1,20 (1H, m)
							23	28,00	27,99	0,88 (3H, s)
							24	15,37	15,36	0,83 (3H, s)
							25	16,13	16,12	0,84 (3H, s)
							26	16,00	15,99	1,03 (3H, s)
							27	14,57	14,56	0,94 (3H, s)
							28	18,02	18,01	0,79 (3H, s)
							29	109,33	109,31	4,69 (d, 2,5Hz); 4,56 (dd, 1,5; 2,5Hz)
							30	19,32	19,31	1,68 (3H, s)

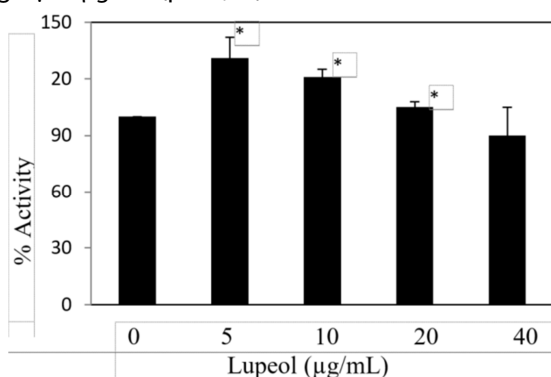
$^a\delta_c$ —myricitrin đo trong DMSO— d_6 [7], $^b\delta_c$ đo trong CD_3OD , $^c\delta_c$ —myricetin đo trong DMSO— d_6 [8], d đo trong CD_3OD , $^e\delta_c$ —lupeol đo trong CDCl_3 [12]

Hợp chất **2** thu được dưới dạng tinh thể hình kim có màu vàng nhạt. Phổ khối lượng ESI của **2** đo ở chế độ positive có giá trị $[\text{M} + \text{H}]^+$ là m/z 319 và negative $[\text{M} - \text{H}]^-$ là m/z 317, phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_8$. Ngoài trừ tín hiệu của gốc đường ở vị trí C-3, phổ ^{13}C -NMR cho thấy tín hiệu của 15 cacbon (bảng 1) bao gồm một nhóm carbonyl, bốn tín hiệu nhóm methine, mười tín hiệu cacbon

bậc bốn. Phổ ^1H -NMR thể hiện tín hiệu của một liên kết đôi meta đặc trưng ở δ_H 6,20 (1H, d, J = 2,0Hz) và 6,40 (1H, d, J = 2,0Hz) tương ứng với H-6 và H-8 của flavonoid vòng A. Tín hiệu của một liên hợp AX khác ở δ_H 7,36 (2H, br, s) được gán cho H-2' và H-6' của vòng B. Phân tích dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **2** và so sánh với những dữ liệu trong tài liệu [8], cấu trúc của **2** được xác định là myricetin.

Hợp chất **3** thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng. Phổ khối ESI-MS đo ở mode positive cho tín hiệu pic ion phân tử tại m/z $[M+H]^+$ 427, gợi ý cho công thức phân tử $C_{30}H_{50}O$. Phổ 1H -NMR thể hiện đặc trưng của một triterpen vòng lupan với tín hiệu proton của nhóm $CH_2=C$ tại δ_H 4,69 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, Hb-29); 4,56 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, Ha-29), bên cạnh đó còn có tín hiệu proton của H-3 ở δ_H 3,19 (1H, dd, $J = 11,0$ Hz, 5Hz, H-3) và 7 tín hiệu proton singlet của nhóm methyl ở δ_H 1,68 (H-30); 1,03 (H-26); 0,94 (H-27); 0,95 (H-23); 0,83 (H-25); 0,79 (H-24) và 0,76 (H-28). Trên phổ ^{13}C -NMR và phổ DEPT cho thấy tín hiệu của 30 carbon, trong đó có 7 tín hiệu CH_3 , 10 tín hiệu nhóm CH_2 (trong đó có tín hiệu nhóm olefin CH_2 tại δ_C 109,5 (C-29), 5 tín hiệu nhóm CH (trong đó tín hiệu nhóm oxymethine ở vị trí 79,0 (C-3). Các dữ liệu phổ NMR gợi ý cho biết công thức của hợp chất **3** là hợp chất lupeol. So sánh các dữ liệu phổ với dữ kiện phổ trên tài liệu tham khảo [12], đã xác định được cấu trúc hợp chất **3** là lupeol.

Ảnh hưởng của lupeol đối với hoạt động ALP của nguyên bào xương: Alkaline phosphatase (ALP) là một dấu hiệu ban đầu của sự biệt hóa nguyên bào xương. Các kết quả được trình bày trong hình 2 cho thấy lupeol làm tăng hoạt tính ALP lên 31,2% ở nồng độ thấp nhất là 5 μ g/mL. Ở nồng độ 10 và 20 μ g/mL, hoạt tính được tăng cường tương ứng lên đến 21% và 12%. Tuy nhiên, hoạt tính có giảm nhẹ nhưng không khác biệt về mặt thống kê so với đối chứng ở nồng độ 40 μ g/mL ($p > 0,05$).

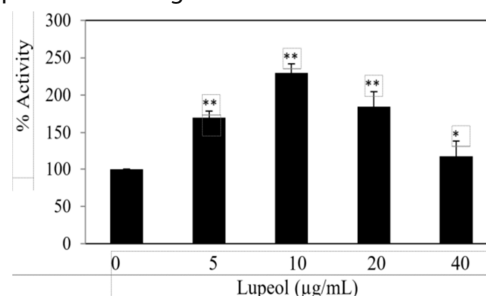


Hình 2. Ảnh hưởng của lupeol đến hoạt động ALP của nguyên bào xương MC3T3-E1

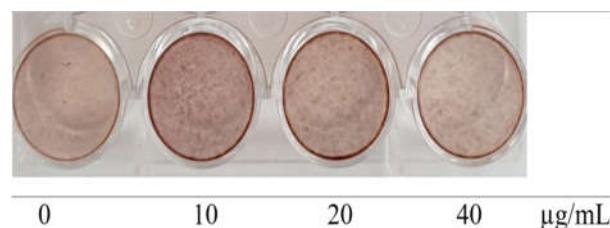
Ảnh hưởng của lupeol đến hoạt động khoáng hóa của tế bào nguyên bào xương MC3T3-E1: Quá trình khoáng hóa là nền của giai đoạn cuối cùng trong quá trình biệt hóa tế bào tạo xương. Khi quá trình khoáng hóa kết thúc, có thể thấy sự lắng đọng canxi (quá trình khoáng hóa xương) bằng cách sử dụng phương pháp nhuộm alizarin red-S. Kết quả thu được trong hình 3A cho thấy lupeol tăng cường khoáng hóa mạnh mẽ lên đến 170, 230, 185 và 117% ở nồng độ lần lượt là 5, 10, 20 và 40 μ g/mL. Việc nhuộm mô hóa để lắng đọng khoáng chất trong hình 3B đã xác nhận hoạt tính này của lupeol.

Sự biệt hóa tế bào xương trải qua ba giai đoạn: (i) sự phát triển của tế bào, (ii) sự trưởng thành của chất nền, và (iii) sự khoáng hóa của chất nền. Giai đoạn (ii) được xác

định bởi biểu thức hoạt động ALP tối đa [13] tăng cường ALP và khoáng hóa trong nguyên bào xương ống được coi là hai điểm đánh dấu quan trọng cho hoạt động tạo xương [14, 15]. ALP là một thành phần quan trọng trong quá trình hình thành mô cứng, biểu hiện cao ở sự khoáng hóa mô bào) cơ chế của enzyme này chưa được hiểu hoàn toàn, nhưng nó tăng nồng độ trong cả hai giai đoạn tăng nồng độ cục bộ của chất vô cơ photphat, một chất xúc tác khoáng hóa, và để giảm nồng độ pyrophosphat ngoại bào, một chất ức chế của sự hình thành khoáng chất. Fernandes và cộng sự [16] và Koon [17] đã đưa ra một bằng chứng chỉ ra ALP thủy phân các cơ chất photphat giải phóng pi và liên quan đến việc bắt đầu quá trình khoáng hóa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện rằng lupeol có tác dụng kích thích hoạt động của ALP, cho thấy vai trò của nó trong quá trình khoáng hóa.



Hình 3A. Lupeol gây ra hoạt động khoáng hóa của tế bào nguyên bào MC3T3-E1



Hình 3B. Sự hình thành canxi trong quá trình khoáng hóa xương được quan sát thấy trong nuôi cấy tế bào MC3T3-E1 được xử lý bằng lupeol

Giai đoạn cuối cùng của quá trình biệt hóa nguyên bào xương là quá trình khoáng hóa, trong đó chất nền khoáng chứa chủ yếu là photphat canxi ở dạng hydroxyapatit được tiết ra và lắng đọng bởi các nguyên bào xương trưởng thành [17]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sự lắng đọng được bắt đầu từ tuần thứ hai của nguyên bào xương biệt hóa trên cả tế bào không được xử lý và được xử lý với lupeol. Phương pháp nhuộm đã nhận thấy sự tăng cường đáng kể sự tích tụ canxi bởi các tế bào đang trải qua quá trình biệt hóa nguyên bào xương. Dữ liệu của chúng tôi gợi ý rằng lupeol xúc tác tốt hơn sự khoáng hóa và hàm lượng canxi cao hơn trong khoáng chất lắng đọng, rất cần thiết cho quá trình liền xương. Mỗi giai đoạn của quá trình biệt hóa tế bào được đặc trưng bởi các dấu hiệu phân biệt nguyên bào xương cụ thể. Collagen (COL1A1) và protein nền ngoại bào osteopontin (OPN) xuất hiện trong giai đoạn tăng sinh, và giai đoạn trưởng thành được đánh dấu bằng enzyme ALP không đặc hiệu (ALPL), sialoprotein tế bào liên kết (IBSP) và COL1A1. OPN và COL1 cũng được coi là dấu

hiệu ban đầu của quá trình tổng hợp chất nền xương và có liên quan với sự bắt đầu của quá trình khoáng hóa do sự liên kết của nó với canxi [17].

4. KẾT LUẬN

Hoạt tính tạo xương của lupeol trong tế bào MC3T3-E1 lần đầu tiên được đề cập ở mức độ *in vitro* trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy lupeol nâng cao hoạt động ALP bằng cách tương tác với axit amin trong trung tâm hoạt động của enzym lên đến 31,2%, 21% và 12% ở nồng độ 5, 10 và 20 µg/mL. Lupeol cũng làm tăng mạnh quá trình khoáng hóa trong nguyên bào xương ở nồng độ lần lượt là 5, 10, 20 và 40 µg/mL ($p < 0,05$).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Viện Hóa học (Đề tài mã số: VHH.2022.15).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Sözen T, Özişik L, Başaran NC, 2017. *An overview and management of osteoporosis*. Eur J Rheumatol, 4(1): 46–56.
- [2]. Leboime A, Confavreux CB, Mehse N, Paccou J, David C, Roux C, 2010. *Osteoporosis and mortality*. Joint Bone Spine, 77(2): 107–12.
- [3]. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR, 2017. *Drugs for the management of osteoporosis - A review*. Rev Bras Reumatol, 51(4): 365–71.
- [4]. Tabatabaei-Malazy, Salari P, Khashayar P, Larijani B, 2017. *New horizons in treatment of osteoporosis*. J Pharm Sci 25(2): 1–16.
- [5]. Rahman NMANR, Nurliyana MY, Afifah MNFNN, Osman MA, Hamid M, Lila MAM, 2019. *Antitumor and antioxidant effects of Clinacanthus nutans Lindau in 4 T1 tumor-bearing mice*. BMC Complement Altern Med, 19: 340.
- [6]. Yong YK, Tan JJ, Teh SS, Mah SH, Ee GCL, Chiong HS, Ahmad Z, 2013. *Clinacanthus nutans extracts are antioxidant with antiproliferative effect on cultured human cancer cell lines*. Evid-based Compl Alt Med, 1–8.
- [7]. Mahmouda II, Marzoukb MSA, Moharrama FA, El-Gindia MR, Hassana AMK, 2001. *Acyated flavonol glycosides from Eugenia jambolana leaves*. Phytochemistry 58, 1239–1244.
- [8]. Dajun H, Dongyu G, Huang Y, Ayupbek A, Yang Y, Aisa HA, Ito Y, 2009. *Separation and Purification of Phenolic Acids and Myricetin from Black Currant by High Speed Countercurrent Chromatography*. J Liq Chromatogr Relat Technol, 32(20): 3077–3088
- [9]. Shim SY, Aziana I, Khoo BY, 2013. *Perspective and insight on Clinacanthus nutans Lindau in traditional medicine*. J of Integ Bio, 14(1): 7–9.
- [10]. Kamarudin MNA, Sarker MMR, Kadir HA, Ming LC, 2017. *Ethnopharmacological uses, phytochemistry, biological activities, and therapeutic applications of Clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau - A comprehensive review*. J Ethnopharmacol, 206: 245–266.
- [11]. Mai CW, Yap KSI, Kho MT, Ismail NH, Yusoff K, Chin SY, Lim ESH, 2016. *Mechanisms underlying the anti-inflammatory effects of Clinacanthus nutans Lindau extracts: Inhibition of cytokine production and toll-like receptor-4 activation*. Front Pharmacol, 7(7): 1–11.

[12]. Silva ATM, Magalhães CG, Duarte LP, Mussel WN, Ruiz ALTG, Shiozawa L, Carvalho JE, Trindade IC, Filho SAV, 2017. *Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and in vitro evaluation of cancer cell growth*. Braz J Pharm Sci, 53(3): e00251.

[13]. The PyMOL molecular graphics system, Version 2.4.0, Schrodinger, LLC. 2020 November

[14]. Allouche AR, 2011. *Gabedit-A graphical user interface for computational chemistry softwares*. J Comp Chem, 32(1): 174–182.

[15]. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ, 2009. *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. J Comp Chem, 30(16): 2785–2791.

[16]. Fernandes J, Amorim R, Azevedo I, Martins MJ, 2008. *In vitro modulation of alkaline phosphatase activity of Saccharomyces cerevisiae grown in low or high phosphate medium*. Braz J Med Biol Res, 41(1): 41–6.

[17]. Koon T, Moss DW, 1969. *The estimation of intestinal alkaline phosphatase in human blood serum*. Clinica Chimica Acta, 25(1): 117–125.

AUTHORS INFORMATION

Do Thi Thanh Xuan, Quach Thi Minh Thu, Nguyen Ngoc Anh, Nguyen Quang Tam, Dang Vu Luong, Thanh Thi Thu Thuy, Ngo Van Quang

Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology