

Hoạt tính ức chế Pepsin và Protease HIV-1 của các cao chiết và hoạt chất Acid maslinic từ dược liệu

Nguyễn Văn Dũng¹, Lương Thị Kim Châu¹, Nguyễn Thị Hồng Loan^{1,2},
Nguyễn Thị Phương³, Phương Thiện Thương³,
Phan Tuấn Nghĩa^{1,2} Bùi Phương Thuận^{1,2,*}

¹Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường ĐHKHTN

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQĐHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa Hóa phân tích – Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu

Nhận ngày 05 tháng 5 năm 2015

Chỉnh sửa ngày 28 tháng 5 năm 2015; Chấp nhận đăng ngày 05 tháng 6 năm 2015

Tóm tắt: Trị liệu kháng retrovirus hiệu lực cao (highly active antiretrovirus therapy) nhằm ngăn chặn sự nhân lên của HIV trong cơ thể người bệnh hiện đang được xem là cách điều trị AIDS hiệu quả nhất hiện nay. Trong liệu pháp này chất ức chế protease của HIV-1 (Protease HIV-1: enzyme thuộc nhóm protease aspartic) là một trong 3 hợp phần không thể thiếu. Tuy vậy, HIV có sự biến đổi nhanh và hình thành nên các dạng kháng thuốc làm giảm hiệu quả điều trị, chính vì vậy việc tìm ra những thuốc mới là hết sức cần thiết.

Trong nghiên cứu này, 136 dịch chiết còn từ nhiều loại thực vật khác nhau đã được sàng lọc về khả năng ức chế pepsin (cùng thuộc nhóm protease aspartic) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có chứa cơ chất hemoglobin. Kết quả cho thấy cao chiết hạt Bơ, lá Gối hạc, toàn thân Ma hoàng, lá Ôi và lá Thạch châu ức chế mạnh hoạt tính của pepsin. Từ dịch cao chiết còn lá cây Gối hạc (*Leea rubra* L.), hợp chất acid maslinic (2 α ,3 β -dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid; công thức phân tử C₃₀H₄₈O₄) được phân lập và có tác dụng ức chế mạnh pepsin và protease HIV-1 với giá trị IC₅₀ tương ứng là 3,2 mM và 4,5 μ mol. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với dẫn liệu đã công bố trước đây về tác dụng ức chế protease HIV-1 của acid maslinic tách được phân lập từ một vài loài thực vật khác.

Từ khóa: Pepsin, Protease HIV-1, chất ức chế protease aspartic, acid maslinic, Gối hạc *Leea rubra* L.

1. Mở đầu

Virus gây suy giảm miễn dịch ở người type 1 (HIV-1) là tác nhân gây ra hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS). Cho đến nay, dù đã có những chương trình hành động toàn

cầu cùng với sự phát triển của các phương pháp điều trị, AIDS vẫn là đại dịch của toàn nhân loại. Theo Chương trình phòng, chống HIV/AIDS của Liên Hợp Quốc (UNAIDS), tính đến cuối năm 2013, toàn thế giới đã phát hiện 35 triệu người nhiễm HIV. Ở Việt Nam, trong 9 tháng đầu năm 2014 đã phát hiện gần 8.500 ca nhiễm mới HIV nâng tổng số trường hợp nhiễm

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-435575494.
Email: thuanbp@vnu.edu.vn

HIV lên khoảng 256.000 người [1]. Sự lây nhiễm HIV có xu hướng tăng nhanh ở các nước đang phát triển trong đó có Việt Nam. Từ năm 1987 liệu pháp dùng thuốc chống virus (ARV-antiretroviral drug therapy) bao gồm thuốc ức chế reverse transcriptase, thuốc ức chế integrase và thuốc ức chế protease (PI) đã được áp dụng giúp giảm tỷ lệ mắc và tử vong do HIV. Tuy nhiên, HIV có tỷ lệ đột biến cao dẫn đến hình thành các chủng mới, trong đó có những chủng có khả năng kháng thuốc ARV [2]. Chính vì vậy, việc tìm ra các thuốc mới, hiệu quả vẫn luôn được đặt ra. Một trong các hướng nghiên cứu được quan tâm là phát hiện các hợp chất ức chế sự nhân lên của HIV có nguồn gốc tự nhiên, đặc biệt từ thực vật [3].

Protease của HIV-1 (protease HIV-1) là enzyme không thể thiếu trong chu trình sống của virus. Nó cắt các chuỗi polypeptide gag, gag-pol tại những vị trí đặc hiệu để tạo thành các protein cấu trúc và enzyme cần thiết cho virus hoàn chỉnh. Do đó, protease HIV-1 được xem như một trong các đích quan trọng trong phát triển thuốc chống HIV thông qua khả năng ức chế enzyme [4]. Protease HIV-1 thuộc họ protease aspartic, có dạng dimer và mang những đặc điểm tương đồng với pepsin về cấu trúc cũng như cơ chế xúc tác. Cả protease HIV-1 và pepsin đều có trình tự nhận biết là Asp-Thr-Gly, nhìn chung, chúng có cấu trúc bậc nhất tương tự nhau, đều bị ức chế bởi pepstatin A và bị bất hoạt khi đột biến xảy ra ở vùng hoạt tính chứa Asp [5]. Do đó pepsin có thể được dùng như một enzyme đích để sàng lọc các chất ức chế protease HIV-1 [6, 7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc khả năng ức chế pepsin của các dịch chiết thảo dược thu thập tại Việt Nam, sau đó lựa chọn mẫu có tác dụng tốt để phân lập các hợp chất có hoạt tính ức chế mạnh pepsin và protease HIV-1. Trong đó, hoạt chất acid

maslinic có tác dụng mạnh được tìm thấy từ cây Gối hạc, một cây thuốc được sử dụng trong y học dân gian. Nghiên cứu nhằm hướng đến việc phát hiện các chất ức chế protease HIV-1 từ các nguồn thảo dược Việt Nam, làm cơ sở cho việc phát triển các thuốc điều trị bệnh AIDS.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Các hóa chất: pepsin; Hemoglobin; dimethyl sulphoxide (DMSO); trichloroacetic acid (TCA); agar; Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB); pepstatin A, cơ chất peptide L6525 (Lys-Ala-Arg-Val-Leu*Nph-Glu-Ala-Met) cho xác định hoạt tính của protease HIV-1 được mua từ Sigma-Aldrich. Protease HIV-1 là sản phẩm của đề tài ĐT-PTNTĐ.2012-G/02. Các hóa chất khác đều đạt độ tinh sạch dành cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Các dược liệu dùng cho sàng lọc hoạt tính do Viện Dược liệu cung cấp. Dược liệu được thu hái theo bộ phận sử dụng trong y học cổ truyền hay cách sử dụng trong dân gian. Các mẫu được xác định tên khoa học bằng khóa phân loại thực vật và so sánh với các tiêu bản lưu giữ tại Viện Dược liệu.

2.2. Phương pháp

Xác định hoạt tính ức chế enzyme bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có chứa cơ chất hemoglobin: Các đĩa agar (2,5%) được chuẩn bị trong đệm acetate 50 mM pH 3,5, chứa hemoglobin (0,3%) và được đục các lỗ (đường kính 4 mm) để cho mẫu phân tích. 10 µl dịch chiết thực vật hoặc các phân đoạn tinh sạch pha trong DMSO được cho vào giếng, ủ 37°C trong 15 phút cho đến khi dịch chiết khuếch tán một phần vào đĩa thạch, sau đó bổ sung 10 µl pepsin (1 mg/ml) pha trong HCl

0,01 N và tiếp tục ủ ở 37°C trong 2 giờ. Mẫu kiểm tra âm là mẫu thay đồng thời dịch chiết bằng DMSO, thay pepsin bằng dung dịch pha pepsin (HCl 0,01 N), mẫu kiểm tra dương là mẫu chỉ thay dịch chiết bằng DMSO. Sau khi ủ 120 phút, đĩa thạch được nhuộm bằng dung dịch CBB 0,25% pha trong hỗn hợp dung môi methanol: acetic acid: nước theo tỷ lệ 40:7:53 (về thể tích) và được tẩy nhiều lần bằng dung môi pha thuốc nhuộm cho tới khi nhìn rõ vòng phân giải của pepsin. Hoạt tính ức chế pepsin được đánh giá trên cơ sở đo vòng phân giải cơ chất, so sánh giữa mẫu thí nghiệm và các mẫu kiểm tra.

Xác định hoạt độ pepsin bằng phương pháp của Anson cải tiến với cơ chất hemoglobin theo quy trình mô tả của hãng Sigma Aldrich. Pepsin được ủ với dung dịch hemoglobin 2% trong HCl 60 mM ở 37°C, 15 phút. Phản ứng được làm ngừng bằng cách bổ sung TCA 5%, sản phẩm phân giải trong dịch nổi thu được sau khi ly tâm được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ánh sáng ở 280 nm (A_{280}). Đối chứng âm là mẫu mà pepsin bị bất hoạt bằng TCA 5% trước khi bổ sung cơ chất. Hoạt độ pepsin được đánh giá trên cơ sở hiệu số số đọc A_{280} của mẫu thí nghiệm và mẫu kiểm tra/đối chứng.

Xác định hoạt độ protease HIV-1 bằng quang phổ kế theo phương pháp được mô tả bởi Richards và tập thể [8] sử dụng cơ chất peptide tổng hợp có liên kết đặc hiệu của protease HIV-1 và hấp thụ cực đại tại bước sóng 300 nm.

Hoạt tính ức chế pepsin hay protease HIV-1 được xác định bằng cách ủ dịch mẫu chứa chất thử (cao chiết thực vật hay chất quan tâm) với pepsin hay protease HIV-1 trong 5 phút, trước khi bổ sung cơ chất trong cùng điều kiện phân tích. Mẫu kiểm tra hay đối chứng là thay dung dịch chứa chất ức chế bằng đệm chiết hay dung môi hòa tan chất ức chế.

Chuẩn bị dịch chiết thảo dược cho sàng lọc: Dịch chiết từ dược liệu được chuẩn bị bằng phương pháp ngâm lạnh. Cụ thể, dược liệu được ngâm với cồn (ethanol 96%) ở nhiệt độ phòng với tỷ lệ 1:10 (1 g dược liệu được ngâm với 10 ml ethanol) trong 3-4 ngày, lọc lấy dịch chiết. Lặp lại việc ngâm chiết 2 lần rồi gộp các dịch chiết đã được lọc lại, cất thu hồi dung môi đến khối lượng không đổi thu được cao dược liệu dùng cho thử hoạt tính (được xác định độ ẩm trước khi thử hoạt tính).

Phân đoạn và phân lập các hợp chất. Các cao chiết có tác dụng được phân đoạn bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần từ *n*-hexan (Hx), đến ethyl acetate (EtOAc) và *n*-butanol (BuOH). Phân lập các chất bằng sắc ký cột silica gel pha thường hoặc pha đảo, sử dụng sắc ký lớp mỏng để phân đoạn dịch rửa giải. Độ tinh khiết của các chất được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng (bản gel được phun thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% /ethanol, sấy ở 110°C và soi dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm và 365 nm) và bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Phân lập acid maslinic từ lá cây Gối hạc [9]: Dược liệu 3 kg lá cây gối hạc (*Leea rubra* Blume) độ ẩm 10% được cắt nhỏ, ngâm chiết với cồn (ethanol 96%) ở nhiệt độ phòng (chiết 3 lần, mỗi lần 4 ngày). Gộp và lọc lấy dịch chiết và cất loại cồn dưới áp suất giảm thu được cao chiết cồn đã cô khô (103 g). Cao chiết này được hòa tan vào nước cất (0,5 lít) thành hỗn dịch rồi lắc, chiết phân đoạn lần lượt với Hx (0,5 lít × 3 lần), EtOAc (0,5 lít × 3 lần), BuOH (0,5 lít × 3 lần). Các dịch chiết Hx, EtOAc và BuOH được tách riêng, cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các phân cao tương ứng: phân đoạn Hx (20 g), phân đoạn EtOAc (35 g) và phân đoạn BuOH (34 g). Cao cô phân đoạn Hx (20 g)

được chạy qua cột sắc ký silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi *n*-hexan/ethyl acetate với tỷ lệ ethyl acetate tăng dần từ 0 đến 100%. Thành phần dịch rửa chiết được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng. Dịch rửa chiết được chia thành 6 phân đoạn chính: PĐ1 (1,3 g); PĐ2 (1,7 g); PĐ3 (2,1g); PĐ4 (0,8 g), PĐ5 (2,6 g) và PĐ6 (1,1 g). Phân đoạn PĐ5 (2,6 g) tiếp tục được phân tách bằng cột silica gel với hệ dung môi rửa chiết *n*-hexan/ethyl acetate (2/1; 1/1; 1/2) thu được hợp chất số GH (125 mg).

Xác định cấu trúc của chất phân lập: xác định công thức cấu tạo của chất phân lập thông qua kết quả phân tích các tính chất lý hóa (cảm quan, nhiệt độ nóng chảy) và các phổ tử ngoại (UV), hồng ngoại (IR), phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, sử dụng chất nội chuẩn là TMS - tetramethyl silan) và so sánh với các dữ liệu đã công bố.

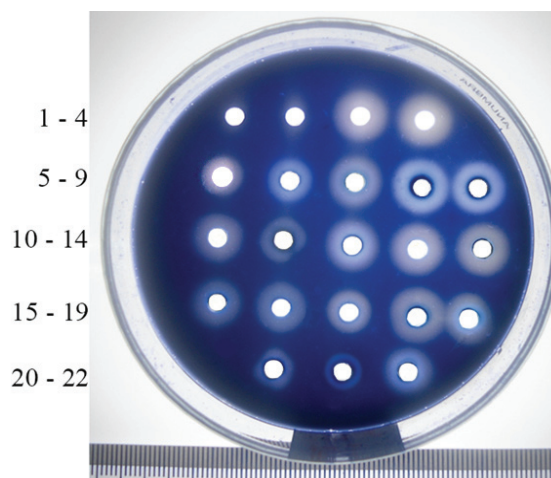
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Điều tra hoạt tính ức chế pepsin của các dịch chiết thực vật

Chúng tôi tiến hành sàng lọc khả năng ức chế pepsin của 136 cao chiết thực vật thuộc 72 loài khác nhau bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có chứa cơ chất hemoglobin. Trong số này có 31 loại dịch chiết cả cây, 29 loại dịch chiết cành lá, 2 loại dịch chiết cành, 13 loại dịch chiết lá, 22 loại dịch chiết thân, 5 loại dịch chiết vỏ thân, 8 loại dịch chiết rễ, 1 loại dịch chiết vỏ rễ, 2 loại dịch chiết củ, 10 loại dịch chiết phần thân trên mặt đất, 1 loại dịch chiết hoa, 4 loại dịch chiết quả, 3 loại dịch chiết

vỏ quả, 1 loại dịch chiết ruột quả và 4 loại dịch chiết hạt. Hoạt tính phân giải cơ chất hemoglobin bởi pepsin thể hiện bằng sự xuất hiện vòng phân giải màu sáng, và hoạt tính ức chế pepsin được thể hiện ở đường kính vòng phân giải bị giảm đi (hình 1). Kết quả tổng hợp ở bảng 1 cho thấy, 40 mẫu dịch chiết thực vật có hoạt tính ức chế pepsin. Trong đó, 5 mẫu dịch chiết thực vật bao gồm: Bơ (hạt), lá Gói hạc (lá), Ma hoàng (cả cây), Ôi (lá) và Thạch châu (lá) có hoạt tính ức chế pepsin mạnh nhất.

Ngoài ra, 14 loại dịch chiết khác (Côm láng, Đơn mặt trời, Đơn tương quân, Long não, Mùi chó, Súng đỏ, Tầm gửi khế, Thạch học, Thôm lôm, Thông tre, Trà hoa Đà Lạt, Trang mẫu đơn, Vây tê tê cuống dài và Viễn chí lá nhỏ) có hoạt tính ức chế pepsin ở mức độ thấp hơn so với 5 cao chiết vừa nêu trên.



Hình 1. Khả năng ức chế pepsin của các cao chiết thực vật

Giếng 1: dung dịch pha pepsin (HCl 0,01 N), giếng 2: DMSO, giếng 3: pepsin (không có chất ức chế), giếng 4: pepsin + dung môi DMSO, giếng 5: pepsin + Pepstatin A (kiểm tra dương); các giếng 6-22: dịch chiết các mẫu thực vật.

Bảng 1. Hoạt tính ức chế pepsin của dịch chiết 40 loài thực vật

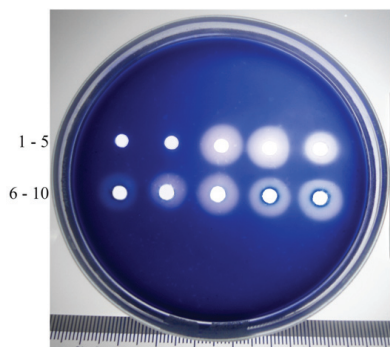
TT	Tên khoa học	Tên thường gọi	Tác dụng*	TT	Tên khoa học	Tên thường gọi	Tác dụng*
1	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack.	Bá bệnh (CL)	+	21	<i>Ammannia baccifera</i> L.	Mùi chó (CC)	++
2	<i>Polygala karenium</i> Kurz.	Bồ bèo trắng (R)	+	22	<i>Kadsura coccinea</i> (Lemaire) A. C. Smith.	Na rừng (T)	+
3	<i>Persea americana</i> Mill.	Bơ (H)	+++	23	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	Nhục đậu khấu (H)	+
4	<i>Areca catechu</i> L.	Cau (H)	+	24	<i>Psidium guajava</i> L.	Ổi (L)	+++
5	<i>Uncaria sinensis</i> (Oliv.) Havil.	Câu đằng (PTMĐ)	+	25	<i>Nymphaea rubra</i> Roxb	Súng đỏ (L), (Ho)	++
6	<i>Uncaria cordata</i> (Lour.) Merr.	Câu đằng lá hình tim (CL)	+	26	<i>Taxillus chinensis</i> (de Cadolle) Danser	Tầm gửi khế (T), (C), (L)	++
7	<i>Sabal palmetto</i>	Cọ (H)	+	27	<i>Taxillus philippensis</i> (Cham. & Schl.) Ban.	Tầm gửi mít (T), (C), (L)	+
8	<i>Elaeocarpus nitidus</i> Jack	Côm láng (VT)	++	28	<i>Pyrenaria jonquieriana</i> Pierre	Thạch châu (L)	+++
9	<i>Tinospora crispa</i> (L.) Miers.	Dây ký ninh (T), (C)	+	29	<i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	Thạch học (T)	++
10	<i>Tinospora sinensis</i> (Lour.) Merr.	Dây đau xương (T)	+	30	<i>Picria fel-terae</i> (Lour.) Merr	Thanh ngâm (PTMĐ)	+
11	<i>Ficus nervosa</i> Heyne ex Roth	Đa búp bè (CL)	+	31	<i>Helicteres hirsuta</i> Lour.	Thâu kén lông (CC)	+
12	<i>Ficus elastica</i> Roxb. Ex Horn	Đa búp đỏ (L)	+	32	<i>Camellia dalatensis</i> Luong.	Trà hoa Đà Lạt (L)	++
13	<i>Excoecaria cochinchinensis</i> Lour.	Đơn mặt trời (CC)	++	33	<i>Ixora coccinea</i> L.	Trang mẫu đơn (CC)	++
14	<i>Syzygium formosum</i> (Wall.) Masam	Đơn tướng quân (CL)	++	34	<i>Polygonum sinense</i> L.	Thò mồm (PTMĐ)	++
15	<i>Leea rubra</i> L.	Gối hạc (L)	+++	35	<i>Lygodium flexuosum</i> (L.) Sw.	Thông bong (bông bong dèo) (CC)	+
16	<i>Coptis teeta</i> Wall.	Hoàng liên (TR)	+	36	<i>Podocarpus neriifolius</i> D. Don	Thông tre (CC)	++
17	<i>Astilbe rivularis</i> Buch.-Ham. ex D. Don	Lạc tân phụ (R)	+	37	<i>Phyllocladus longipes</i> (Craib) Schindl.	Vây tê tê cuồng dài (TL)	++
18	<i>Stephania longa</i> Lour.	Lõi tiền (CL)	+	38	<i>Polygala tenuifolia</i> Willd.	Viễn chí lá nhỏ (T)	++
19	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) Nees & Eberm.	Long não (L)	++	39	<i>Cleistocalyx operculatus</i> (Roxb.) Merr. et Perry.	Vôi (HO)	+
20	<i>Ephedra distachya</i> L.	Ma hoàng (CC)	+++	40	<i>Ficus heterophyllus</i> L.	Vú chó (CL)	+

Ghi chú: (CC): cá cây, (CL): cành lá, (CA): cành, (L): lá, (T): thân, (VT) vỏ thân, (PTMĐ): phần trên mặt đất, (R): rễ, (VR) vỏ rễ, (CU): củ, (HO): hoa, (Q): quả, (VQ): vỏ quả, (RQ): ruột quả, (H): hạt; * Tác dụng thể hiện mức độ ức chế pepsin: (-): không ức chế, (+): có ức chế yếu, (++) : ức chế trung bình, (+++): ức chế mạnh.

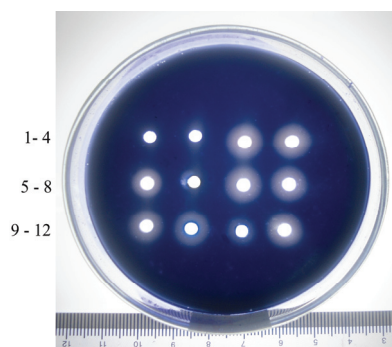
3.2. Khả năng ức chế pepsin và protease HIV-1 của các phân đoạn dịch chiết lá cây Gối hạc

Chúng tôi đã chọn Gối hạc để phân lập chất ức chế enzyme đích. Cao dịch chiết lá Gối hạc được chiết trong các dung môi có độ phân cực

tăng dần để thu riêng các phân đoạn: Hx, EtOAc, và BuOH. Trong đó, cao phân đoạn Hx có hoạt tính ức chế pepsin cao nhất (hình 2, giếng 7) được lựa chọn.



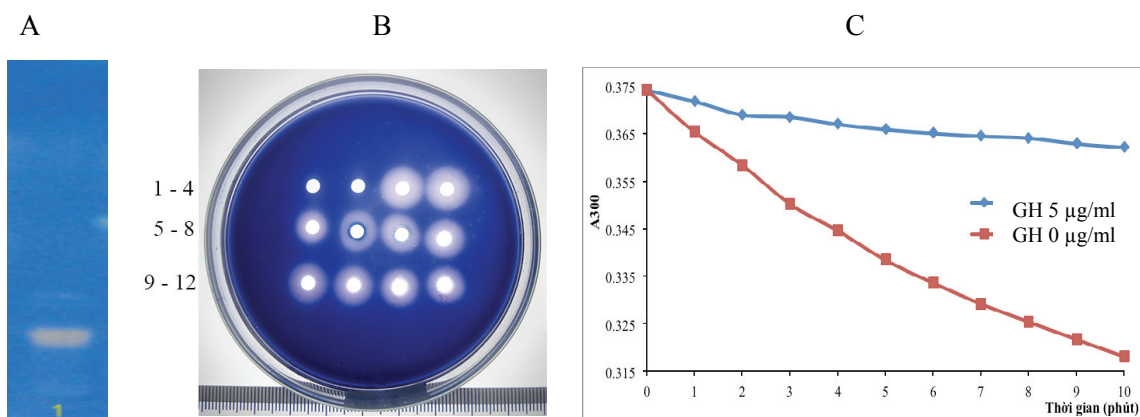
Hình 2. Khả năng ức chế pepsin của các phân đoạn dung môi lá cây Gối hạc. Giếng 1: HCl 0,01 N, giếng 2: DMSO, giếng 3: pepsin, giếng 4: pepsin + DMSO, giếng 5: pepsin + Pepstatin, giếng 6: cao cò, giếng 7 - 10: các phân đoạn cao Hx, EtOAc, BuOH và cao nước



Hình 3. Khả năng ức chế pepsin của các phân đoạn tinh sạch từ cao Hx của cây Gối hạc
Giếng 1: HCl 0,01 N, giếng 2: DMSO, giếng 3: pepsin, giếng 4: pepsin + DMSO, giếng 5: pepsin + Pepstatin, giếng 6: phân đoạn cao Hx, giếng 7-12: phân đoạn PD 1-6.

Cao phân đoạn Hx được chạy qua sắc ký silica gel, rửa giải thu được 6 phân đoạn (1-6), trong đó phân đoạn 5 (PD5) có hoạt tính ức chế pepsin cao nhất (hình 3, giếng 11).

Kết quả khảo sát phân đoạn PD5 bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (silica gel pha thường, hệ dung môi *n*-hexan/ethyl acetate; 1/2) (hình 4A) cho thấy, phân đoạn này có một vết chính ($R_f=0,5$, màu vàng, quan sát UV-365 nm sau khi phun thuốc thử H_2SO_4 10%/ethanol, sấy bản mỏng ở $110^\circ C$ trong 5 phút). Phân đoạn PD5 tiếp tục được phân tách bằng cột silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/ethyl acetate (2/1; 1/1; 1/2) thu được hợp chất GH. Kết quả thử khả năng ức chế của GH cho thấy: GH có hoạt tính ức chế pepsin rõ rệt ở các nồng độ từ 5-50 mg/ml (hình 4B) cũng như ức chế hơn 80% hoạt tính protease HIV-1 tại nồng độ 10 $\mu g/ml$ (hình 4C).



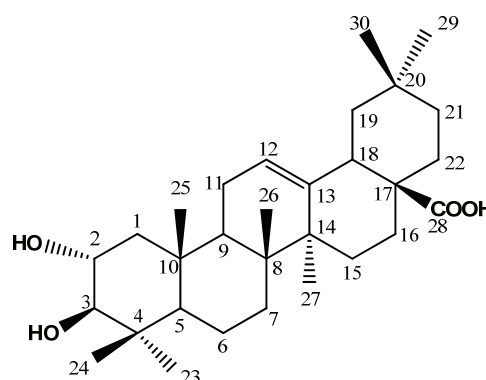
Hình 4. A) Sắc ký đồ SKLM phân đoạn PD5. B) Khả năng ức chế pepsin các phân đoạn tinh sạch từ dịch chiết lá cây gối hạc: Giếng 1: HCl 0,01 N, giếng 2: DMSO, giếng 3: pepsin, giếng 4: pepsin + DMSO, giếng 5: pepsin + Pepstatin A, giếng 6: cao cò, giếng 7: phân đoạn cao Hx, giếng 8: phân đoạn PD5 và giếng 9-12: GH với các nồng độ từ 5 - 10 - 25 - 50 mg/ml. C) Hoạt tính phân cắt cơ chất của protease HIV-1 khi có và không có GH.

3.3. Phân tích cấu trúc và ảnh hưởng của GH đến hoạt tính của pepsin và protease HIV-1

Chất GH1: dạng bột vô định hình, màu trắng, nhiệt độ nóng chảy: 246-248°C. Phổ UV (MeOH) λ_{max} : 201 nm. Phổ IR (cm^{-1}): 3402; 2924; 1659; 1614; 1183; 1093. Phổ ESI-MS (m/z) = 495 $[M+Na]^+$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$; 500 MHz): 5,28 (1H, br s, H-12), 3,64 (1H, m, H-2), 2,95 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-3), 2,83 (1H, m, H-18), 1,15; 1,02; 0,99; 0,94; 0,91; 0,81; 0,80 (tín hiệu 3H, s, H-27; 23; 25; 30; 29; 24; 26). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$; 125 MHz): 46,1 (C-1), 68,2 (C-2), 83,1 (C-3), 38,9 (C-4), 55,0 (C-5), 18,0 (C-6), 33,6 (C-7), 39,0 (C-8), 47,4 (C-9), 37,9 (C-10), 22,7 (C-11), 121,8 (C-12), 143,7 (C-13), 41,5 (C-14), 27,3 (C-15), 22,7 (C-16), 46,0 (C-17), 41,0 (C-18), 45,7 (C-19), 30,3 (C-20), 33,4 (C-21), 32,3 (C-22), 28,2 (C-23), 16,5 (C-24), 16,1 (C-25), 16,3 (C-26), 25,5 (C-27), 180,5 (C-28), 32,7 (C-29), 23,2 (C-30). 3.4.

Phổ IR cho biết trong phân tử hợp chất GH có các nhóm chức OH (đài hấp thụ có đỉnh 3402 cm^{-1}); nhóm C=O (đỉnh 1659 cm^{-1}); liên kết đôi C=C (đỉnh 1614 cm^{-1}); và liên kết C-O (đỉnh $1183, 1093\text{ cm}^{-1}$). Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho biết có một proton olefin có độ chuyển dịch là 5,28 ppm. Ngoài ra còn có 7 tín hiệu proton của của nhóm methyl xuất hiện ở dạng pic đơn ở độ chuyển dịch từ 0,80 ppm đến 1,15 ppm. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của chất số 1 cho biết có tổng cộng 30 tín hiệu cacbon. Có một tín hiệu cacbon C=O tại $\delta_c=180,5$ ppm (nhóm COOH), 2 tín hiệu cacbon có độ chuyển dịch thuộc vùng liên kết đôi lần lượt ở $\delta_c=121,8$ ppm và $\delta_c=143,7$ ppm. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ khẳng định có một liên kết đôi trong phân tử của GH. Như vậy, GH là chất bột màu trắng, có khối lượng phân tử 472, có 30 cacbon, có 7 tín hiệu singlet của proton nhóm CH_3 , một liên kết đôi, có nhóm C=O trong phân tử, hai cacbon bậc ba

sp^3 liên kết với oxy, chất GH được dự đoán là một triterpenoid thuộc khung olean [10]. Nhiệt độ nóng chảy của GH là 246-248°C nên có thể là acid maslinic, phù hợp với dữ kiện phổ khối. Qua so sánh với các dữ liệu phổ đã công bố trước đây [10; 11] khẳng định chất GH1 là acid maslinic $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ ($2\alpha,3\beta$ -dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid).



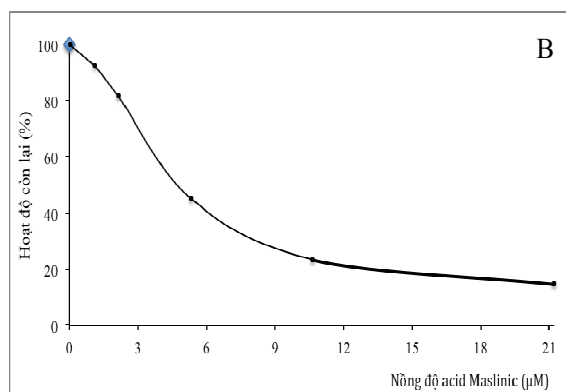
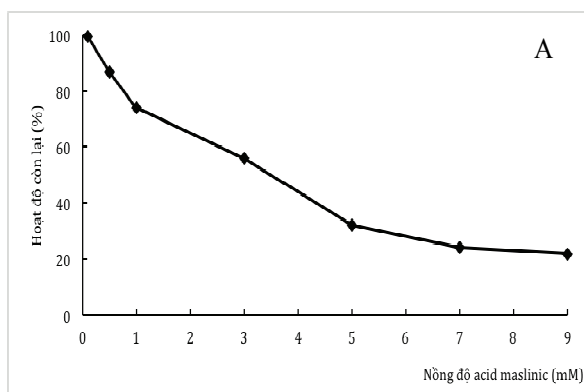
Hình 5. Công thức cấu tạo chất acid maslinic.

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của acid maslinic lên hoạt động của pepsin trong ống nghiệm theo phương pháp Anson cải tiến. Kết quả cho thấy, acid maslinic ức chế pepsin với nồng độ cơ chất tại đó 50% pepsin còn hoạt động (IC_{50}) là 3,2 mM (hình 6A).

Khi sử dụng cơ chất tổng hợp đặc hiệu để phân tích ảnh hưởng của acid này lên hoạt độ của protease HIV-1 cũng cho thấy acid maslinic ức chế mạnh protease HIV-1 với nồng độ IC_{50} là 4,5 μM (hình 6B). Như vậy, acid maslinic đã ức chế protease HIV-1 mạnh hơn gần một ngàn lần so với ức chế pepsin, chứng tỏ chất ức chế này đặc hiệu cao hơn với protease HIV-1. Gần đây, nhóm nghiên cứu (Nguyễn Thị Hồng Loan và Phan Tuấn Nghĩa, 2012) cũng đã phát hiện được một số hợp chất ức chế protease HIV-1 như: 8-hydroxyquinoline, menadione và acid asiatic với nồng độ IC_{50} tương ứng là 104 μM , 114,3 μM và 18,9 μM [12]. Như vậy, các chất này có mức độ ức chế protease HIV-1 yếu hơn đáng kể so với acid maslinic.

Acid maslinic còn được gọi là acid crategolic được phân lập lần đầu tiên năm 1927 từ lá cây Táo gai (*Crataegus oxyacantha*), họ Hoa hồng (Rosaceae) và đến nay đã biết có trong hơn 30 loại thực vật khác nhau như trong quả và dầu cây Ô liu, rau chân vịt, đậu Lăng, quả Lựu... [13]. Gần đây, acid maslinic được biết đến với nhiều tác dụng sinh học và có nhiều tiềm năng trong điều trị bệnh như chống lại quá trình tăng sinh của tế bào ung thư, ức chế enzyme glycogen phosphorylase (GP) xúc tác cho phản ứng đầu tiên phá vỡ glycogen giúp điều trị tiểu đường, chống oxy hoá, kháng viêm, ngăn chặn các bệnh tim mạch, bảo vệ hệ thần kinh và kháng virus... [13]. Khả năng ức chế protease HIV-1 của acid maslinic cùng với một

số acid triterpen khác tinh sạch từ dịch chiết loài thực vật *Geum japonicum*, họ Hoa hồng (Rosaceae) đã được phát hiện từ khá sớm [14]. Trong công trình này, chúng tôi cho biết sự có mặt của acid maslinic từ lá cây Gối hạc với hoạt tính ức chế rất mạnh protease HIV-1. Trong số các acid triterpen đã biết đến, acid maslinic có khả năng ức chế protease HIV-1 mạnh nhất [15]. Điều đáng quan tâm là acid maslinic là thành phần chính của lá gối hạc, một loại cây mọc phổ biến ở Việt Nam [9]. Trong y học dân gian, gối hạc được sử dụng để chữa viêm khớp, sưng tấy, đau người, đau bụng [9]. Các kết quả trong nghiên cứu này gợi ý về khả năng phát triển và sử dụng cây thuốc dân gian Gối hạc và hoạt chất acid maslinic trong điều trị bệnh HIV.



Hình 6. Hoạt tính ức chế của acid maslinic đối với pepsin (A) và protease HIV-1 (B).

4. Kết luận

Qua nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế pepsin của các cao chiết cồn từ 136 loài thực vật cho thấy có 5 cao chiết hạt gồm Bơ (*Persea americana* Mill.), lá Gối hạc (*Leea rubra* L.), thân Ma hoàng (*Ephedra sinica* Stapf.), lá Ổi (*Psidium guajava* L.) và lá Thạch châu (*Pyrenaria jonquieriana* Pierre) ức chế mạnh enzyme này. Từ cao chiết cồn của lá Gối hạc, chúng tôi đã tinh sạch được acid maslinic

($2\alpha,3\beta$ - dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid) có tác dụng ức chế mạnh pepsin và protease HIV-1 với nồng độ IC_{50} tương ứng là 3,2 mM và 4,5 μ M.

Lời cảm ơn

Công trình nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí bởi đề tài Độc lập cấp Nhà nước mã số ĐT-PTNTĐ.2012-G/02.

Tài liệu tham khảo

- [1] UNAIDS in Vietnam from www.unaids.org.vn.
- [2] C. Hoffmann, J.K. Rockstroh, B.S. Kamps, HIV medicine, www. HIV Medicine.com. 2007.
- [3] A.A.A. Rege and A.S. Chowdhary, Evaluation of Ocimum Sanctum and Tinospora Cordifolia as probable HIV-Protease inhibitors, Internationnal Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 25 (2014) 315.
- [4] P.L. Darke, C.T. Leu, L.J. Davis, J.C. Heimbach, R.E. Diehl, W.S. Hill, R.A.F. Dixon and I.S. Siga., Human immunodeficiency virus protease bacterial expression and characterization of the purified aspartic protease, The Journal of Biological Chemistry 264 (1989) 2307.
- [5] D.R. Davies, The structure and function of the aspartic proteinases, Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry 19 (1990) 189.
- [6] A.A.C. Hinay Jr and L.D. Sarol, Screening of Mentha cordifolia Opiz (Yerba Buena) buffer crude extract for aspartyl protease pepsin inhibitory activity, International Journal of Research in Pharmacology and Pharmacotherapeutics 3 (2014) 28.
- [7] A.A.A. Rege, R.Y. Ambaye and A.S. Chowdhary, Effect of Costus Pictus D. Don. on pepsin enzyme. Internationnal Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6 (2014) 6.
- [8] A.D. Richards, L.H. Phylip, W.G. Farmerie, P.E. Scarborough, A. Alvares, B.M. Dunn, H. Hirel, J. Konvalinka, P. Strop, L. Pavlickova, J. Kostla, V. Kay, Sensitive, soluble chromogenic substrates for HIV-1 proteinase, The Journal of Biological Chemistry 265 (1990) 7733.
- [9] N.T. Phuong, V.V. Tuan, P.H. Bach, N.M. Khoi, T.T. Phuong, Triterpenes from the leaves from Leea rubra Blume ex Spreng, Journal of Medicinal Materials 19 (2014) 307.
- [10] N.P. Dam, T.D. Dung, L.H.V. Long, N.K.P. Phung, Four triterpenoids from Hedyotis tenelliflora (Rubiaceae) growing in Viet Nam, Viet nam Journal of Chemistry 48 (2010) 250.
- [11] M. Pal, S.K. Tewari, X.Q. Chen, Q.S. Zhao, Chemical constituents of Viburnum betulifolium, Chemistry of Natural Compounds 49 (2013) 390.
- [12] N.T.H. Loan, P.T. Nghia, Some new inhibitors of protease of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology 28 (2012) 156.
- [13] G. Lozano-Mena, M. Sánchez-Gonzalez, M.E. Juan and J.M. Planas, Molecules 19 (2014) 11538.
- [14] H.X. Xu, F.Q. Zeng, M. Wan and K.Y. Sim, Anti-HIV Triterpene Acids from Geum japonicum, Journal of Natural Products 59 (1996) 643.
- [15] B. Han, Z. Peng, Anti-HIV triterpenoid components, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 6 (2014) 438.

Inhibitory Effect of Plant Extracts on Pepsin and HIV-1 Protease

Nguyễn Văn Dũng¹, Lương Thị Kim Châu¹, Nguyễn Thị Hồng Loan^{1,2},
 Nguyễn Thị Phương³, Phương Thiện Thương³,
 Phan Tuấn Nghĩa^{1,2}, Bùi Phương Thuận^{1,2}

¹Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science

²Faculty of Biology, VNU University of Science, 334, Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

³Department of Analytical Chemistry & Standardization, National Institute of Medicinal Materials

Abstract: Highly active antiretroviral therapy has demonstrated remarkable success in inhibiting HIV viral replication in HIV-infected subjects. This therapy combines three drugs including HIV protease inhibitors. However, HIV can quickly develop resistance to anti-HIV drugs. Hence finding of

new compounds with ability to inhibit HIV protease is one of approaches for HIV/AIDS drug development.

At the beginning, pepsin (an aspartic protease) was used as a substitute for HIV-1 protease to screen 136 plant extracts for their pepsin inhibitory activity by using agar plate diffusion assay using hemoglobin as a substrate. It was found that the extract of *Persea americana* Mill., *Leea rubra* L., *Ephedra distachya* L., *Psidium guajava* L. and *Pyrenaria jonquieriana* Pierre strongly inhibited pepsin. From *Leea rubra* L. leaf extract, a potent inhibitor of pepsin and HIV-1 protease was isolated and purified by thin layer and column chromatography. The compound was identified by nuclear magnetic resonance analysis as maslinic acid (2 α , 3 β -dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid) and it was inhibitory for pepsin and HIV-1 protease with IC₅₀ (50% inhibitory concentration) at 3.2 mM and 4.5 μ M, respectively. This finding was in good agreement with the published data on maslinic activity from other plants.

Keywords: Pepsin, HIV-1 Protease, aspartic protease inhibitor, maslinic acid, *Leea rubra* L.