VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

------***------**

NGUYỄN TRUNG HỢP

"NGHIÊN CỨU TẠO HẠT NANO POLYMER BỌC ALPHA- MANGOSTIN VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG UNG THƯ *IN VITRO* CỦA HẠT TẠO ĐƯỢC''

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC SINH HỌC

***Người hướng dẫn khoa học*: PGS. TS. NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG**

HÀ NỘI - 2017

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận văn khoa học, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, khích lệ và động viên của các Thầy, Cô giáo, các bạn đồng nghiệp, bạn bè và những người thân trong gia đình. Qua đây, tôi xin được gửi lời cảm ơn sâu sắc của mình đến những cá nhân và tập thể đã hết lòng giúp đỡ để tôi có thể hoàn thành bản luận văn này.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Nguyễn Thị Mai Phương, phòng Sinh hóa Thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi có thể tìm hiểu, nâng cao kiến thức trong suốt quá trình học tập, thực hiện nghiên cứu và hoàn thiện bản luận văn này.

Tôi xin cảm ơn Đảng ủy, lãnh đạo, chỉ huy và cán bộ phòng Kỹ thuật hình sự - Công an thành phố Hà Nội đã tạo điều kiện giúp đỡ trong thời gian tôi đi học.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình thân yêu, bạn bè, người thân và đồng nghiệp - những người đã luôn luôn ở bên tôi, luôn động viên, khích lệ và là chỗ dựa vững chắc cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, tháng năm 2017

Học viên

Nguyễn Trung Hợp

CÁC THUẬT NGỮ VIẾT TẮT

AMG	Alpha – magostin
DLS	Dynamic light scattering
EPS	Exopolysaccharide
FESEM	Field emission scanning electron microscopy
HPLC	High performance liquid chromatography
NMG	Nanomagostin
NMR	Nuclear magnetic resonance
TLC	Thin layer chromatography
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's media
FBS	Fetal Bovine Serum

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU 8

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 9
1.1. Bệnh học ung thư 9
1.1.1. Các giai đoạn phát triển của bệnh ung thư 10
1.1.2. Nguyên nhân gây ung thư 11
1.1.3. Các liệu pháp điều trị ung thư 11
1.1.4. Tình hình bệnh ung thư trên thế giới và Việt Nam 13
1.2. Công nghệ nano và ứng dụng 15
1.2.1. Hệ dẫn thuốc cấu trúc nano 16
1.2.2. Đặc điểm của hạt nano 17
1.2.3. Nghiên cứu về vật liệu nano phục vụ y học tại Viêt Nam 18
1.3. Khái quát về β-cyclodextrin 19
1.3.1 Cấu trúc của β-cyclodextrin 19
1.3.2 Tính chất của β-cyclodextrin 20
1.3.3 Ứng dụng của β-cyclodextrin 22
1.4. Alpha-mangostin, chất kháng ung thư tiềm năng từ vỏ quả măng cụt (Garcinia mangostana L.) 23
1.4.1. Đặc điểm sinh học 23
1.4.2. Các chất xathone trong măng cụt 24
1.4.3. Tác dụng sinh học của các chất xanthone trong cây măng cụt 25
1.4.4. Alpha- mangostin từ vỏ của quả măng cụt (Garcinia mangostana L) 27
1.5. Ý tưởng nghiên cứu của đề tài 28
Chương 2: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP 29
2.1. Dòng tế bào ung thư và các điều kiện nuôi 29
2.2. Nguyên liệu thực vật 30
2.3. Hóa chất, thiết bị. 30
2.3.1. Hóa chất 30
2.3.2. Thiết bị 30
2.4. Phương pháp nghiên cứu 31

2.4.1. Tinh sạch AMG từ vỏ quả măng cụt 31
2.4.2. Tạo hạt nano polyme micelle bọc AMG (nanomangostin) và đánh giá các đặc trưng của hạt 32
2.5. Hoạt tính gây độc lên dòng tế bào ung thư phổi A549 33
2.6. Đánh giá sự thâm nhập của hạt NMG vào tế bào 34
2.7. Đánh giá ảnh hưởng của NMG đến kích thước nhân tế bào 34
2.8. Xử lý thống kê 34
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 34
3.1. Nghiên cứu quy trình tinh sạch AMG từ vỏ quả măng cụt 34
3.1.1. Tách chiết phân đoạn có chứa AMG từ vỏ quả măng cụt 34
3.1.2. Tinh sạch AMG từ vỏ quả măng cụt 37
3.2. Chế tạo hạt nano polymer bọc mangostin (nanomangostin)-NMG 46
3.2.1. Tổng hợp hạt NMG 46
3.2.2. Tối ưu hóa các thông số tạo hạt NMG 48
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ 56
KẾT LUẬN 56
ĐỀ NGHỊ 57
TÀI LIỆU THAM KHẢO 57
Tài liệu tiếng Việt 57
Tài liệu tiếng Anh 58
Nguồn trích dẫn URL 61
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ 62
PHỤ LỤC 64

DANH MỤC CÁC BẢNG SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN

Bảng	Trang
Bảng 1.1. Công thức hóa học một số xanthone có trong vỏ quả măng cụt	24
Bảng 3.1. Độ sạch của chế phẩm α-mangostine so với chất chuẩn	41
Bảng 3.2. Số liệu phân tích phổ ^{1}H và ^{13}C của AMG đã tinh sạch	43
Bảng 3.3. Đánh giá hiệu quả mang AMG của các chất nghiên cứu	48
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của tỉ lệ trộn của chất mang β - cyclodextrin và AMG lên các thông số hạt	49

DANH MỤC CÁC HÌNH SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN

Hình	Trang
Hình 1.1. Các ưu điểm của hệ dẫn thuốc nano	15
Hình 1.2. Các yếu tố ảnh hưởng tới hệ dẫn thuốc	16
Hình 1.3. Hình minh họa cấu trúc các loại nano dẫn thuốc	17
Hình 1.4. Hình ảnh minh họa cấu trúc phân tử β-cyclodextrin	19
Hình 1.5. Quả măng cụt	23
Hình 1.6. Công thức cấu tạo alpha – mangostin	27
Hình 3.1. Sắc ký đồ phân đoạn chiết vỏ quả măng cụt trong ethanol và n-hexane sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng	37
Hình 3.2. Sắc ký đồ phân đoạn n-hexane sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng	38
Hình 3.3. Sắc ký cột silica gel phân đoạn chiết n-hexane của vỏ quả măng cụt với hệ dung môi rửa chiết n-hexane: acetone theo tỉ lệ (3:1)	39
Hình 3.4 A. Sắc ký đồ AMG tinh sạch từ vỏ quả măng cụt với hệ dung môi hexane: acetone (3:1 v/v).	40
Hình 3.4 B. Sắc ký đồ AMG tinh sạch từ vỏ quả măng cụt với hệ dung môi TEAF (5:3:1:1 v/v)	40
Hình 3.5. Sắc ký đồ HPLC của chất tinh sạch sau khi qua các cột sắc ký silicagel đo trên máy Hitachi – DAD L2455	40

Hình 3.6. Phổ Proton (A) và ^{13}C (B) của chất AMG đo trên máy NMR Bruker, Avance 500	42
Hình 3.7. Phổ MS của chất AMG đo trên máy LC-MS, Avance 500	44
Hình 3.8. Cấu trúc hóa học của AMG ($C_{24}H_{26}O_6$).	44
Hình 3.9. Sơ đồ qui trình tinh sạch AMG từ vỏ quả măng cụt	45
Hình 3.10. Dung dịch NMG thu được sử dụng chất mang β-cyclodextrin	49
Hình 3.11. Kích thước hạt NMG đo trên máy DLS	50
Hình 3.12 A. Ảnh chụp FE-SEM hạt NMG	50
Hình 3.12 B. Ảnh chụp kính hiển vi đồng tụ quét laser hạt NMG	50
Hình 3.13. Thế zeta của hạt nanomangostin đo trên máy DLS 3.3	51
Hình 3.14. Hoạt tính gây độc tế bào của NMG tan trong nước lên dòng tế bào ung thư A549	52
Hình 3.15. Khả năng xâm nhập của NMG vào tế bào ung thư phổi (A). (B). (C)	53
Hình 3.16. Hình thái nhân tế bào khi xử lý với AMG và NMG	54

MỞ ĐẦU

Theo thống kê của Bộ Y tế, hàng năm, Việt Nam có khoảng 150.000 - 200.000 người mắc bệnh ung thư mới và khoảng 75.000 - 100.000 người tử vong vì căn bệnh này. Công bố của tổ chức Y tế thế giới (WHO) 4/2014 cho thấy Việt Nam thuộc thuộc nhóm thứ hai các quốc gia dẫn đầu về tỉ lệ mắc bệnh này. Phần lớn các bệnh nhân ung thư ở Việt Nam (khoảng 70%) chỉ đến bệnh viện điều trị khi đã quá muộn, khiến cho cơ hội chữa khỏi bệnh rất thấp. Theo thống kê, tỷ lệ chữa khỏi bệnh ung thư ở Việt Nam là 35%. Ung thư đang là nguyên nhân thứ hai gây tử vong ở Việt Nam và thực sự là mối quan tâm của cả quốc gia.

Hiện nay, các loại thuốc điều trị ung thư thường không mang lại hiệu quả mong muốn do một số nguyên nhân như tính hướng đích đặc hiệu chưa cao và hiệu quả thâm nhập khối u kém vì khả năng hòa tan của thuốc thấp. Đặc biệt, những thuốc tự nhiên đang được sử dụng hiện nay trong điều trị ung thư như paclitaxel, doxorubixin, curcumin, có tính tan rất kém (ví dụ curcumin chỉ đạt 0,001%), vì thế khả năng xâm nhập khối u cũng như điều trị bệnh rất hạn chế.

Ứng dụng công nghệ nano vào y học bằng cách dùng các dạng vật liệu ở kích thước nano để tương tác với yếu tố sinh học ở mức tế bào hay xuống thấp hơn nữa ở cấp phân tử, ví dụ dẫn thuốc đến các tế bào bệnh và chẩn đoán bệnh ở mức phân tử đã được chứng minh là tăng tính sinh khả dụng, hướng đích, giảm liều dùng nhờ khả năng bảo vệ dược chất và giảm thải trừ thuốc trong cơ thể.

Măng cụt (*Garcinia mangostana* L) là thực vật được trồng phổ biến ở các nước Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam. Vỏ quả chứa hàm lượng lớn các chất xanthone (có thể đạt đến 0,2%), là những chất thuộc nhóm phenol, có nhiều đặc tính sinh học quí. Alpha-mangostin (AMG) là một dẫn xuất xanthone tự nhiên phổ biến nhất ở vỏ quả măng cụt. Chất này đã được chứng

minh là có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm và ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư rất cao. Phân tích *in vitro* cũng khẳng định chất này ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư ruột HT-29 với IC_{50} khoảng 6–12 μM đồng thời làm giảm sự biểu hiện của BcL-2 DNA β-catenin. AMG cảm ứng apoptosis ở các tế bào ung thư đã được nhiều nghiên cứu khẳng định. AMG đưa vào cơ thể theo đường uống cũng làm giảm sự phát triển của khối u ở chuột. Các nghiên cứu gần đây của Nguyen và cộng sự [20] cho thấy AMG có khả năng ức chế có hiệu quả sự hình thành biofilm của vi khuẩn gây sâu răng ở người là *Streptococcus mutans*. Ngoài ra, AMG còn có tác dụng ức chế hoạt tính enzyme HIV-1 protease với nồng độ IC_{50} là khoảng 5,1 μM. Vì thế, việc nghiên cứu và ứng dụng chất này đã và đang thu hút sự quan tâm của rất nhiều nhà khoa học trong suốt hơn một thập kỷ qua. Tuy nhiên, cũng giống như curcumin và paclitaxel, khả năng hòa tan chất này trong nước rất thấp (chỉ đạt 0,0002%), do đó đã hạn chế lớn hoạt tính sinh học của nó. Cho đến nay, ngoài việc nghiên cứu tổng hợp những dẫn suất mới của nó để tăng cường tính tan và hiệu quả tác dụng thì cũng đã bắt đầu xuất hiện một số nghiên cứu trên thế giới về việc nâng cao tính tan của AMG sử dụng phương pháp tạo hạt nano (nanomangostin) để xử lý các bệnh liên quan đến ung thư. Các kết quả thu được là rất khả quan nhưng vẫn cần phải có những nghiên cứu tiếp tục đi sâu hơn nữa nhằm tạo được hệ hạt tối ưu, có tính sinh, khả dụng cao, có khả năng ứng dụng thực tiễn.

Đề tài luận văn này nhằm tạo hạt nano polymer bọc mangostin (nanomangostin) để làm tăng tính tan và sinh khả dụng của chất AMG, tạo cơ sở để ứng dụng chúng trong xử lý các bệnh ung thư.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Bệnh học ung thư