

# Khả năng ức chế enzyme collagenase của dẫn xuất N-(cinnamyl) chitooligosaccharide

Lê Minh Xuân, Nguyễn Duy Khánh, Trần Đăng Khoa, Trần Quốc Tuấn, Ngô Đại Nghiệp

**Tóm tắt**—Chitooligosaccharide (COS) với trọng lượng phân tử 4633 Da và độ deacetyl hóa đạt 84,67% được tạo ra từ quá trình thủy phân chitosan bằng cellulase ở nhiệt độ phòng ( $33 \pm 1^\circ\text{C}$ ). COS này, sau đó, được biến đổi hóa học bằng cách gắn cinnamaldehyde vào các nhóm amino trên phân tử COS. Dẫn xuất N-(cinnamyl) chitooligosaccharide (CCOS) tổng hợp được với hiệu suất 50,64% và độ thay thế đạt 72,22% có hoạt tính ức chế enzyme collagenase (một nhóm trong họ matrix metalloproteinase-họ enzyme liên quan đến khả năng di căn của ung thư). So với đối chứng dương, hiệu quả ức chế collagenase của CCOS là 58,23% ở nồng độ 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Ngoài ra, khả năng gây độc của CCOS cũng được đánh giá thông qua phương pháp MTT (MTT-muối tetrazolium), kết quả cho thấy, dẫn xuất không gây độc đối với tế bào động vật (dòng tế bào HT1080 được sử dụng trong nghiên cứu này) và như vậy có thể thử nghiệm và ứng dụng trên các hệ thống sống.

**Từ khóa**—chitooligosaccharide (COS), N-aryl COS, collagenase, ức chế enzyme, chitosan

*Bài báo đã nhận vào ngày 15 tháng 3 năm 2017, đã được phân biên chỉnh sửa vào ngày 01 tháng 11 năm 2017.*

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.02-2014.87.

Lê Minh Xuân, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường ĐHKHTN, ĐHQG-HCM.

Nguyễn Duy Khánh, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường ĐHKHTN, ĐHQG-HCM (Đồng tác giả thứ nhất).

Trần Đăng Khoa, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường ĐHKHTN, ĐHQG-HCM.

Trần Quốc Tuấn, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường ĐHKHTN, ĐHQG Tp.HCM.

Ngô Đại Nghiệp, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học và Phòng thí nghiệm Công nghệ Enzyme, Trường ĐHKHTN, ĐHQG-HCM. (email: ndnghep@hcmus.edu.vn)

## 1 MỞ ĐẦU

Các bệnh về ung thư từ rất lâu đã trở thành gánh nặng cho toàn xã hội. Không chỉ các nước kém phát triển, các nước phát triển cũng phải chịu nhiều hệ lụy liên quan đến ung thư. Tình hình gia tăng các bệnh về ung thư hiện nay diễn ra ngày càng phức tạp và khó kiểm soát [1]. Khả năng di căn của các tế bào ung thư trong khối u chính là nguyên nhân chủ yếu dẫn đến tử vong cho bệnh nhân ung thư. Sự di căn xâm lấn này có liên quan đến họ enzyme matrix metalloproteinase (MMP) có khả năng phân hủy chất nền ngoại bào (ECM) giúp tế bào ung thư di chuyển dễ dàng ra khỏi vị trí ban đầu. Việc tạo ra các hợp chất có khả năng tác động lên hoạt tính của họ enzyme MMP đang được quan tâm khá nhiều [2 – 4, 22, 27].

Chitosan là một polymer sinh học không độc tính, khả năng tương thích và phân hủy sinh học cao, mang nhiều hoạt tính có tiềm năng ứng dụng cao như kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm, ức chế một số loại enzyme...[5]. Bên cạnh đó, chitooligosaccharide (COS)-sản phẩm thủy phân không hoàn toàn của chitosan, khắc phục được tính khó tan trong nước đồng thời vẫn giữ được các đặc tính ưu việt của chitosan [6]. Các dẫn xuất gắn thêm nhóm chức năng vào chitosan và COS cũng được nghiên cứu rộng rãi để gia tăng các hoạt tính sẵn có của nó [5, 7, 8].

Các nghiên cứu hiện nay chủ yếu đánh giá về khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm của dẫn xuất. Các nghiên cứu về hoạt tính ức chế enzyme của dẫn xuất còn rất hạn chế, ít hoặc chưa được công bố [9 - 15]. Do đó, cải biến COS bằng cách gắn thêm các hợp chất có vòng thơm được thực hiện trong nghiên cứu này với mục đích tạo ra các dẫn xuất có khả năng tác động lên collagenase (một nhóm quan trọng trong họ MMP), góp phần ngăn chặn sự di căn xâm lấn của ung thư.

## 2 VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu

Chitosan được phân phối bởi công ty ChitoWorld, khu công nghiệp Tân Tạo, Tp. HCM, độ deactyl hóa trên 70%. Cellulase thương mại từ công ty Novozyme. Cinnamaldehyde từ công ty Sigma (Mỹ). Collagenase và collagen type II từ công ty Sigma (Mỹ). Dòng tế bào HT1080 từ ATCC (American Type Culture Collection Manassas VA. USA).

### 2.2 Phương pháp chuẩn bị COS

Các điều kiện thủy phân chitosan bằng cellulase được khảo sát dựa trên phương pháp xác định hoạt độ cellulase thông qua hàm lượng đường khử sinh ra bằng thuốc thử 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) [15, 16]. Sử dụng các điều kiện nhiệt độ, độ pha loãng enzyme, pH, thời gian thủy phân thích hợp đã khảo sát để tạo COS có trọng lượng phân tử (TLPT) trung bình từ 1000-5000 Da. TLPT trung bình được xác định bằng phương pháp đo độ nhớt sử dụng nhớt kế mao quản [17-19] và phương pháp sắc ký thẩm thấu gel (GPC) [20]. Độ deacetyl hóa của COS sau thủy phân được xác định bằng phương pháp phân tích phổ  $^1\text{H-NMR}$ , công thức tính độ deacetyl hóa theo Thatte như sau [5]:

$$DA = \left( 1 - \frac{5.H_{Ac}}{3.H_{3-6/6'}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

Trong đó, DA là độ deacetyl hóa (%);  $H_{Ac}$  là cường độ tín hiệu của các proton thuộc nhóm acetyl;  $H_{3-6/6'}$  là cường độ tín hiệu của các proton ở vị trí C-3, C-4, C-5, C-6, C-6' [5].

### 2.3 Phương pháp tổng hợp dẫn xuất N-(cinnamyl) COS

Cho dung dịch COS phản ứng với aldehyde có vòng thơm trong môi trường acid yếu, nhóm  $-\text{NH}_2$  ở vị trí C-2 của đơn phân D-Glucosamine phản ứng với nhóm  $-\text{CHO}$  của aldehyde tạo thành dạng base Schiff có chứa liên kết đôi  $\text{C}=\text{N}$ . Dạng base Schiff sau đó tiếp tục được khử bằng  $\text{NaBH}_4$  để tạo thành dẫn xuất N-(aryl) COS. Tóm tắt quy trình: Thêm từ từ 2 ml cinnamaldehyde cần tạo dẫn xuất vào 100 ml dung dịch COS sau thủy phân. Khuấy nhẹ, liên tục bằng máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Sau 12 giờ, thêm 0,1 g  $\text{NaBH}_4$  làm tác nhân khử dạng base Schiff. Tiếp tục khuấy thêm 12 giờ nữa. Dùng  $\text{NaOH}$  15% (w/v) điều chỉnh hỗn hợp sau phản ứng về pH 7. Ly tâm loại bỏ dịch sau phản ứng. Thẩm tách loại

muối acetate bằng màng 1 kDa. Ly tâm loại bỏ dịch sau thẩm tách. Rửa dẫn xuất nhiều lần bằng diethyl ether để loại các tạp chất. Thu lấy sản phẩm đem đi sấy khô ở  $50^\circ\text{C}$ , xác định khối lượng dẫn xuất thu được [15, 16].

### 2.4 Phương pháp đánh giá hiệu quả tạo dẫn xuất

Hiệu suất tạo dẫn xuất là tỉ lệ phần trăm khối lượng dẫn xuất thu được khi sấy khô ở  $50^\circ\text{C}$  so với tổng khối lượng COS đem đi tổng hợp và chất gắn.

Phương pháp Ninhydrin dùng để xác định nhóm amin tự do. Giá trị OD ở bước sóng 570 nm tỉ lệ thuận với số nhóm amin cho phản ứng màu với thuốc thử Ninhydrin. Độ thay thế (ES) của dẫn xuất được xác định thông qua hàm lượng nhóm  $-\text{NH}_2$  tự do của COS ban đầu và  $-\text{NH}_2$  còn lại sau khi tham gia phản ứng tổng hợp dẫn xuất [21].

Ngoài ra, độ thay thế của dẫn xuất cũng được xác định bằng phổ  $^1\text{H-NMR}$ . Dẫn xuất sau khi tổng hợp được mang đi phân tích phổ tại Phòng thí nghiệm Phân tích trung tâm, Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh. Đối với các dẫn xuất N-(aryl) COS, căn cứ trên cường độ tín hiệu của proton ở vị trí C-2 so với cường độ tín hiệu của các proton trên aldehyde thơm có thể xác định được độ thay thế của phản ứng tạo dẫn xuất, tác giả Mrunal R. Thatte đã đưa ra công thức tính ES như sau [5]:

$$ES = \left( \frac{N_{C-2} \cdot A_{aro}}{N_{aro} \cdot A_{C-2}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

Trong đó, ES là độ thay thế (%);  $N_{C-2}$  là số lượng proton còn lại ở vị trí C-2 trên một phân tử đường;  $N_{aro}$  là số lượng proton còn lại của nhân thơm trên một phân tử đường;  $A_{C-2}$  là cường độ tín hiệu của proton ở vị trí C-2;  $A_{aro}$  là cường độ tín hiệu proton của nhân thơm [5].

### 2.5 Phương pháp khảo sát hoạt tính ức chế enzyme collagenase của dẫn xuất

Chuẩn bị COS và dẫn xuất với dãy các nồng độ 10 – 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Collagenase từ *Clostridium histolyticum* (một dạng MMP được sử dụng trong thử nghiệm này) (20  $\mu\text{l}$ ) được xử lý với 20  $\mu\text{l}$  COS hoặc dẫn xuất trong 60  $\mu\text{l}$  dung dịch đệm (50 mM Tris base, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.15 M NaCl, pH 7,8). Ủ ở  $37^\circ\text{C}$  trong 1 giờ. Agarose (0,75%) trong đệm Tris pH 7,8 có 0,15% cơ chất collagen type II. Đổ agarose vào đĩa petri, để đông đặc ở nhiệt độ phòng. Đục các lỗ có đường kính 2 mm trên bề mặt gel, bơm 5  $\mu\text{l}$  các dung dịch enzyme đã xử lý

vào các lỗ. Ủ ở 37°C trong 18 giờ. Nhuộm bản gel với Coomassie Brilliant Blue 0,25% trong 30 phút. Rửa nhuộm bằng dung dịch gồm 25% methanol và 10% acid acetic. Mẫu đối chứng: mẫu không có enzyme (đối chứng âm), mẫu thay dẫn xuất bằng EDTA (đối chứng dương), mẫu không có COS và dẫn xuất (đối chứng dương) [22].

2.6 Phương pháp xác định khả năng gây độc của dẫn xuất lên tế bào

Tế bào được nuôi trên đĩa 96 giếng đến khi đạt mật độ khoảng  $5 \times 10^3$  tế bào/giếng (khoảng 80% bề mặt đĩa nuôi). Sau 24 giờ nuôi cấy, tế bào được rửa bằng môi trường mới và tiếp tục nuôi cấy trong môi trường mới chứa dẫn xuất ở những nồng độ khác nhau (1 ppm – 1000 ppm) trong 48 giờ tiếp theo. Sau đó, tế bào được rửa lại với môi trường mới, thêm 50 µl MTT 1X và ủ tiếp trong 4 giờ. Sau 4 giờ, thêm 200 µl DMSO để hòa tan muối formazan. Lượng muối formazan được xác định bằng việc đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm bằng máy Microplate Reader (Perkin Elmer). Mức độ gây độc của chất thử nghiệm hay khả năng sống sót của tế bào được tính toán và so sánh với nhóm không xử lý (blank). Xác định phần trăm sống sót của tế bào S (%) được tính theo công thức như sau:

$$S = \left( \frac{OD_x}{OD_{blank}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Trong đó,  $OD_x$  là độ hấp thụ của mẫu tế bào được xử lý với chất thử nghiệm;  $OD_{blank}$  là độ hấp thụ của mẫu blank [15, 23].

2.7 Xử lý số liệu

Các nghiệm thức được lặp lại ít nhất 3 lần. Hình ảnh được xử lý bằng phần mềm GelAnalyzer 2010. Các số liệu được xử lý thống kê mô tả bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2013, được trình bày dưới dạng: Giá trị trung bình ± SD (standard deviation).

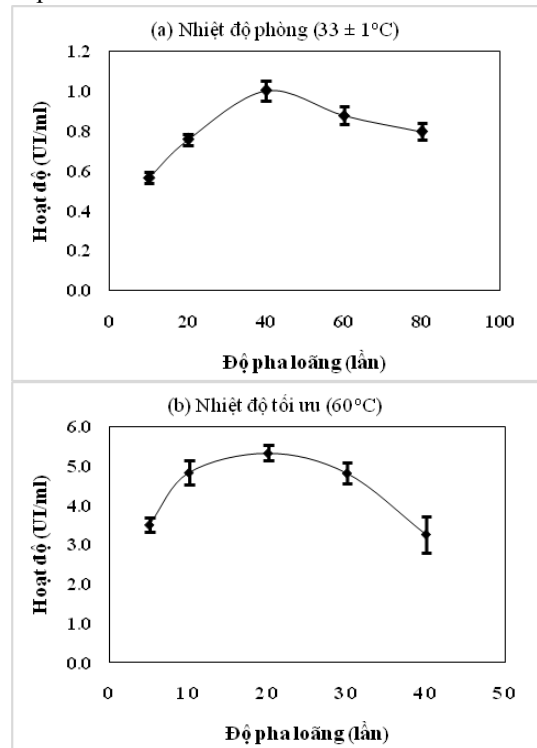
3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1 Các điều kiện thích hợp để thủy phân chitosan bằng cellulase

Để thu nhận nhiều sản phẩm COS hơn so với các nghiên cứu trước đây thực hiện trên chitosan 1% (w/v) [16], chitosan 2% được chọn làm cơ chất ban đầu để tiến hành phản ứng trong nghiên cứu này. Đồng thời, nghiên cứu này còn hướng đến việc đưa quy trình sản xuất COS lên quy mô công nghiệp, như vậy, để giảm chi phí trong việc

cung cấp năng lượng cho quá trình phản ứng, các điều kiện được khảo sát ở nhiệt độ phòng ( $33 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

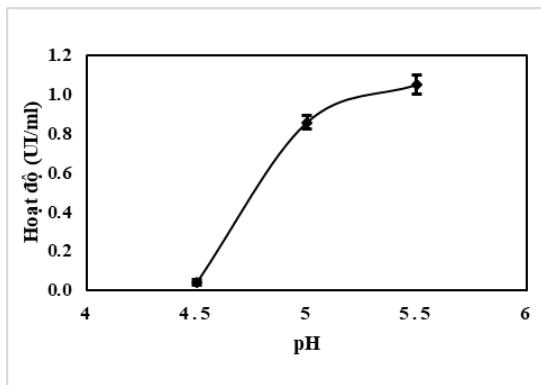
Trong khảo sát để xác định độ pha loãng enzyme phù hợp, vì chưa có công bố nào về việc thủy phân chitosan ở nhiệt độ phòng nên khảo sát này được lặp lại ở điều kiện nhiệt độ tối ưu của cellulase để đánh giá mức độ chênh lệch hoạt tính giữa hai điều kiện nhiệt độ. Kết quả cho thấy, ở nhiệt độ phòng, enzyme pha loãng 40 lần cho hoạt độ cao nhất (1,001 UI/ml) (hình 1a). Ở nhiệt độ tối ưu, độ pha loãng 20 lần cho hoạt độ cao nhất (5,331 UI/ml) (hình 1b). Như vậy, hoạt tính enzyme thực hiện ở nhiệt độ phòng chỉ giảm 5,3 lần so với ở điều kiện nhiệt độ tối ưu. Độ pha loãng 40 lần được chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.



Hình 1. Đồ thị biểu diễn sự biến thiên của hoạt độ theo độ pha loãng enzyme ở (a) nhiệt độ phòng, (b) nhiệt độ tối ưu

Theo nghiên cứu của Coral, cellulase từ *Aspergillus niger* hoạt động ở điều kiện pH từ 4,5 – 7,0 và nhiệt độ từ 50 – 60°C [24]. Thêm vào đó, chitosan với nồng độ 2% cần lượng acid acetic nhiều hơn để hòa tan hoàn toàn, cho nên, thể tích dung dịch muối acetate dùng để điều chỉnh pH bị giới hạn để sao cho dung dịch chitosan sau khi chỉnh pH đạt nồng độ 2%, chính vì thế mà pH không thể cao hơn 5,5. Vì những lý do trên, khảo sát chỉ thực hiện ở pH trong khoảng từ 4,5 – 5,5.

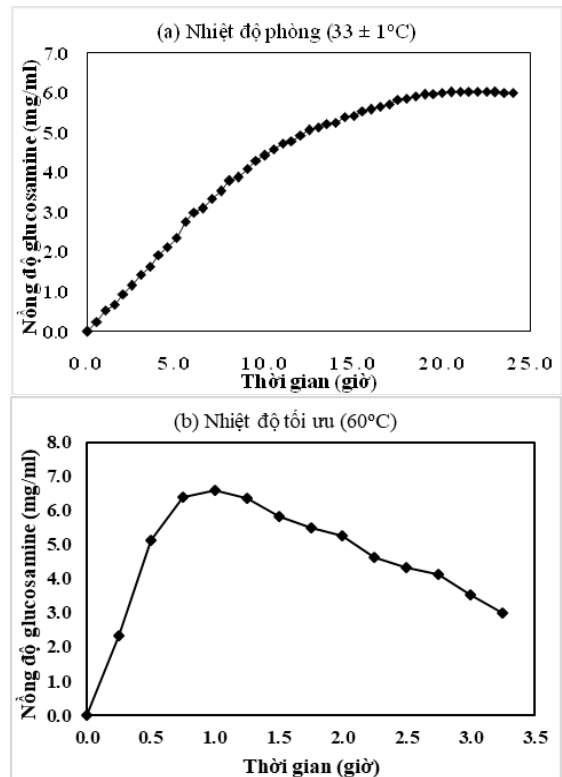
Kết quả cho thấy, hoạt độ enzyme cao nhất (1,051 UI/ml) khi thủy phân trong môi trường có pH 5,5 (hình 2). Như vậy, pH 5,5 được chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.



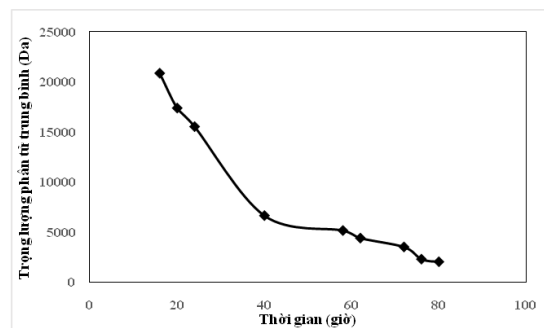
Hình 2. Đồ thị biểu diễn sự biến thiên của hoạt độ theo pH

Tiến hành thủy phân chitosan bằng cellulase ở pH và độ pha loãng thích hợp đã xác định ở các khảo sát trước đó. Đo lượng đường khử tạo thành bằng phương pháp DNS sau mỗi khoảng thời gian 30 phút. Kết quả được trình bày ở hình 3a. Ở giai đoạn đầu của phản ứng, lượng đường khử tạo thành tăng nhanh và đạt cực đại ở thời gian khoảng 20 giờ. Sau mốc thời gian 20 giờ, lượng đường khử sinh ra không tăng nữa mà có xu hướng giảm xuống, tuy nhiên không nhận thấy rõ sự giảm này. So sánh với kết quả khảo sát thời gian ở nhiệt độ tối ưu của enzyme được trình bày ở hình 3b, rõ ràng, nồng độ đường khử giảm một cách đáng kể theo thời gian. Theo Jia và cộng sự thì lượng đường khử glucosamine sinh ra trong quá trình thủy phân sẽ tự ngưng kết (self-condensation) với nhau khi có mặt của sodium hydroxide (trong thuốc thử DNS) tạo thành các hợp chất pyrazine không còn tính khử, vì vậy phương pháp DNS không thể đo được đường khử ở dạng đơn phân glucosamine [25].

Trong nghiên cứu này, phân đoạn 1000 – 5000 Dalton được hướng đến, cần xác định thời gian thủy phân thích hợp để thu được phân đoạn mục tiêu. Thông qua phương pháp xác định độ nhớt cấu trúc có thể tính được TLPT trung bình của COS. Kết quả trình bày ở hình 4 cho thấy độ nhớt thực hay TLPT trung bình của dung dịch sau thủy phân giảm dần theo thời gian. Từ 62 giờ trở đi, TLPT trung bình nằm trong khoảng 1000 – 5000 Da. Để tránh sai số từ phương pháp đo độ nhớt, 72 giờ chọn làm điều kiện thời gian thích hợp thủy phân chitosan tạo dung dịch COS chứa phân đoạn mục tiêu.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự biến thiên của hoạt độ theo thời gian ở nhiệt độ phòng (a), Đồ thị biểu diễn sự biến thiên của hoạt độ theo thời gian ở nhiệt độ tối ưu (b).

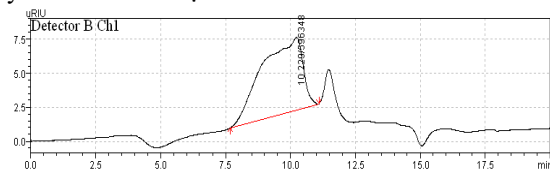


Hình 4. Đồ thị biểu diễn sự biến thiên trọng lượng phân tử trung bình của dung dịch thủy phân theo thời gian

### 3.2 Thu nhận dung dịch COS

Sau khi khảo sát và xác định được tất cả các điều kiện thích hợp để tạo dung dịch COS, chúng tôi tiến hành lặp lại thí nghiệm thủy phân. Sau 72 giờ thủy phân, dung dịch COS được kiểm tra TLPT trung bình bằng phương pháp đo độ nhớt cho kết quả đạt  $4,938 \pm 0,027$  kDa. Sau đó được mang đi phân tích phổ GPC tại Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ bức xạ – phường Linh Xuân, quận Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh. Kết quả được trình bày trên hình 5, TLPT trung bình của mẫu COS là 4633 Da, so với phương pháp đo

độ nhớt cấu trúc, kết quả này không chênh lệch đáng kể và nằm trong khoảng 1000 – 5000 Da, đạt yêu cầu so với mục tiêu đề ra.

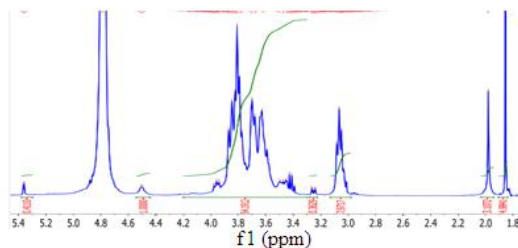


Hình 5. Kết quả phổ GPC của phân đoạn COS sau khi thủy phân 72 giờ

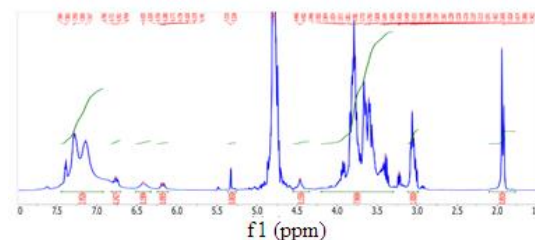
Độ deacetyl hóa (DA) là một thông số rất quan trọng, nó ảnh hưởng rất nhiều đến hoạt tính của COS và dẫn xuất [5, 8]. Kết quả phổ  $^1\text{H-NMR}$  của COS 4633 Da được trình bày trong hình 6. Tín hiệu cộng hưởng tại  $\delta = 1,85$  ppm tương ứng với H của gốc methyl thuộc nhóm acetamido trên monomer acetylate của COS (H-Ac). Tín hiệu cộng hưởng tại  $\delta = 1,98$  ppm tương ứng với H của nhóm methyl có nguồn gốc từ các phân tử acetic acid chưa được deuteri hóa và từ dung môi trong quá trình thủy phân còn sót lại. Tín hiệu cộng hưởng quan sát được trong khoảng từ 3,13 – 2,98 ppm tương ứng với H liên kết với C-2 của vòng glucosamine. Tín hiệu cộng hưởng nằm trong khoảng từ 4,20 – 3,30 ppm tương ứng với các H liên kết với nguyên tử carbon C-3, C-4, C-5, C-6 của glucopyranose. Tín hiệu cộng hưởng nằm trong khoảng từ 5,38 – 5,34 ppm ứng với H liên kết với C-1 của monomer deacetylate (H1-D). Tín hiệu cộng hưởng của H liên kết với C-1 của monomer acetylate (H1-A) không thấy xuất hiện, có thể là do DA của COS cao, hoặc bị peak nước che khuất. Kết quả phổ phù hợp với báo cáo của Thatte [5]. Như vậy, cellulase thủy phân chitosan đã tạo ra những phân đoạn khác nhau về TLPT có độ deacetyl hóa được tính theo công thức (1) là 84,67%, thích hợp cho việc tổng hợp dẫn xuất gắn lên vị trí  $-\text{NH}_2$  của C-2.

### 3.3 Tổng hợp dẫn xuất

Bằng cách sấy đến khối lượng không đổi và trừ đi lượng muối acetate có trong dung dịch, từ 100 ml dung dịch COS ban đầu có  $0,874 \pm 0,006$  g COS. Sau tổng hợp, hiệu suất thu nhận N-(cinnamyl) chitoooligosaccharide (viết tắt: CCOS) là 50,64%.



Hình 6. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của COS 4633 Da trong  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$

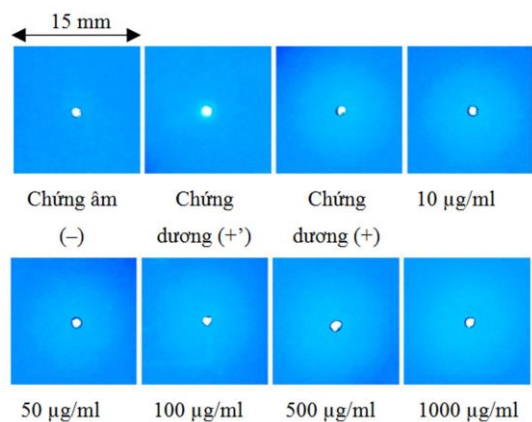


Hình 7. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của CCOS trong  $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của CCOS được trình bày trong hình 7. Từ kết quả phổ  $^1\text{H-NMR}$  của dẫn xuất cho thấy có sự xuất hiện những mũi cộng hưởng đặc trưng cho COS. Ngoài ra, trên phổ của CCOS, trong khoảng từ 6,25 – 6,11 ppm và từ 6,82 – 6,71 ppm xuất hiện tín hiệu cộng hưởng ứng của các proton vinyl (gắn trực tiếp vào nối đôi  $\text{H-C=C}$ ) [26]; tín hiệu cộng hưởng nằm trong khoảng từ 7,45 – 6,93 ppm ứng với các proton của vòng benzen. Như vậy, kết quả phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho thấy việc đã gắn thành công hợp chất có vòng thơm vào COS ban đầu. Độ thay thế của CCOS được tính theo công thức (2) là 79,05%. So sánh với kết quả xác định độ thay thế bằng phương pháp Ninhydrin, CCOS có độ thay thế là 72,22%. Kết quả từ 2 phương pháp sai lệch không nhiều, sai số có được có thể là do khác biệt về mặt bản chất của những phương pháp khác nhau. Tuy nhiên, cho dù được xác định bằng phương pháp nào thì độ thay thế của dẫn xuất đã tổng hợp đều rất cao.

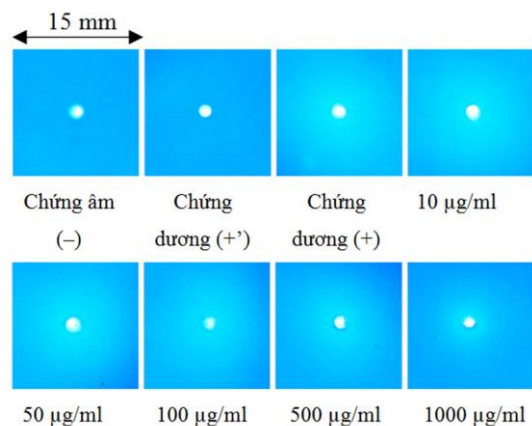
### 3.4 Khả năng ức chế collagenase của dẫn xuất

Dựa vào đường kính vòng phân giải khi xử lý với COS 4633 Da và CCOS ở các dãy nồng độ khác nhau so với đường kính vòng phân giải ở mẫu chứng dương (+) (mẫu chỉ có enzyme collagenase) của mỗi chất thử nghiệm (hình 8, 9), hiệu quả ức chế hoạt tính collagenase của chất thử nghiệm ở những nồng độ xử lý khác nhau được tính và thể hiện trên biểu đồ hình 10.



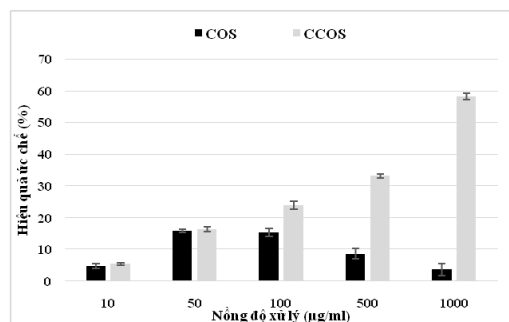
Hình 8. Đường kính vòng phân giải khi xử lý với COS 4633 Da ở các nồng độ khác nhau

Ghi chú: chứng âm (-): đệm Tris pH 7,8;  
 chứng dương (+): collagenase không bị ức chế;  
 chứng dương (+): collagenase bị ức chế bởi EDTA 100 mM.



Hình 9. Đường kính vòng phân giải khi xử lý với CCOS ở các nồng độ khác nhau

Ghi chú: chứng âm (-): đệm Tris pH 7,8;  
 chứng dương (+): collagenase không bị ức chế;  
 chứng dương (+): collagenase bị ức chế bởi EDTA 100 mM.



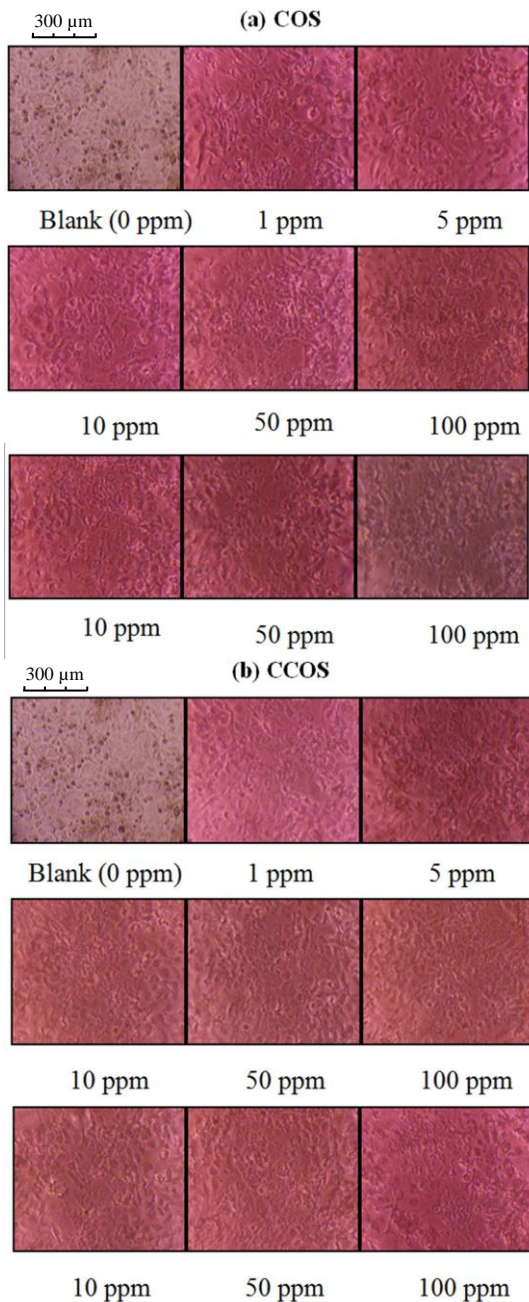
Hình 10. Biểu đồ thể hiện hiệu quả ức chế collagenase của COS 4633 Da và dẫn xuất ở các nồng độ khác nhau

Kết quả cho thấy COS 4633 Da và CCOS đều thể hiện hoạt tính ức chế collagenase ở các nồng độ xử lý 10, 50, 100, 500, 1000 µg/ml. Hoạt tính ức chế collagenase của COS và CCOS có được nhờ cơ chế bắt các ion kim loại (tính chất này cũng có ở chitosan ban đầu), mà cụ thể một trong số đó là các ion  $Zn^{2+}$  và  $Ca^{2+}$  là những ion cần thiết cho sự hoạt động của collagenase. Đối với COS, tại nồng độ 50 µg/ml thì COS cho hoạt tính ức chế enzyme cao nhất (15,85%). Đối với CCOS, tại nồng độ 1000 µg/ml thì CCOS cho hoạt tính ức chế enzyme cao nhất (58,23%). Như vậy, dẫn xuất tổng hợp được có hoạt tính ức chế collagenase cao hơn COS ban đầu.

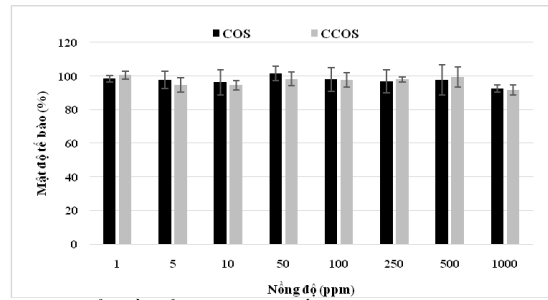
### 3.5 Khả năng gây độc của dẫn xuất

Một chất trước khi được ứng dụng trên các hệ thống sống cần được kiểm tra độc tính của nó đối với hệ thống sống đó. Việc đánh giá mức độ gây độc trên tế bào nuôi cấy in vitro phần nào cho biết được độc tính của chất thử nghiệm đối với hệ thống sống. Phương pháp MTT được mô tả bởi Hansen, Neilsen và Berg trên dòng tế bào HT1080 được sử dụng để đánh giá độc tính của COS và dẫn xuất đối với tế bào. HT1080 là dạng tế bào bám dính, là dòng tế bào ung thư nên mức độ sinh trưởng tốt hơn so với các tế bào thông thường [27]. Kết quả quan sát hình thái trên hình 11 cho thấy, hình thái tế bào của các lô xử lý với chất thử nghiệm không thay đổi so với lô đối chứng (blank) không xử lý chất thử nghiệm. Nhìn chung, sau 48 giờ nuôi cấy, các tế bào vẫn phân chia và phát triển bình thường.

Kết quả thử nghiệm MTT trên hình 12 cho thấy, trong điều kiện nuôi cấy với môi trường DMEM có bổ sung 5% FBS, COS và CCOS đều không gây độc cho tế bào ở tất cả các nồng độ khảo sát. Ở những nồng độ cao như 1000 ppm, mật độ tế bào có giảm nhưng không nhiều, tất cả nồng độ đều có mật độ tế bào còn lại trên 90% so với lô đối chứng. Theo tiêu chuẩn ISO 10993-5:2009, khi xử lý với chất thử nghiệm bằng phương pháp MTT, tỉ lệ tế bào sống trên 70% được xem không gây độc tế bào. Như vậy, COS và dẫn xuất tổng hợp được có khả năng ứng dụng trên hệ thống sống.



Hình 11. Hình thái tế bào HT1080 khi xử lý với những nồng độ khác nhau của (a) COS 4633 Da, (b) CCOS sau 48 giờ, quan sát ở vật kính 10X



Hình 12. Biểu đồ thể hiện mật độ tế bào HT1080 được xử lý với những nồng độ khác nhau của chất thử nghiệm trong 48 giờ, trong điều kiện không có huyết thanh.

#### 4 KẾT LUẬN

Đã tổng hợp thành công dẫn xuất N-(cinnamyl) COS bước đầu có khả năng ức chế enzyme collagenase, một nhóm trong họ enzyme MMP có vai trò quan trọng trong tiến trình di căn ung thư. Bên cạnh đó, nghiên cứu này đã thiết lập được các điều kiện thích hợp cho quy trình sản xuất COS. Khả năng gây độc trên tế bào động vật của dẫn xuất được xác định là không có, và như vậy, dẫn xuất có thể ứng dụng được trên các hệ thống sống.

Việc nghiên cứu các dẫn xuất có khả năng ức chế MMP, một trong những nguyên nhân gây di căn ung thư, mang một ý nghĩa quan trọng cho khoa học cũng như làm cơ sở cho các hướng nghiên cứu mới, bước đầu mở rộng phạm vi ứng dụng, đặc biệt trong y học và dược phẩm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Majeti N.V. Ravi Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers* **46** (2000) 1-27.
- [2] Anita E. Yu, Robert E. Hewitt, Edward W. Connor and William G Stetler Stevenson, Matrix metalloproteinases novel targets for directed cancer therapy, *Drugs and Aging* **11** (3) (1997) 229-244.
- [3] Elena I. Deryugina, James P. Quigley, Matrix metalloproteinases and tumor metastasis, *Cancer and Metastasis Reviews* **25** (2006) 9-34.
- [4] Fabrizio Bruschi, Barbara Pinto, The significance of matrix metalloproteinases in parasitic infections involving the central nervous system, *Pathogens* **2** (2013) 105-129.
- [5] Mrunal R. Thatte, Synthesis and antibacterial assessment of watersoluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality, Chemistry of the Doctoral Dissertation, Louisiana State University and Agritucural & Mechanical College, 2004, pp. 4-37.
- [6] V. K. Mourya, N. N. Inamdar, and Y. M. Choudhari, Chitooligosaccharides: synthesis, characterization and applications, *Polymer Science Series A* **53** (7) (2011) 583-612.
- [7] Inmaculada Aranz, Ruth Harris and Angeles Heras, Chitosan amphiphilic derivatives. Chemistry and

- applications, *Current Organic Chemistry* **14** (2010) 308-330.
- [8] V. K. Mourya, Nazma N. Inamdar, Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *Reactive & Functional Polymers* **68** (2008) 1013-1051.
- [9] Tao Sun, Qian Yao, Dongxiang Zhou, Fang Mao, Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18** (2008) 5774-5776.
- [10] Dai-Nghiep Ngo, Moon-Moo Kim, Won-Kyo Jung, Sang-Hoon Lee, Tae-Kil Eom, Se-Kwon Kim, Antioxidant effect of novel chitooligosaccharides derivatives, *Abstracts/Journal of Biotechnology* **136S** (2008) S527-S540.
- [11] Yong Zhang, Meirong Huo, Jianping Zhou, Di Yu, Yiping Wu, Potential of amphiphilically modified low molecular weight chitosan as a novel carrier for hydrophobic anticancer drug: Synthesis, characterization, micellization and cytotoxicity evaluation, *Carbohydrate Polymers* **77** (2009) 231-238.
- [12] Dai-Nghiep Ngo, Sang-Hoon Lee, Moon-Moo Kim, Se-Kwon Kim, Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells, *Journal of Functional Foods* **1** (2009) 188-198.
- [13] Dai-Hung Ngo, Zhong-Ji Qian, Dai-Nghiep Ngo, Thanh-Sang Vo, Isuru Wijesekara, Se-Kwon Kim, Gallyl chitooligosaccharides inhibit intracellular free radical-mediated oxidation, *Food Chemistry* **128** (4) (2011) 974-981.
- [14] Dai-Hung Ngo, Dai-Nghiep Ngo, Thanh-Sang Vo, BoMi Ryu, Quang Van Ta, Se-Kwon Kim, Protective effects of aminoethyl-chitooligosaccharides against oxidative stress and inflammation in murine microglial BV-2 cells, *Carbohydrate Polymers* **88** (2012) 743-747.
- [15] Trình Mai Duy Lưu, Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn, kháng oxy hóa của dẫn xuất carboxymethyl và aryl chitooligosaccharide, Luận văn Thạc sĩ Hóa sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Tp. Hồ Chí Minh, 2013, .
- [16] Trần Thị Như, Nghiên cứu tạo dẫn xuất N-Methylbenzyl-, NDimethylaminobenzyl-, Aminoethyl-Chitooligosaccharide và khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa, Luận văn Thạc sĩ Hóa sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Tp. Hồ Chí Minh, 2011.
- [17] Đặng Xuân Dự, Nghiên cứu cắt mạch chitosan bằng hiệu ứng đồng vận H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/bức xạ gamma coban – 60 để chế tạo oligochitosan, Luận án Tiến sĩ Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 2015.
- [18] Vòng Bình Long, Tổng hợp dẫn xuất chitosan với aldehyde thơm, amonium bậc bốn và khảo sát một số hoạt tính sinh học, Luận văn Thạc sĩ Hóa sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Tp. Hồ Chí Minh, 2010.
- [19] Jonathan Z. Knaul, Mohammad R. Kasaai, V. Tam Bui, Katherine A.M. Creber, Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review, *Canadian Journal of Chemistry* **76** (1998) 1699-1706.
- [20] Arnold C. M. Wu, Wayne A. Bough, Edward C. Conrad, Kenneth E. Alden, Determination of molecular-weight distribution of chitosan by highperformance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* **128** (1976) 87-99.
- [21] Emilia Curotto, Fresia Aros, Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups, *Analytical Biochemistry* **211** (1993) 240-241.
- [22] Moon-Moo Kim, Quang Van Ta, Eresha Mendis, Niranjan Rajapakse, Won-Kyo Jung, Hee-Guk Byun, You-Jin Jeon, Se-Kwon Kim, Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity, *Life Sciences* **79** (2006) 1436-1443.
- [23] Morten B. Hansen, Svend E. Nielsen, Kurt Berg, Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, *Journal of Immunological Methods* **119** (1989) 203-210.
- [24] Gokhan Coral, Burhan Arikan, M. Nisa Unaldi, Hatice Guvenmez, Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain, *Turkish Journal of Biology* **26** (2002) 209-213.
- [25] Lingyu Jia, Yingxiong Wang, Yan Qiao, Yongqin Qi, Xianglin Hou, Efficient one-pot synthesis of deoxyfructosazine and fructosazine from Dglucosamine hydrochloride using a basic ionic liquid as a dual solvent-catalyst, *RSC Advances* **4** (2014) 44253-44260.
- [26] Nguyễn Kim Phi Phụng, Phổ NMR sử dụng trong phân tích hữu cơ, NXB Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, 2005.
- [27] Charles F. Albright, Nilsa Graciani, Wei Han, Eddy Yue, Ross Stein, Zhihong Lai, Melody Diamond, Randine Dowling, Lisa Grimminger, Shu-Yun Zhang, Davette Behrens, Amy Musselman, Robert Bruckner, Mingzhu Zhang, Xiang Jiang, Daniel Hu, Anne Higley, Susan DiMeo, Maria Rafalski, Sandya Mandlekar, Bruce Car, Swamy Yeleswaram, Andrew Stern, Robert A. Copeland, Andrew Combs, Steve P. Seitz, George L. Trainor, Rebecca Taub, Pearl Huang, and Allen Oliff, Matrix metalloproteinase-activated doxorubicin prodrugs inhibit HT1080 xenograft growth better than doxorubicin with less toxicity, *Molecular Cancer Therapeutics* **4** (5) (2005) 751-760.

**Lê Minh Xuân:** sinh năm 1994 tại Bến Tre, Việt Nam. Tốt nghiệp Đại học chuyên ngành Sinh hóa tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 2016.

Sau khi tốt nghiệp làm nghiên cứu viên tại Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM. Năm 2016-2017, nghiên cứu và phát triển các sản phẩm ăn liền.

**Nguyễn Duy Khánh:** sinh năm 1990 tại Bình Định, Việt Nam. Tốt nghiệp đại học chuyên ngành Sinh hóa tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 2012.

Năm 2014 đến 2017 là học viên cao học chuyên ngành Hóa sinh, Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM.



Định hướng nghiên cứu: ứng dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học nguồn gốc tự nhiên trong thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm.

**Trần Đăng Khoa:** sinh năm 1988 tại An Giang. Tốt nghiệp đại học ngành Sinh học tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 2010. Tốt nghiệp cao học chuyên ngành Hóa sinh tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 2013.

Từ năm 2010 đến nay làm Nghiên cứu viên tại BM Sinh hóa, Khoa SH-CNSH, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM. Hướng nghiên cứu hiện nay, hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học; nano.

**Trần Quốc Tuấn:** sinh năm 1981 tại Đồng Nai. Tốt nghiệp đại học chuyên ngành Sinh hóa tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 2003. Tốt nghiệp cao học chuyên ngành Hóa sinh tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 2007.

Sau khi tốt nghiệp làm nghiên cứu viên tại Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM. Năm 2016-2017. 10 bài báo, 02 sách. Hướng nghiên cứu hiện nay đang tập trung quan tâm thu nhận và ứng dụng protein và

enzyme tự nhiên và tái tổ hợp trong thực phẩm và y học.

**Ngô Đại Nghiệp:** sinh năm 1975 tại Bạc Liêu, Việt Nam. Tốt nghiệp Đại học ngành Sinh học tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 1998. Tốt nghiệp Thạc sĩ ngành Hóa sinh tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 2002. Tốt nghiệp Tiến sĩ ngành Hóa học (Hóa sinh) tại Trường Đại học Quốc gia Pukyong, Busan, Hàn Quốc năm 2008. Năm 2002-2016 làm Giảng viên, 2012-2017 là Phó Trưởng khoa Sinh học-Công nghệ sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM. Năm 2014 là phó Giáo sư, Trưởng Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học-Công nghệ sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM, Việt Nam. Xuất bản 5 chương sách quốc tế, 1 sách tham khảo và 3 giáo trình, 16 bài tạp chí ISI, 6 bài tạp quốc tế, 18 bài tạp chí Quốc gia uy tín. Định hướng nghiên cứu chuyên sâu vào lĩnh vực Các hợp chất có hoạt tính sinh học cơ bản và ứng dụng.

## Inhibitive ability collagenase of N-(cinnamyl) chitoooligosaccharide derivative

Le Minh Xuan, Nguyen Duy Khanh, Tran Dang Khoa, Tran Quoc Tuan, Ngo Dai Nghiep

**Abstract**— Chitoooligosaccharides (COS) with molecular weight 4633 Da and 84.67% of deacetylation were synthesized by hydrolysis of chitosan by cellulase at room temperature ( $33 \pm 1^\circ \text{C}$ ). This COS, then, were chemically modified by grafting cinnamaldehyde at amino groups on the COS. Derivatives of N-(cinnamyl) chitoooligosaccharides (CCOS) synthesized with 50.64% of yield and 72.22% of extent of substitution had inhibitory activity enzyme collagenase (a group of matrix metalloproteinases, enzyme family related to metastatic ability of cancer). Compared with the positive control, 58.23% of the effective to inhibit collagenase of CCOS at 1000  $\mu\text{g/ml}$  concentrate. In addition, the CCOS cytotoxicity of CCOS was also assessed by MTT method, the results showed that non-toxic derivatives of animal cells and thus can be tested and applied in living systems.

**Index Terms**— chitoooligosaccharide (COS), N-aryl COS, collagenase, inhibitory activity enzyme, chitosan