

HOẠT TÍNH KHÁNG OXI HÓA VÀ ẢNH HƯỞNG LÊN KHẢ NĂNG HÌNH THÀNH MELANIN TRÊN TẾ BÀO B16 CỦA CÁC CAO CHIẾT BẠCH ĐÀU ÔNG (*VERNONIA CINEREA*)

Đến tòa soạn 18 - 9 - 2017

Nguyễn Trọng Tuấn, Mai Văn Hiếu

Bộ môn Hóa, Khoa Khoa Học Tự Nhiên, Đại học Cần Thơ

SUMMARY

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND THE EFFECT ON MELANIN FORMATION IN MOUSE B16 MELANOMA CELL OF *VERNONIA CINEREA* EXTRACTS

The effect of Vernonia cinerea extracts on cell viability and melanogenesis was investigated by using mouse B16 melanoma cell model. The results showed all extracts reduced the viability of B16 cell in dose-dependent manner and enhanced the melanogenesis in which ethanol extract at 200 $\mu\text{g/mL}$ exhibited 2.5 folds increase in melanin content in comparison to untreated cell. DPPH and ABTS⁺ methods were used to assess the antioxidant activities and the data were correlated in both methods in which indicated antioxidant activities of the extracts. The antioxidant activity decreased in manner, the ethanol 70%, ethanol, water and ethanol 50% extract.

Keywords: *Vernonia cinerea*, B16 cell, DPPH, ABTS

1. MỞ ĐẦU

Bạch đầu ông *Vernonia cinerea* (L.) Less., họ Cúc – *Asteraceae* là một loài cây thân thảo nhiệt đới mọc hoang dại khắp nước ta. Theo y học cổ truyền, Bạch đầu ông thường dùng trị sổ mũi, sốt, ho (lá); tiêu chảy, đau dạ dày (rễ); viêm gan, mụn nhọt, viêm tuyến sữa, rắn cắn [1]. Các công trình nghiên cứu cho thấy các cao chiết Bạch đầu ông có hoạt tính

kháng khuẩn [2, 3], giảm đau và kháng viêm [4, 5]. Nghiên cứu còn cho thấy cao chiết methanol không gây độc tính trên mô hình chuột và brine shrimp thử nghiệm [6]. Từ đó cho thấy tiềm năng sử dụng Bạch đầu ông như là một loài dược liệu một cách khoa học.

Tế bào biểu bì tạo hắc tố ở động vật có vú đóng vai trò sản sinh ra melanin ở da, nang tóc và mắt. Ở người bị

bạch tạng là do thiếu tế bào biểu bì tạo hắc tố hoặc do chúng không thực hiện được chứng năng vốn có của chúng [7]. Hiện tượng tóc bạc sớm là do quá trình lão hóa nên làm mất khả năng sinh melanin ở tóc [8]. Tế bào B16 ở chuột được sử dụng rộng rãi như một mô hình để đánh giá khả năng ức chế hay kích thích quá trình sản sinh melanin [9,10]. Chính về thể, tế bào B16 được chọn làm mô hình để đánh giá ảnh hưởng của các cao chiết Bạch đầu ông lên khả năng sản sinh melanin. Bên cạnh đó, hoạt tính kháng oxi hóa cũng được đánh giá nhằm làm rõ hơn tiềm năng ứng dụng của các cao chiết Bạch đầu ông trong các sản phẩm chăm sóc da.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Hóa chất: DMEM high glucose with phenol red (Wako), trypsin/EDTA (Lonza), FBS (Lonza), penicillin/streptomycin 100X (Wako), WST-8 (Dojindo), Arbutin (Wako), DPPH (Wako), ABTS (Sigma), $K_2S_2O_8$ (Merck). Các dung môi: Ethanol, DMSO (Wako). Thiết bị: Bộ đếm hồng cầu 1 mm², máy đo quang phổ microplate spectrophotometer.

2.2. Nguyên liệu thực vật

Cây Bạch đầu ông được thu hái trên địa bàn thành phố Cần Thơ trong thời kỳ cây đang ra hoa và được định danh bởi TS. Đặng Minh Quân – Bộ môn Sư phạm Sinh học, mẫu được lưu giữ tại phòng thí nghiệm Hợp chất thiên nhiên – Khoa Khoa học Tự nhiên – Trường Đại học Cần Thơ. Kết quả

định danh mẫu cây có tên khoa học là *Vernonia cinerea* (L.) Less. Mẫu được thu hái toàn thân rồi rửa sạch, loại bỏ tạp bản, cắt nhỏ và sấy ở nhiệt độ 60°C đến khối lượng không đổi, rồi nghiền mịn thu được bột khô.

2.3. Chuẩn bị cao chiết

Bột cây Bạch đầu ông khô 5 g được ngâm trong 40 mL dung môi (ethanol tuyệt đối, ethanol 70%, ethanol 50%) ở nhiệt độ phòng, mỗi lần ngâm trong 24h và thực hiện lặp lại 3 lần. Dịch lọc được gom lại và cô đuổi bớt dung môi rồi tiến hành đông khô được cao chiết tương ứng. Đối với cao chiết bằng nước được thực hiện tương tự nhưng mẫu chiết được khuấy giữ liên tục ở 60°C trong 2h (40 mL x 3 lần), dịch chiết nước được lọc và gom chung rồi tiến hành đông khô thu được cao chiết nước.

2.4. Nuôi cấy tế bào

Tế bào B16 chuột (mouse B16 melanoma cell line, JCRB0202) được cung cấp bởi Health Science Research Resources Bank, Tokyo, Nhật Bản. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM được bổ sung 10% FBS và 1% streptomycin/penicillin. Sau mỗi 72h, khi tế bào đạt đến log phase thì được xử lý với 0.25% trypsin. Một phần tế bào được tiếp tục sử dụng để nuôi cấy nhân lên, phần còn lại được sử dụng cho thí nghiệm. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên cùng một đĩa, và được thực hiện 3 lần khác nhau để đảm bảo độ lặp lại. Kết quả được xử lý bằng phần mềm SPSS 12.0.

2.5. Khả năng sống sót của tế bào

Tế bào B16 được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với mật độ ban đầu là 4×10^4 tế bào/100 μL /giếng ở 37°C trong môi trường 5% CO_2 . Sau 24h, môi trường nuôi cấy được rút bỏ và tế bào được xử lý bằng 100 μL hóa chất thử nghiệm với nhiều nồng độ khác nhau được hòa tan trong DMEM có chứa 0.5% DMSO. Sau 48h tiếp theo, tế bào được rửa sạch bằng 100 μL PBS rồi thêm vào 10 μL WTS-8 trong 100 μL DMEM. Mật độ quang được ghi nhận tại bước sóng 450 nm sau 2h. Mẫu đối chứng là tế bào không được xử lý. Phần trăm tế bào sống sót được tính theo công thức:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{\text{OD}_{\text{mẫu thử}} - \text{OD}_{\text{WST-8}}}{\text{OD}_{\text{đối chứng}} - \text{OD}_{\text{WST-8}}}$$

Trong đó:

- WST-8: DMEM + WST-8

- Đối chứng : tế bào + DMEM + WST-8

- Mẫu thử: tế bào + DMEM + WST-8 + chất thử

2.6. Khả năng hình thành melanin

Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của các cao chiết lên khả năng hình thành melanin ở tế bào B16 được tiến hành theo phương pháp của Shirasugi *et al.*, (2010) và Aoki *et al.*, (2007) có chỉnh sửa [9, 11]. Tế bào B16 được nuôi cấy trong đĩa 60 mm với mật độ ban đầu là 2.5×10^4 tế bào/5 mL/dĩa ở 37°C trong môi trường 5% CO_2 . Sau 24h, môi trường nuôi cấy được rút bỏ

và tế bào được xử lý bằng 5 mL hóa chất thử nghiệm với nhiều nồng độ khác nhau được hòa tan trong DMEM có chứa 0.5% DMSO. Sau 72h tiếp theo, tế bào được rửa sạch bằng 100 μL PBS, xử lý bằng trypsin-EDTA 0.25%. Hỗn hợp được ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 5 phút thu được phần tế bào lắng. Phần tế bào này được phân tán lại trong 1 mL PBS và tiến hành đếm số tế bào sống sót bằng phương pháp Trypan Blue. Phần tế bào còn lại, lấy 0.9 mL để tiếp tục ly tâm 1000 vòng/phút, 5 phút và thu lấy phần tế bào lắng. Tế bào được hòa tan trong 110 μL NaOH và ủ ở 80°C trong 15 phút, lấy 100 μL và tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 475 nm. Đối chứng âm là mẫu tế bào không được xử lý bằng chất thử. Đối chứng dương là Arbutin.

2.7. Hoạt tính kháng oxi hóa

2.7.1. Phương pháp DPPH

Khả năng kháng oxi hóa của các cao chiết Bạch đầu ông được đánh giá bằng phương pháp DPPH theo quy trình của (Sharma và Bhat, 2009) có chỉnh sửa. Trong đĩa 96 giếng chứa sẵn 100 μL cao chiết với nồng độ thích hợp được hòa tan trong 50 % methanol, thêm vào 100 μL dung dịch DPPH trong methanol sao cho nồng độ sau cùng của DPPH là 30 $\mu\text{g/mL}$ và của cao chiết là từ 0-500 $\mu\text{g/mL}$. Hỗn hợp phản ứng được lắc đều rồi giữ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng

25°C. Sau 30 phút đo độ hấp thu tại bước sóng 517 nm. Dụng đường chuẩn nồng độ mẫu thử theo độ hấp thu quang phổ, từ phương đường chuẩn có được ta sẽ tính được phần trăm ức chế, được biểu diễn bằng giá trị IC_{50} $\mu\text{g/mL}$. Đối chứng dương được dùng trong thử nghiệm là vitamin C.

2.7.2. Phương pháp ABTS

Thử nghiệm kháng oxi hóa $ABTS^{*+}$ được tiến hành theo phương pháp của Nenadis *et al.*, (2004) có thay đổi [13]. Dung dịch gốc tự do $ABTS^{*+}$ được chuẩn bị bằng cách cho dung dịch ABTS nồng độ 7 mM vào dung dịch $K_2S_2O_8$ nồng độ 2.45 mM với thể tích bằng nhau rồi ủ dung dịch ở bóng tối trong 16 h, sau đó pha loãng bằng ethanol rồi điều chỉnh độ hấp thu của dung dịch ở bước sóng 734 nm đến 0.70 ± 0.05 . Dung dịch này được dùng cho thử nghiệm. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách thêm 10 μL mẫu thử pha trong methanol vào 990 μL dung dịch gốc tự do $ABTS^{*+}$ và ủ ở nhiệt độ phòng (khoảng 25°C) trong 6 phút. Độ hấp thu được đo ở 734 nm. Đối chứng dương được sử dụng trong thử nghiệm là Trolox với nồng độ sau cùng là 0-15 $\mu\text{g/mL}$. Thử nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập và kết quả

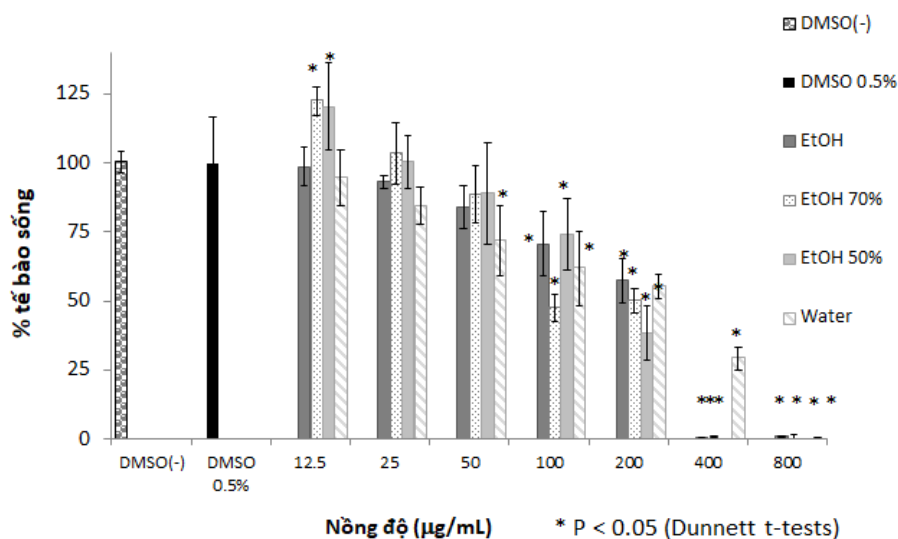
được biểu diễn bằng giá trị IC_{50} $\mu\text{g/mL}$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng sống của tế bào

Khả năng sống sót của tế bào được đánh giá bằng phương pháp WST-8. Kết quả được thể hiện trong [Hình 1]. Các cao chiết của Bạch đầu ông tan kém trong nước nên cần có dung môi trợ tan. Các công trình nghiên cứu về độc tính của DMSO lên tế bào cho thấy ở nồng độ thấp, DMSO không ảnh hưởng lên tế bào [14]. Các thí nghiệm sơ bộ cho thấy nồng độ DMSO 0.5 % không ảnh hưởng đáng kể lên tế bào B16 mà vẫn đảm bảo khả năng hòa tan các cao chiết nên nồng độ DMSO 0.5% được sử dụng cho thí nghiệm.

Khi tăng dần nồng độ của cao chiết, khả năng sống của tế bào giảm dần. Ở nồng độ 400 và 800 $\mu\text{g/mL}$, hầu hết các cao chiết đều gây độc lên tế bào. Trái lại, ở nồng độ 12.5 $\mu\text{g/mL}$, cao ethanol 70% và ethanol 50% có tác dụng kích thích sự tăng sinh tế bào. Các cao chiết hầu như đều ảnh hưởng đến số tế bào sống sót ở nồng độ 100 và 200 $\mu\text{g/mL}$. Nhìn chung, cao ethanol 70% và 50% làm tăng sinh ở nồng độ thấp nhưng khi nồng độ tăng dần, độc tính của chúng lên tế bào mạnh hơn hai cao chiết ethanol và nước.



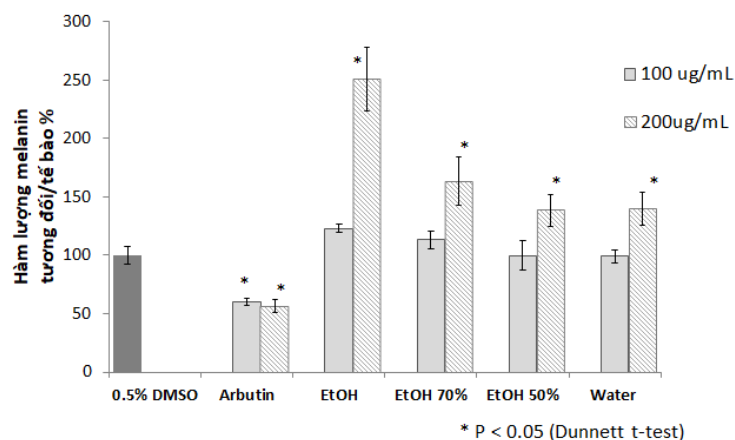
Hình 1. Ảnh hưởng của các cao chiết lên khả năng sống sót của tế bào

3.2. Khả năng hình thành melanin

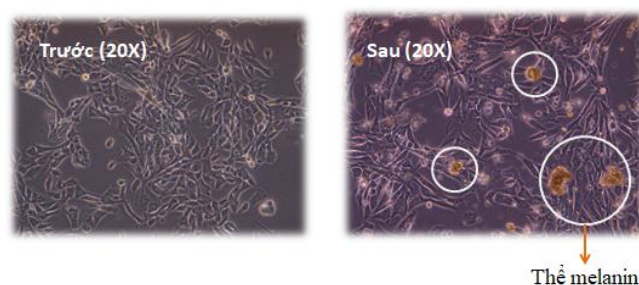
Ảnh hưởng của các cao chiết Bạch đầu ông lên khả năng hình thành melanin được đánh giá trên mô hình tế bào B16, kết quả được thể hiện trong [Hình 2]. DMSO nồng độ 0.5 % được xem là đối chứng âm làm cơ sở để so sánh với các mẫu khác. Arbutin là chất có khả năng ức chế sự hình thành melanin, làm giảm khoảng một nửa lượng melanin hình thành và khác biệt không đáng kể giữa nồng độ 100 và 200 µg/mL. Ở nồng độ cao chiết 100 µg/mL, hàm lượng melanin không thay đổi nhiều so với đối chứng DMSO 0.5% nhưng khi tăng đến 200 µg/mL thì tất cả các cao chiết đều làm tăng sinh hàm lượng melanin trong đó cao chiết ethanol có tác dụng làm tăng sinh cao gấp khoảng 2.5 lần so với mẫu không xử lý với cao chiết [Hình 3]. Kết quả này tương đồng với

một số nghiên cứu trước đây khi một số cao chiết thuộc một số loài Hồ tiêu hay loài *Daphne gnidium* cũng có khả năng kích thích quá trình sản sinh melanin [15, 16, 17].

Khả năng tăng sinh melanin của cao chiết Bạch đầu ông có thể được ứng dụng trị liệu về da khi cơ thể mất khả năng sinh tổng hợp melanin hoặc ứng dụng trong các mỹ phẩm nhuộm nâu da thay vì sử dụng tia UV để kích thích sinh melanin vốn gây ra nhiều tác dụng xấu cho cơ thể [18]. Ngoài ra, khả năng tăng sinh melanin ở tế bào B16 có liên hệ với khả năng làm đen lông, tóc ở chuột nên có thể được ứng dụng trong các sản phẩm chống bạc tóc [19]. Tuy nhiên, các nghiên cứu chuyên sâu hơn về cơ chế tác động của cao chiết Bạch đầu ông lên khả năng tăng sinh melanin cần được nghiên cứu rõ thêm [20].



Hình 2. Ảnh hưởng của các cao chiết lên khả năng sản sinh melanin



Hình 3. Thể melanin ở mẫu xử lý với cao chiết (phải) so với đối chứng (trái)

3.3. Hoạt tính kháng oxi hóa

Bảng 1. Kết quả hoạt tính kháng oxi hóa của các cao chiết Bạch đầu ông.

Cao chiết	IC ₅₀ (μg/mL)	
	DPPH	ABTS
Ethanol	182.41 ± 11.46	90.37 ± 3.40
Ethanol 70%	177.51 ± 1.65	67.22 ± 3.21
Ethanol 50%	237.89 ± 7.86	112.32 ± 7.43
Nước	188.32 ± 16.80	98.02 ± 2.31
Đối chứng dương		
Vitamin C	15.02 ± 0,63	-
Trolox	-	11.80 ± 0.07

Hoạt tính kháng oxi hóa *in vitro* của các cao chiết Bạch đầu ông được đánh giá bằng hai phương pháp DPPH và ABTS. Nhìn chung các cao chiết Bạch đầu ông đều thể hiện hoạt tính kháng oxi hóa. Trong cả hai phương pháp [**Bảng 1**], cao ethanol 70% đều thể hiện hoạt tính kháng oxi hóa mạnh nhất với IC₅₀ 177.51 μg/mL

trong phương pháp DPPH và 67.22 μg/mL trong phương pháp ABTS. Tất cả các cao chiết đều thể hiện hoạt tính kháng oxi hóa yếu hơn so với các chất đối chứng dương trong từng phương pháp là Vitamin C và Trolox. Hoạt tính kháng oxi hóa của các cao chiết trong cả hai phương pháp khá tương đồng theo thứ tự: ethanol 70% > ethanol > nước > ethanol 50%. Điều này được giải thích là do cả DPPH và ABTS đều là những gốc tự do nên cơ chế gây nên hoạt tính kháng oxi hóa đều là cơ chế làm sạch gốc tự do [21]. Khả năng kháng oxi hóa của ethanol 70% cao hơn ethanol tuyệt đối, tương đồng với kết quả của Sultana *et al.*, (2009) nhưng khi tỉ lệ nước nhiều thì khả năng xuyên thấu của dung môi qua màng tế bào giảm làm giảm khả

năng chiết của dung môi, từ đó làm giảm khả năng kháng oxi hóa[22]. Khả năng kháng oxi hóa của Bạch đầu ông cùng khả năng tăng sinh melanin thích hợp cho việc sử dụng kết hợp trong các loại mỹ phẩm về da trong đó các hợp chất kháng oxi hóa giúp ngăn chặn quá trình lão hóa của da [23].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã cho thấy ảnh hưởng của các cao chiết Bạch đầu ông lên khả năng sống sót và hình thành melanin trong đó cao ethanol làm tăng sinh melanin gấp 2.5 lần so với mẫu đối chứng. Ngoài ra, các cao chiết đều cho hoạt tính kháng oxi hóa trong cả hai thử nghiệm DPPH và ABTS. Các nghiên cứu chuyên sâu hơn về cơ chế tác động cần được tiến hành nhằm làm rõ hơn về tác dụng của Bạch đầu ông trong các trị liệu về da.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành cảm ơn giáo sư Kaeko Kamei, Viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản đã giúp đỡ để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi, (2011). Từ điển cây Thuốc Việt Nam. NXB Y Học.
2. Latha, L. Y., Darah, I., Kassim, M. J. N. M., Sasidharan, S., (2010). Antibacterial activity and morphological changes of *Pseudomonas aeruginosa* cells after exposure to *Vernonia cinerea* extract. *Ultrastructural pathology* 34, 219-225.
3. Gupta, M., Mazumder, U., Manikandan, L., Haldar, P., Bhattacharya, S., Kandar, C., (2003).

Antibacterial activity of *Vernonia cinerea*. *Fitoterapia* 74, 148-150.

4. Iwalewa, E., Iwalewa, O., Adeboye, J., (2003). Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. *Journal of ethnopharmacology* 86, 229-234.
5. Mazumder, U., Gupta, M., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Haldar, P., Roy, S., (2003). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. *Phytomedicine* 10, 185-188.
6. Latha, L. Y., Darah, I., Jain, K., Sasidharan, S., (2010). Toxicity study of *Vernonia cinerea*. *Pharmaceutical biology* 48, 101-104.
7. Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., Marais, R., (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851.
8. Tobin, D. J., (2009). Aging of the hair follicle pigmentation system. *International journal of trichology* 1, 83.
9. Shirasugi, I., Kamada, M., Matsui, T., Sakakibara, Y., Liu, M.-C., Suiko, M., (2010). Sulforaphane inhibited melanin synthesis by regulating tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74, 579-582.
10. Matsuyama, K., Villareal, M. O., El Omri, A., Han, J., Kchouk, M. E., Isoda, H., (2009). Effect of Tunisian *Capparis spinosa* L. extract on melanogenesis in B16 murine melanoma cells. *Journal of natural*

medicines 63, 468-472.

11. Aoki, Y., Tanigawa, T., Abe, H., Fujiwara, Y., (2007). Melanogenesis inhibition by an oolong tea extract in B16 mouse melanoma cells and UV-induced skin pigmentation in brownish guinea pigs. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71, 1879-1885.

12. Sharma, O. P., Bhat, T. K., (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry* 113, 1202-1205.

13. Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., Zhang, H.-Y., (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 4669-4674.

14. Yi, X., Liu, M., Luo, Q., Zhuo, H., Cao, H., Wang, J., Han, Y., (2017). Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS open bio* 7, 485-494.

15. Matsuda, H., Kawaguchi, Y., Yamazaki, M., Hirata, N., Naruto, S., Asanuma, Y., Kaihatsu, T., Kubo, M., (2004). Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by Piper nigrum leaf extract and its lignan constituents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27, 1611-1616.

16. Matsuda, H., Hirata, N., Kawaguchi, Y., Naruto, S., Takata, T., Oyama, M., Iinuma, M., Kubo, M., (2006). Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by Kava (Piper methysticum) rhizome extract and kavalactones. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29, 834-837.

17. Chaabane, F., Pinon, A., Simon, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., (2014). Chloroform leaf extract of Daphne gnidium inhibits growth of melanoma cells and enhances melanogenesis of B16-F0 melanoma. *South African Journal of Botany* 90, 80-86.

18. Pawelek, J. M., Chakraborty, A. K., Osber, M. P., Orlow, S. J., Min, K. K., Rosenzweig, K. E., Bolognia, J. L., (1992). Molecular Cascades in UV Induced Melanogenesis: A Central Role for Melanotropins? *Pigment Cell & Melanoma Research* 5, 348-356.

19. Itoh, T., Furuichi, Y., (2005). Hot-water extracts from adzuki beans (Vigna angularis) stimulate not only melanogenesis in cultured mouse B16 melanoma cells but also pigmentation of hair color in C3H mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 69, 873-882.

20. Videira, I. F. d. S., Moura, D. F. L., Magina, S., (2013). Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais brasileiros de dermatologia* 88, 76-83.

21. Liu, Z.-Q., (2010). Chemical methods to evaluate antioxidant ability. *Chemical reviews* 110, 5675-5691.

22. Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M., (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules* 14, 2167-2180.

23. Masaki, H., (2010). Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *Journal of dermatological science* 58, 85-90.