

# NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG HBV CỦA SẢN PHẨM TỪ RỄ CÂY *MORINDA LONGISSIMA* TRÊN TẾ BÀO Hep3B NHIỄM HBV

PGS.TS. NGUYỄN LĨNH TOÀN - Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS.TS. CẦN VĂN MÃO  
Chủ nhiệm Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

**TÓM TẮT:** Nghiên cứu thực nghiệm có đối chứng về tác dụng kháng HBV của sản phẩm tách chiết từ rễ cây *Morinda longissima* trên tế bào Hep3B nhiễm HBV in vitro.

**Kết quả:** Nồng độ HBV-DNA trong tế bào Hep3B dưới tác dụng của các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* (gồm HCTN-210, HCTN-211, HCTN-212, HCTN-218 và HCTN-219) giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng dương Lamivudine ( $p < 0,05$ ). Khả năng ức chế HBV của sản phẩm HCTN-212, HCTN-218 và HCTN-219 còn tăng sau 72 giờ sử dụng.

**Từ khóa:** Kháng virus, *Morinda longissima*, HBV, Hep3B.

**ABSTRACT:** It was a controlled experimental study of the anti-HBV effect of the root extract of *Morinda longissima* on hepatocellular carcinoma (HCC) Hep3B cells with HBV infection in vitro.

**Results:** The HBV-DNA contents in Hep3B cells were significantly decreased after treated with the products of HCTN-210, HCTN-211, HCTN-212, HCTN-218 and HCTN-219 in comparison to positive group with Lamivudine ( $p < 0.05$ ). Products HCTN-212, HCTN-218 and HCTN-219 highly inhibited HBV replication in Hep3B cells after 72 hours of incubation.

**Keywords:** Antiviral, *Morinda longissima*, HBV, Hep3B.

Chịu trách nhiệm nội dung: PGS.TS. Nguyễn Linh Toàn, Email: toannl@vmmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 04/3/2019; mời phản biện khoa học: 15/3/2019; chấp nhận đăng: 25/4/2019.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Tổ chức Y tế Thế giới ước tính, năm 2018, trên toàn thế giới có khoảng 257 triệu người dương tính với HbsAg (mang virus HBV) [1]. Tại Việt Nam, số nhiễm HBV năm 1990 khoảng 6,4 triệu người và năm 2005 khoảng 8,4 triệu người. Nhờ có chương trình tiêm vắc xin phòng nhiễm HBV, dự tính tỉ lệ người nhiễm HBV ở nước ta sẽ giảm xuống vào năm 2025 [2]. Tuy nhiên, tình hình xơ gan, ung thư gan và tử vong do nhiễm HBV lại tăng lên khá mạnh [3].

Cho đến nay, điều trị diệt trừ hoàn toàn virus HBV là rất khó khăn. Điều trị kháng virus chỉ nhằm hạn chế sự suy giảm chức năng gan, ung thư gan và tăng thời gian sống của bệnh nhân. Hiện có hai loại thuốc được Cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm Hoa Kỳ (FDA) cấp phép điều trị viêm gan do HBV là interferon  $\alpha$  (INF- $\alpha$ ), pegylated interferon  $\alpha$  (peg-INF- $\alpha$ ) và các hợp chất tương tự nucleotide. Tuy vậy, các thuốc này chưa có hiệu quả cao vì có tỉ lệ lớn kháng thuốc và nhiều tác dụng không mong muốn; hơn nữa, giá thành thuốc khá đắt. Một nhu cầu cần thiết đặt ra cho nền y tế toàn cầu là tìm kiếm và phát triển các loại thuốc mới điều trị viêm gan do HBV.

Ở nước ta, trong số trên 4.000 cây thuốc và vị thuốc cổ truyền, có rất nhiều cây thuốc, bài thuốc có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về gan (bảo vệ tế bào gan, tăng cường chức năng gan), như Diệp hạ châu, Cúc gai, Núc nác, Sài hồ bắc, Cam thảo, Tam thất, Nhân sâm... Theo kinh nghiệm cổ truyền, toàn cây hoặc chủ yếu phần rễ cây Nhọ đồng (*Morinda longissima* Y.Z Ruan) được đồng bào các dân tộc khu vực Sơn La, Lai Châu lưu truyền sử dụng dưới dạng nước sắc hoặc cao mềm, để chữa các chứng bệnh vàng da, viêm gan, xơ gan với hiệu quả tốt [5], [6], [7]. Tuy nhiên, chưa có quy trình thực nghiệm chuẩn, đánh giá tác dụng kháng HBV nói chung và nghiên cứu tác dụng của các hoạt chất từ rễ cây *Morinda longissima* nói riêng trong ứng dụng điều trị.

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm đánh giá sự thay đổi nồng độ HBV-DNA dưới tác dụng của mẫu sản phẩm HCTN-210, HCTN-211, HCTN-212, HCTN 218 và HCTN-219 được sản xuất từ rễ cây *Morinda longissima* trên mô hình tế bào ung thư gan người Hep3B nhiễm HBV.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu:

Các sản phẩm tách chiết từ rễ cây *Morinda longissima*, gồm:

- Ngâm chiết bột rễ khô cây *Morinda longissima*, tạo cao cồn HCTN-210.

- Xử lý cao chiết sản phẩm HCTN-210 bằng phương pháp hóa học, thu được sản phẩm dạng bột màu vàng (HCTN-211).

- Tiếp tục chiết tổng anthranoid sản phẩm HCTN-211, thu được sản phẩm màu nâu đỏ (HCTN-212).

- Phân tách sắc kí cột HCTN-212 sản phẩm HCTN-212, thu được các nhóm hoạt chất số 1 (HCTN-213), số 2 (HCTN-214), số 3 (HCTN-215), số 4 (HCTN-216), số 5 (HCTN-217).

- Tạo hỗn hợp theo tỉ lệ thích hợp các nhóm hoạt chất số 1, 3 và 4, thu được bán thành phẩm HCTN-218.

- Bào chế bán thành phẩm HCTN-218 với tá dược phù hợp, thu được thành phẩm HCTN-219.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Thiết kế nghiên cứu: thực nghiệm có đối chứng.

- Mô hình thử tác dụng kháng HBV in vitro:

+ Nuôi cấy tế bào Hep3B (ATCC): để đánh giá hoạt tính kháng HBV *in vitro*, nghiên cứu sử dụng tế bào Hep3B mang HBV. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) (invitrogen, USA) với 100 U/ml penicillin và 100 mg/ml streptomycin (invitrogen, USA), nhiệt độ 37°C trong môi trường 5% CO<sub>2</sub>. Khi tế bào nuôi cấy đạt tỉ lệ 70-80% diện tích đĩa nuôi, tiến hành cấy chuyển (sử dụng 0,05% trypsin/EDTA; invitrogen, USA, 5 phút ở 37°C) để tách tế bào khỏi đĩa nuôi cấy và chuyển sang đĩa nuôi cấy mới với môi trường như trên.

+ Chuẩn bị thuốc thử: đánh giá tác dụng kháng HBV của các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* trên tế bào Hep3B được so sánh với chứng dương là thuốc Lamivudine (STADAR 100 mg) và chứng âm là DMSO (Fisher Chemical). Các mẫu hoạt chất thử được hòa tan các thuốc thử trong DMSO với nồng độ 10 mg/ml; riêng Lamivudine có nồng độ 10 mM/L (bảng 1).

+ Tăng sinh nuôi cấy tế bào

Hep3B, thử và thu sản phẩm sau thử thuốc: tế bào Hep3B được gieo vào đĩa nuôi cấy 6 giếng (đường kính 5 cm) với nồng độ 10<sup>5</sup> tế bào/ml, tổng lượng tế bào là 2 ml x 10<sup>5</sup> tế bào/giếng trong môi trường nuôi cấy chuẩn. Tiến hành thay môi trường nuôi cấy chứa các thuốc thử với nồng độ cuối cùng trong môi trường nuôi cấy (như ở bảng 1) sau 24 giờ và 72 giờ. Thu tế bào ở các thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau khi thử thuốc. Quan sát tế bào dưới kính hiển vi soi ngược quang học, đánh giá sự phát triển của tế bào Hep3B.

Bảng 1. Nồng độ chất thử từ rễ cây *Morinda longissima* trong DMSO, trong môi trường tế bào.

| Code thử   | Nồng độ trong DMSO | Nồng độ trong môi trường tế bào |
|------------|--------------------|---------------------------------|
| Lamivudine | 10 mM/L            | 50 µM/L                         |
| DMSO       | 100%               | 0,5%                            |
| HCTN-210   | 10 mg/ml           | 25 µg/ml                        |
| HCTN-211   | 10 mg/ml           | 50 µg/ml                        |
| HCTN-212   | 10 mg/ml           | 25 µg/ml                        |
| HCTN-218   | 10 mg/ml           | 50 µg/ml                        |
| HCTN-219   | 10 mg/ml           | 50 µg/ml                        |

- Định lượng HBV-DNA: tách, tinh sạch vật liệu di truyền của HBV (HBV-DNA) sử dụng kit của QIAgen -Đức (các bước tiến hành thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Sau đó định lượng HBV-DNA của tế bào Hep3B bằng kĩ thuật realtime-PCR. Mỗi và probe đặc hiệu cũng như quy trình luân nhiệt dùng định lượng HBV-DNA trong tế bào được mô tả chi tiết trong nghiên cứu công bố gần đây của chúng tôi [4].

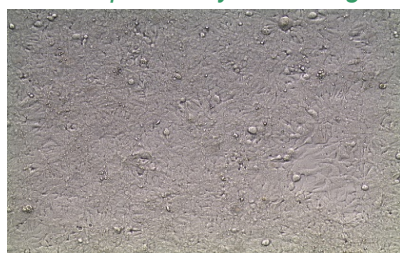
Lamivudine



DMSO



Sản phẩm cây Nhó đông



Hình ảnh tế bào Hep3B nuôi cấy (chụp ở vật kính 10x) dưới tác dụng của sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* tại thời điểm 72 giờ sau khi cho thuốc thử.

- Xử lý số liệu: bằng thuật toán ANOVA, phần mềm STATVIEW 5.0. Kết quả trình bày dưới dạng Trung bình  $\pm$  SEM. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

#### 3.1 Ảnh hưởng của sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* trên sự nhân lên của tế bào Hep3B có HBV:

Xác định nồng độ của các sản phẩm từ rễ cây Nhỏ đông, Lamivudine, và DMSO đối với sự phát triển tự nhiên của tế bào Hep3B. Nồng độ được xác định cho mỗi mẫu thử được dùng để đánh giá tác dụng kháng HBV trên dòng tế bào Hep3B. Tiến hành thử thuốc theo nồng độ đã tối ưu (bảng 1) và đánh giá sự phát triển của tế bào ở các thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau thử thuốc (hình 1).

Kết quả cho thấy, các tế bào phát triển khỏe mạnh, phủ hầu hết bề mặt đĩa đến thời điểm 24 giờ và 72 giờ sau thử thuốc, trên tất cả các nhóm

thử: Lamivudine (50  $\mu$ M/L); DMSO 0,5%; các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* (HCTN-210, HCTN-212 ở 25  $\mu$ g/ml; HCTN-211, HCTN-218, HCTN-219 ở 50  $\mu$ g/ml). Ở nồng độ tối ưu (bảng 1) của các mẫu thử, tế bào Hep3B vẫn phát triển tự nhiên.

#### 3.2 Tác dụng ức chế HBV nhân lên của các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* ở thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau thử thuốc:

Đánh giá tác dụng ức chế HBV nhân lên dưới tác dụng của các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima*, chúng tôi tiến hành thử thuốc trên tế bào nuôi cấy Hep3B nhiễm HBV (sử dụng Lamivudine làm chứng dương, dung môi DMSO làm chứng âm) với nồng độ thuốc thử tính chuẩn.

Tế bào được thu để định lượng HBV-DNA ở thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau thử thuốc bằng kỹ thuật Realtime-PCR. Kết quả thu được trình bày ở bảng 2 và bảng 3:

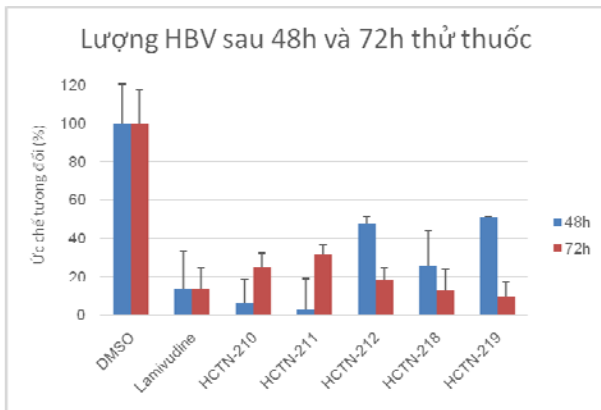
Bảng 2. Kết quả Realtime-PCR định lượng HBV-DNA của nhóm tế bào dưới tác dụng của các mẫu sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* tại thời điểm 48 giờ.

| Nhóm            | HBV-DNA x 10e9/1mg DNA tổng số | SE     | % ức chế HBV-DNA so với chứng âm |
|-----------------|--------------------------------|--------|----------------------------------|
| Chứng âm (DMSO) | 1023,63                        | 209,97 | 0                                |
| Lamivudine      | 138,12                         | 200,08 | 86,50                            |
| HCTN-210        | 59,39                          | 131,58 | 94,19                            |
| HCTN-211        | 28,83                          | 168,53 | 97,18                            |
| HCTN-212        | 492,35                         | 30,88  | 51,90                            |
| HCTN-218        | 263,03                         | 191,38 | 74,30                            |
| HCTN-219        | 520,87                         | 8,94   | 49,11                            |

Bảng 3. Kết quả Realtime-PCR định lượng HBV-DNA trong tế bào dưới tác dụng của các mẫu sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* tại thời điểm 72 giờ.

| Nhóm            | HBV-DNA x 10e9/1mg DNA tổng số | SE     | % ức chế HBV-DNA so với chứng âm |
|-----------------|--------------------------------|--------|----------------------------------|
| Chứng âm (DMSO) | 1250                           | 222,05 | 0                                |
| Lamivudine      | 166,90                         | 137,79 | 86,64                            |
| HCTN-210        | 314,41                         | 87,51  | 74,84                            |
| HCTN-211        | 392,68                         | 61,95  | 68,58                            |
| HCTN-212        | 232,63                         | 79,61  | 81,38                            |
| HCTN-218        | 156,61                         | 143,59 | 87,47                            |
| HCTN-219        | 118,91                         | 93,46  | 90,48                            |

- So sánh khả năng ức chế nhân lên HBV ở tế bào Hep3B ở thời điểm 48 giờ và 72 giờ thử thuốc: Kết quả cho thấy, các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* có ức chế sự nhân lên của HBV thông qua định lượng HBV-DNA trong tế bào Hep3B ở thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau thử thuốc. Tỷ lệ ức chế HBV-DNA trong tế bào của sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* cao hơn (sản phẩm HCTN-210 và HCTN-211) hoặc tương đương (sản phẩm HCTN-212, HCTN-218 và HCTN-219 ở thời điểm 72 giờ) so với sử dụng Lamivudine tại cả hai thời điểm thử thuốc (hình 2).



**Biểu đồ so sánh khả năng ức chế HBV nhân lên ở tế bào Hep3B thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau thử thuốc.**

Các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* có tác dụng ức chế sự nhân lên của HBV dao động từ 49,1-97,2% và 68,6-90,5% ở thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau thử thuốc, trong khi nhóm thử Lamivudine (chứng dương) ức chế 86,5% và 86,6% ở thời điểm 48 giờ và 72 giờ. Tại thời điểm 48 giờ, các sản phẩm HCTN-210 và HCTN-211 có khả năng ức chế HBV nhân lên trên 90% (nhiều hơn so với Lamivudine); sản phẩm HCTN-218 và HCTN-219 có khả năng ức chế HBV cao hơn nhiều so với Lamivudine tại thời điểm 72 giờ (bảng 2, 3).

#### 4. BÀN LUẬN.

Sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* đã được nghiên cứu cho thấy có tác dụng bảo vệ gan trên thực nghiệm [5], [6], [7]. Kết quả nghiên cứu này đã xác định nồng độ tối ưu của thuốc thử. Các tế bào Hep3B nhiễm HBV vẫn phát triển bình thường khi quan sát ở thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau thử thuốc, tế bào phát triển và trải đều (phủ hầu hết) bề mặt đĩa ở trên tất cả các nhóm thuốc thử Lamivudine 50  $\mu$ M/L; DMSO 0,5%; các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* (HCTN-210, HCTN-212 ở 25  $\mu$ g/ml và HCTN-211, HCTN-218, HCTN-219 ở 50  $\mu$ g/ml). Thử nghiệm các sản phẩm từ cao còn rễ cây *Morinda longissima* trên tế bào ung thư gan Hep3B có HBV, thấy có tác dụng ức chế sự nhân lên của HBV khá rõ thông qua kết quả định lượng trực tiếp HBV-DNA trong tế bào Hep3B bằng phương pháp Realtime-PCR. Hiệu quả kháng HBV của các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* trong nghiên cứu này được so sánh với tác dụng của Lamivudine (một trong những thuốc có tác dụng kháng HBV rất rõ trên lâm sàng). Kết quả cho thấy đa số các sản phẩm đều có hiệu quả kháng HBV (bảng 2, 3; hình 2).

Các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* có tác dụng kháng HBV rõ rệt trên mô hình in vitro.

Khi sử dụng sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima*, lượng HBV tại thời điểm 72 giờ trong tế bào Hep3B giảm rõ rệt so với tại thời điểm 48 giờ. Kết quả này cho thấy, có thể sử dụng sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên trong hỗ trợ điều trị HBV. Tuy nhiên, kết quả này mới chỉ là bước đầu nghiên cứu trên tế bào mang HBV. Cần có các nghiên cứu tiếp theo trên in vivo để chứng minh tác dụng kháng HBV của các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* ở nước ta.

#### 5. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu tác dụng kháng HBV của sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* trên mô hình tế bào Hep3B nhiễm HBV cho thấy: các sản phẩm từ rễ cây *Morinda longissima* có tác dụng ức chế HBV-DNA rõ rệt ở thời điểm 48 giờ và 72 giờ thử nghiệm. Tỷ lệ ức chế lượng HBV-DNA so với chứng âm dao động trong khoảng 49,1-97,2% ở thời điểm 48 giờ và 68,6-90,5% ở thời điểm 72 giờ sau thử thuốc, trong khi nhóm thử Lamivudine (chứng dương) ức chế 86,5% và 86,6% ở thời điểm tương ứng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. WHO (2018), <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-B>.
2. Bui T.T.T, Tran T.T, Nghiem M.N, Rahman P, Tran T.T.T, Dinh M.N.H, Le M.H, Nguyen V.V.C, Thwaites G, Rahman M (2017), *Molecular characterization of hepatitis B virus in Vietnam*, BMC Infect Dis, 2017 Aug 31, 17 (1): 601.
3. Chen C.J. and Yang H.I (2011), "Natural history of chronic hepatitis B REVEALed", *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26 (4): p. 628-38.
4. Toan N.L, Song le.H, Kremsner P.G, Duy D.N, Binh V.Q, Koeberlein B, Kaiser S, Kandolf R, Torresi J, Bock C.T (2006), *Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam*, Hepatology, 2006, 43 (6): p. 1375-84.
5. Nguyễn Xuân Khu (2011) "Nghiên cứu tác dụng bảo vệ tế bào gan của cao Nhó đông (Morinda sp., Rubiaceae) trên thực nghiệm", *Tạp chí Dược học*, T. 51, S.6
6. Nguyễn Kim Phượng, Nguyễn Duy Thuần, Phạm Minh Hưng, Đỗ Trung Điền, (2004), "Tác dụng bảo vệ gan của rễ cây Morinda longissima trên tổn thương gan thực nghiệm", *Tạp chí Dược liệu*, 2004, 9 (3), tr. 95-98.
7. Đào Văn Phan, Lại Thị Vân, Nguyễn Duy Thuần, (2003) "Tác dụng của cây Nhó Đông trên tổn thương gan do Paracetamol ở chuột cống trắng", *Tạp chí Dược liệu*, 8 (5), tr. 139-142. □