

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ TỔNG HỢP HẮC TỐ CỦA CÂY HOA HÒE (*Sophora japonica* L.) TRÊN DÒNG TẾ BÀO U HẮC TỐ B16F10 ỨNG DỤNG TRONG MỸ PHẨM

Lê Quỳnh Loan¹, Nguyễn Lương Hiếu Hòa²,
Lê Văn Minh³, Phùng Bảo Chi⁴, Nguyễn Hoàng Dũng^{1,2*}

¹Viện Sinh học Nhiệt đới, VAST

²Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Tp. Hồ Chí Minh

³Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp. Hồ Chí Minh

⁴Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP.HCM

*Email: dung0018034@gmail.com

Ngày nhận bài: 25/9/2018; Ngày chấp nhận đăng: 15/11/2018

TÓM TẮT

Cây hoa hòe được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền với tác dụng chống một số loại bệnh như viêm, dị ứng, bệnh hô hấp và bệnh tiểu đường. Tuy nhiên, nghiên cứu về tác dụng của cây hoa hòe trong việc ức chế tổng hợp hắc tố (melanin) vẫn chưa được công bố ở Việt Nam. Nghiên cứu này khảo sát hoạt tính ức chế tổng hợp hắc tố, kháng oxy hóa của cây hoa hòe định hướng ứng dụng trong mỹ phẩm. Kết quả cho thấy, ở nồng độ cao 200 µg/mL, cao methanol cây hoa hòe không gây độc tính trên dòng tế bào da u hắc tố B16F10. Tiến hành khảo sát hoạt tính, cao methanol cây hoa hòe cho thấy, cây hoa hòe ức chế 34,9% quá trình tổng hợp hắc tố (melanin) ở nồng độ 200 µg/mL. Cây hoa hòe cũng cho thấy khả năng ức chế enzyme tyrosinase, enzyme chính trong quá trình tổng hợp hắc tố. Khi tiến hành khảo sát hoạt tính chống oxy hóa, cây hoa hòe cho thấy có hoạt tính bắt gốc tự do cao với $IC_{50} = 185,2$ µg/mL. Các kết quả nghiên cứu đã cho thấy cây hoa hòe có rất nhiều triển vọng ứng dụng trong mỹ phẩm như là một thành phần an toàn và làm trắng da.

Từ khóa: Hắc tố, tyrosinase, kháng oxy hóa, *Sophora japonica* L., mỹ phẩm.

1. GIỚI THIỆU

Melanin là một hợp chất phenolic sinh học cao phân tử có vai trò quan trọng trong việc tạo nên sắc tố da ở người. Ở người, melanin được tìm thấy trong da, tóc, tế bào biểu mô sắc tố nằm dưới vồng mạc, tủy xương và lớp trong của tuyến thượng thận, vân mạch của tai trong, và sắc tố mang tế bào thần kinh của một số hạt nhân não sâu [1]. Melanin giúp bảo vệ da chống lại các tác hại của tia cực tím, ngăn chặn tia cực tím thâm nhập vào cơ thể một cách tự nhiên. Melanin cũng rất quan trọng cho độ sắc nét của thị lực, có tác dụng làm giảm thiểu số lượng của chùm ánh sáng vào mắt. Ngoài ra, melanin còn là chất chống oxy hóa, chất kháng khuẩn và nấm gây hại cho cơ thể. Tyrosinase (a tyrosine hydroxylase; EC 1.14.18.1) là enzyme chính, có vai trò oxy hóa L-tyrosine thành 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) và DOPA thành DOPA quinone. Đây là 2 phản ứng đầu tiên và quan trọng nhất trong con đường tổng hợp melanin [1]. Ngoài ra, còn có 2 enzyme khác tham gia vào quá trình tổng hợp melanin là TRP-1 (DHICA oxidation) và TRP-2 (DOPochrome tautomerase) [2, 3]. Tuy nhiên, việc gia tăng lượng melanin tổng hợp ở biểu mô sẽ gây ra hiện tượng đen da.

Một số bệnh về da có thể dẫn đến sự tích lũy vượt mức lượng melanin ở biểu mô. Các bệnh này bao gồm nám da, tàn nhang và tăng sắc tố sau viêm [4]. Biểu hiện bên ngoài của những bệnh này có thể tác động mạnh đến tâm lý người bệnh cũng như làm giảm các hoạt động xã hội, hiệu quả trong công việc [5]. Tuy nhiên, tại nhiều quốc gia, các chất làm trắng da như hydroquinone, corticosteroids, các hợp chất chứa thủy ngân vẫn còn được sử dụng bất chấp sự nguy hại của chúng [6]. Một số chất khác như arbutin, kojic acid, vitamin C cũng được sử dụng nhưng các chất này có nhược điểm là hiệu quả không cao hoặc không bền. Do đó, nhiều công trình đang được thực hiện để tìm ra các hợp chất làm trắng da mới, an toàn và hiệu quả hơn [7-9].

Cây hoa hòe (*Sophora japonica* L.) chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như rutin, genistein, sophoricosid, sophorabiosid, kaempferol glycosid C [10]. Trong y học cổ truyền, cây hoa hòe được sử dụng để trị bệnh như viêm, dị ứng, bệnh hô hấp như viêm phổi, hen suyễn và hạ huyết áp. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, hoa hòe có khả năng kháng khuẩn, chống ung thư, chống lão hóa [10]. Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy cây hoa hòe có khả năng ức chế hắc tố [10]. Tuy nhiên, khả năng làm trắng da của cây hoa hòe vẫn chưa được nghiên cứu nhiều ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiến hành kiểm tra khả năng ức chế quá trình sinh tổng hợp melanin từ cây hoa hòe.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu và hóa chất

Mushroom tyrosinase, L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine), arbutin, DMSO (dimethyl sulfoxide), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) được cung cấp bởi Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A). Môi trường DMEM, huyết thanh bê (fetal calf serum, FBS), trypsin EDTA, Phosphate buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin được cung cấp bởi Invitrogen Corp. (CA, U.S.A). Cây hoa hòe được thu hái tại tỉnh Đắk Lắk.

2.2. Phương pháp nuôi cấy tế bào

Tế bào B16F10 melanoma được cung cấp bởi ATCC (American Type Culture Collection). Tế bào B16F10 được nuôi trên môi trường DMEM bổ sung 10% (v/v) huyết thanh bê (FBS) và 1% (v/v) kháng sinh penicillin/streptomycin ở 37 °C, 5% CO₂, có hơi nước bão hòa.

2.3. Phương pháp tách chiết

Cây hoa hòe khô được nghiền mịn thành dạng bột. Bột hoa hòe được chiết 3 lần bằng dung môi methanol (99,5%) trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết methanol sau đó được lọc qua giấy lọc, cô cạn bằng máy cô chân không ở 35 °C để tạo thành cao methanol. Sau đó, cao methanol được phân đoạn bằng các dung môi hữu cơ để tạo thành các phân đoạn hexane, chloroform, ethyl acetate. Các cao thu nhận được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C trong điều kiện tối.

2.4. Phương pháp xác định hàm lượng melanin

Tế bào B16F10 được nuôi cấy ở mật độ 6×10^4 tế bào trên đĩa 6 giếng (6-well plate). Các mẫu cao được hòa tan trong dung dịch DMSO 0,5%. Sau 24 giờ nuôi cấy, tế bào được ủ với các mẫu cần kiểm tra trong vòng 48 giờ. Dung dịch DMSO 0,5% được sử dụng làm

chứng âm. Sau 48 giờ nuôi cấy, tế bào được thu nhận và hòa tan trong 200 μ L DMSO chứa 10% NaOH. Sau đó, mẫu được đem đun ở 80 °C trong vòng 1 giờ. Hàm lượng hắc tố (melanin) được xác định bằng cách đo quang phổ ở bước sóng 405 nm. Arbutin (200 μ g/mL) được sử dụng làm đối chứng dương [8].

2.5. Phương pháp xác định độc tính (MTT assay)

Để xác định độc tính của cây hoa hòe trên tế bào B16F10 melanoma, thử nghiệm dựa trên sự đổi màu của MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) được sử dụng. Tế bào B16 được nuôi trên đĩa 96 giếng ở mật độ tế bào $2,5 \times 10^3$. Tế bào được ủ với mẫu cần kiểm tra và dung dịch MTT. Sau đó, mẫu được đem đi đo quang phổ ở bước sóng 540 nm [8].

2.6. Phương pháp xác định hoạt tính *in vitro* tyrosinase

Phương pháp này xác định tác dụng trực tiếp của cây hoa hòe lên hoạt tính tyrosinase. Hỗn hợp phản ứng gồm 100 μ L dung dịch mẫu, 22U mushroom tyrosinase, 40 μ L L-DOPA (5 mM) được ủ trong đĩa 96 giếng ở 37 °C. Sau 20 phút, mẫu được đem đo quang phổ ở bước sóng 475 nm. Kojic acid được sử dụng làm chứng dương [2].

2.7. Phương pháp xác định hoạt tính cellulose tyrosinase

Tế bào B16F10 được nuôi cấy ở mật độ 6×10^4 tế bào trên đĩa 6 giếng. Sau đó, tế bào được ly giải bằng cách sử dụng dung dịch PBS chứa 1% Tryton-X100. Dung dịch tế bào sau đó được tiến hành ly tâm lạnh để thu dịch nổi protein. Nồng độ protein được định lượng bằng cách sử dụng protein assay kit PBS chứa 1% Tryton-X100. Tiếp theo, dung dịch tế bào được tiến hành ly tâm lạnh để thu dịch nổi protein. Nồng độ protein tổng số được định lượng bằng cách sử dụng protein assay kit. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 40 mg protein tổng số, 40 μ L L-DOPA (5 mM) và 0,1 M dung dịch PBS được ủ trong đĩa 96 giếng ở 37 °C. Sau 20 phút, mẫu được đem đo quang phổ ở bước sóng 475 nm. Arbutin được sử dụng làm chứng dương [2].

2.8. Phương pháp xác định tính chống oxy hóa (DPPH assay)

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp DPPH. Mẫu được hòa trong dung dịch PBS ở các nồng độ khác nhau. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 100 μ L mẫu, 100 μ L dung dịch DPPH trong đĩa 96 giếng được ủ ở 37 °C trong 30 phút. Sau đó, mẫu được đo quang phổ ở bước sóng 517 nm. Khả năng chống oxy hóa được xác định theo công thức % scavenging activity = $[A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}] / A_{\text{control}} * 100$ [11].

2.9. Phương pháp xử lý số liệu

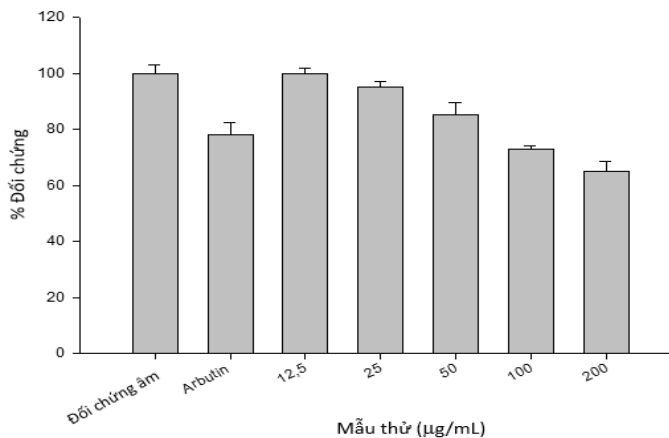
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị số liệu được biểu thị ở giá trị trung bình \pm SD (standard derivation).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát tác dụng của cây hoa hòe lên quá trình tổng hợp melanin

Để kiểm tra tác động của cây hoa hòe lên quá trình tổng hợp melanin, tế bào u hắc tố B16F10 được xử lý với cao methanol của cây hoa hòe ở các nồng độ khác nhau từ

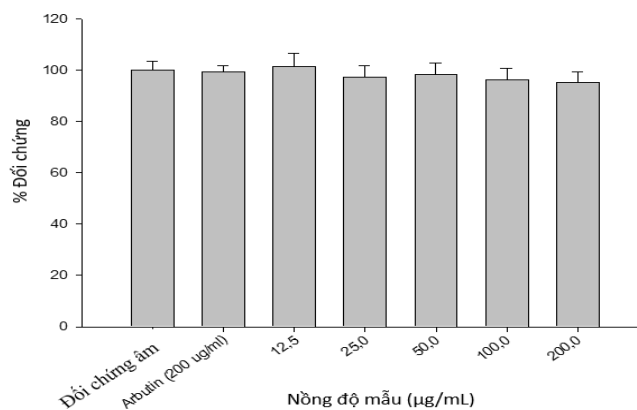
12,5 µg/mL đến 200 µg/mL trong 48 giờ. Sau đó, lượng melanin trong tế bào được xác định (Hình 1). Kết quả khảo sát cho thấy, cao methanol của cây hoa hòe ức chế quá trình tổng hợp melanin tùy thuộc theo nồng độ xử lý. Ở nồng độ 100 µg/mL và 200 µg/mL, cao methanol cây hoa hòe có thể ức chế 27,1% và 34,9% quá trình tổng hợp melanin. Ở mẫu đối chứng, arbutin ức chế 21,9% quá trình tổng hợp melanin ở nồng độ 200 µg/mL. Kết quả cho thấy, cao chiết methanol của cây hoa hòe có hiệu quả tốt hơn đối chứng Arbutin thường được sử dụng trong mỹ phẩm. Cũng có rất nhiều nghiên cứu về khả năng ức chế tổng hợp từ thảo dược thiên nhiên. Theo báo cáo của Briganti *et al.* (2003) đã tổng kết hoạt tính của các loài dâu tằm (*Morus alba*), loài *Spatholobus suberectus* và cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis*) cho thấy chúng có khả năng ức chế melanin lần lượt là $16,3 \pm 4,8\%$, $11,1 \pm 5,3\%$, và $12,1 \pm 0,1\%$ [1]. Kết quả cho thấy, cây hoa hòe ức chế tổng hợp hắc tố tốt hơn các loài trên.



Hình 1. Tác dụng của cao methanol cây hoa hòe lên quá trình tổng hợp melanin của tế bào u hắc tố B16F10.

3.2. Khảo sát tác dụng của cây hoa hòe lên độc tính của tế bào u hắc tố B16F10

Để khảo sát độc tính của cây hoa hòe, tế bào u hắc tố B16F10 được xử lý với cao methanol của cây hoa hòe ở các nồng độ khác nhau từ 12,5 µg/mL đến 200 µg/mL trong 48 giờ. Sau đó, độc tính được xác định bằng thử nghiệm MTT (Hình 2). Kết quả cho thấy, tới nồng độ 200 µg/mL, cây hoa hòe không gây bất kỳ độc tính nào lên tế bào. Kết quả trên cho thấy hoạt tính ức chế tổng hợp hắc tố không phải do nguyên nhân gây chết tế bào là an toàn, có thể hướng đến sử dụng trong mỹ phẩm.



Hình 2. Tác dụng của cao methanol cây hoa hòe lên độc tính tế bào u hắc tố B16F10

3.3. Khảo sát tác dụng của cây hoa hòe lên hoạt tính tyrosinase

Tác dụng của cây hoa hòe lên hoạt tính tyrosinase được tiến hành khảo sát. Kết quả cho thấy, cây hoa hòe gây ức chế trực tiếp hoạt tính tyrosinase và hoạt tính tyrosinase trong tế bào. Ở mẫu đối chứng, arbutin có khả năng ức chế hoạt tính tyrosinase ở đồng tế bào u hắc tố B16F10 ở nồng độ 200 µg/mL là 18,9% (Bảng 1). Ở nồng độ tương tự, cao methanol của cây hoa hòe lần lượt ức chế hoạt tính mushroom tyrosinase và tyrosinase trong tế bào lần lượt là 34,7% và 31,8%. Kết quả này cũng thống nhất với các kết quả trên về khả năng ức chế tổng hợp hắc tố của loài này.

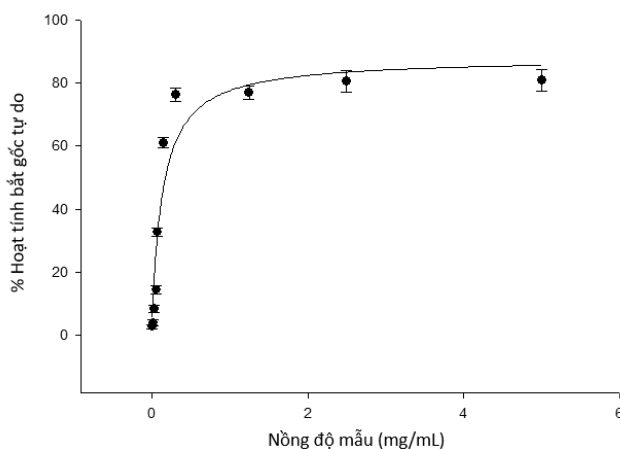
Bảng 1. Tác dụng của cây hoa hòe lên hoạt tính tyrosinase

Nồng độ (µg/mL)	Hoạt tính ức chế tyrosinase (% đối chứng)	
	Cellular tyrosinase	Mushroom tyrosinase
100	18,9 ± 3,48	17,60 ± 0,45
200	31,8 ± 4,25	34,70 ± 1,42
Arbutin (200 µg/mL)	18,9 ± 2,61	NA
Kojic acid (200 µg/mL)	NA	87,7 + 2,16

NA: Không thực hiện

3.4. Khảo sát tác dụng của cây hoa hòe lên hoạt tính chống oxy hóa

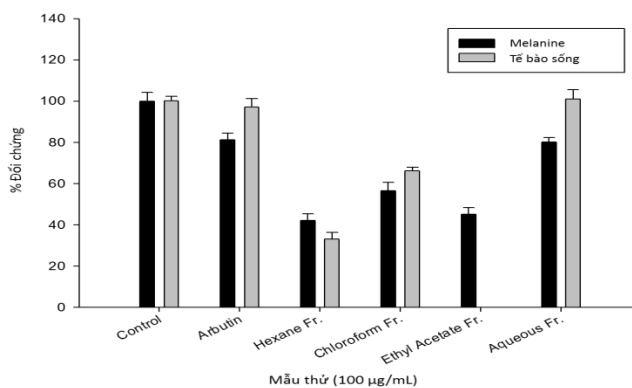
Tiến hành thử nghiệm DPPH để kiểm tra xem cao methanol của cây hoa hòe có hoạt tính chống oxy hóa hay không, chúng tôi. Kết quả cho thấy, cây hoa hòe có hoạt tính chống oxy cao với $IC_{50} = 185,2 \mu\text{g/mL}$ (Hình 3). Gốc tự do cần thiết cho quá trình tổng hợp và làm tăng lượng hắc tố. Stress oxy hóa có thể được cảm ứng bằng việc gia tăng các gốc oxy hoạt động (reactive oxygen species, ROS) hay các gốc tự do khác. Tia cực tím có thể cảm ứng việc sản sinh các gốc oxy hoạt động, gây ra nhiều tác hại cho các mô tế bào. Các gốc oxy hoạt động cũng kích thích quá trình tổng hợp melanin [1, 5]. Cây hoa hòe có tác dụng chống oxy cao ($IC_{50} = 185,2 \mu\text{g/mL}$). Vì vậy, cùng với việc ức chế hoạt tính tyrosinase, khả năng bắt gốc tự do góp phần làm tăng hiệu quả ức chế tổng hợp hắc tố.



Hình 3. Tác dụng chống oxy hóa của cây hòe

3.5. Khảo sát tác dụng của các phân đoạn dung môi của cây hoa hòe lên quá trình tổng hợp melanin

Caio methanol của cây hoa hòe được tiến hành phân đoạn bằng cách sử dụng các dung môi hexane, chloroform và ethyl acetate. Các phân đoạn thu được kiểm tra khả năng ức chế quá trình tổng hợp melanin cũng như độc tính trên tế bào u hắc tố B16F10. Kết quả cho thấy phân đoạn ethyl acetate có tác dụng ức chế tổng hợp hắc tố (54,86%) mà không gây độc cho tế bào (Hình 4).



Hình 4. Tác dụng của các phân đoạn từ cây hoa hòe lên quá trình tổng hợp melanin và độc tính đối với tế bào u hắc tố B16F10.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cây hoa hòe cho hiệu quả ức chế quá trình tổng hợp hắc tố cao nhưng không gây độc cho tế bào. Một trong những nguyên nhân giải thích tác dụng của cây hoa hòe là do hoạt tính chống oxy hóa cao và khả năng ức chế hoạt tính enzyme tyrosinase. Vì cây hoa hòe là một loại là thảo dược truyền thống được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam, Trung Quốc và một số nước châu Á khác, nhóm tác giả đề xuất cây hoa hòe có thể được sử dụng hiệu quả và an toàn như các thành phần làm trắng da ứng dụng trong mỹ phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Briganti S., Camera E., Picardo M. - Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell and Melanoma Research* **16** (2003) 101-110.
2. Kim D.S, Kim S.Y, ParK S.H, Choi Y.G, Kwon S.B, Kim M.K, Na J.I, Youn S.W, and Park K.C. - Inhibitory effects of 4-n-butylresorcinol on tyrosinase activity and melanin synthesis, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **28** (2005) 2216-2219.
3. Eugen J.V, Katrin B and Eckhard N. - Antidiabetic effect of *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum zeylanicum* in vivo and in vitro, *Phytotherapy Research* **19** (2005) 203-206.
4. Barr R.D, Woodger B.A, Rees P.H. - Levels of mercury in urine correlated with the use of skin lightening creams, *American Journal of Clinical Pathology* **59** (1) (1973) 36-40.
5. Cayce K.A, Mc Michael A.J, Feldman S.R. - Hyperpigmentation: an overview of the common afflictions, *Dermatology nursing* **401** (2004) 6-13.

6. Findlay G.H. and De Beer H.A. - Chronic hydroquinone poisoning of the skin from skin lightening cosmetics. A South African epidemic of ochronosis of the face in dark-skinned individuals, *South African Medical Journal* **57** (6) (1980) 187-190.
7. Solano F., Briganti S., Picardo M. and Ghanem G. - Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects, *Pigment Cell and Melanoma Research* **19** (6) (2006) 550-571.
8. Tim M. - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods* **65** (1-2) (1983) 55-63.
9. Kim Y.J., Uyama H. - Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition, mechanism and perspective for the future, *Cellular and Molecular Life Sciences* **62** (5) (2005) 1707-1723.
10. Lo Y.H, Lin R.D, Lin Y.P, Liu Y.L, and Lee M.H - Active constituents from *Sophora japonica* exhibiting cellular tyrosinase inhibition in human epidermal melanocytes, *Journal of Ethnopharmacology* **124** (3) (2009) 625-629.
11. Blois M.S - Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **181** (1958) 1199-2000.

ABSTRACT

DEPIGMENTING EFFECT OF *Sophora japonica* L. IN B16F10 MELANOMA CELLS

Le Quynh Loan¹, Nguyen Luong Hieu Hoa²,
Le Van Minh³, Phung Bao Chi⁴, Nguyen Hoang Dung^{1, 2*}

¹*Institute of Tropical Biology, VAST*

²*Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City, Vietnam*

³*Research Center of Ginseng and Medicinal Material, NIMM*

⁴*University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City*

*Email: dung0018034@gmail.com

Sophora japonica L. has been used as a traditional medicine to treat various diseases such as inflammation, allergy and diabetic. However, the effect of this plant on the melanin inhibitory effect is not well-studied in Vietnam. In this study, the melanin inhibitory and antioxidant effect of *Sophora japonica* L. used in cosmetics was investigated. The results showed that *Sophora japonica* L. exhibited low cytotoxicity at even high concentration (200 µg/mL). The effects on melanogenesis of cultured B16 melanoma cells, mushroom tyrosinase activity, and free radical scavenging activity were further assessed. The methanol extracts of this plant showed the suppression of melanin synthesis. At the concentration of 200 µg/mL, the methanol extract of this plant could inhibit 34.9% of melanin content in B16F10 melanoma cells. It also showed good anti-oxidative activity (IC₅₀ = 185.2 µg/mL) and inhibited cellular tyrosinase activity. In conclusion, *Sophora japonica* L. extract might be useful and safe as a new whitening agent in cosmetics.

Keywords: Melanin, tyrosinase, antioxidant, *Sophora japonica* L., cosmetics.