

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH LÀM TRẮNG DA CỦA RAU DIẾP CÁ (*HOULTUYNIA CORDATA* THUNB.) TRÊN DÒNG TẾ BÀO U HẮC TỔ B16F10 ỨNG DỤNG TRONG MỸ PHẨM

Nguyễn Hoàng Dũng^{***}, *Lê Quỳnh Loan*^{*}, *Kim Eun-Ki*^{**}, *Lê Văn Minh*^{***}, *Đặng Trần Quân*^{****},
Trần Thị Thanh Loan^{****}

Mở đầu: Hiện nay, có rất nhiều hóa chất được dùng làm trắng da trong mỹ phẩm như hydroquinone, corticosteroid và những sản phẩm có chứa thủy ngân. Tuy nhiên, những chất này đều có những nhược điểm riêng như kém bền, gây tác dụng phụ bất lợi hoặc không an toàn cho sức khỏe người dùng.

Mục tiêu: Tìm kiếm các hợp chất mới có nguồn gốc tự nhiên có khả năng làm trắng da ứng dụng trong mỹ phẩm.

Phương pháp: Khảo sát hoạt tính làm trắng da cũng như độc tính của rau diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb.) trên dòng tế bào da u sắc tố B16F10. Đồng thời, khảo sát ảnh hưởng của rau diếp cá lên hoạt tính tyrosinase cũng như khả năng bắt gốc tự do của rau diếp cá.

Kết quả: Ở nồng độ cao 200µg/ml, chiết xuất rau diếp cá không gây bất kỳ độc tính trên dòng tế bào da u sắc tố B16F10. Tiến hành khảo sát hoạt tính cao dịch chiết methanol rau diếp cá cho thấy rau diếp cá ức chế 24,8% quá trình tổng hợp sắc tố (melanin) ở nồng độ 100µg/ml. Khi tiến hành khảo sát hoạt tính chống oxy hóa, rau diếp cá cho thấy có hoạt tính bắt gốc tự do cao với $IC_{50} = 7,71 \mu\text{g/ml}$.

Kết luận: Những kết quả nhận được đã cho thấy rau diếp cá có rất nhiều triển vọng ứng dụng trong mỹ phẩm như là một thành phần an toàn và làm trắng da.

Từ khóa: gen sinh u hắc tố, trắng da, thảo dược, *Houttuynia cordata* Thunb.

ABSTRACT

DEPIGMENTING EFFECT OF *HOULTUYNIA CORDATA* THUNB. IN B16F10 MELANOMA CELLS

Nguyen Hoang Dung, Le Quynh Loan, Kim Eun-Ki, Le Van Minh, Dang Tran Quan,
Tran Thi Thanh Loan * Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Vol. 20 - No 2 - 2016: 19 - 24

Background: Many of the traditionally used skin lightening products such as hydroquinone, corticosteroids and mercury-containing products are still used in many countries, in spite of serious health concerns, including irreversible cutaneous damage, ochronosis, accumulating of mercury in the body.

Objectives: To find efficient natural depigmenting agents could be used in cosmetics.

Method: We examined several *Houttuynia cordata* Thunb for melanogenesis inhibition and toxicity. The effect of *Houttuynia cordata* Thunb on tyrosinase activity and free scavenging activity was also investigated.

Results: *Houttuynia cordata* Thunb 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

*Viện Sinh Học Nhiệt Đới, TPHCM

** Đại học Inha, Incheon, Hàn Quốc

***Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành

**** Bộ môn Mô Phôi, Đại học Y Dược, TP.HCM

Tác giả liên lạc: TS. Trần Thị Thanh Loan

ĐT 0913625082

Email: nml2001@yahoo.com

scavenging activity were further assessed. The methanol extracts of this plant showed the suppression of melanin synthesis. Melanin content was dose dependently decreased by this herb extract as compared with control cells. It also showed good anti-oxidative activity ($IC_{50}=7.71 \mu\text{g/ml}$) and inhibited cellular tyrosinase activity

Conclusion: This result showed that *Houttuynia cordata* Thunb extract might be useful and safe as a new whitening agent in cosmetics.

Key words: melanogenesis, depigmentation, herbs, *Houttuynia cordata* Thunb.

MỞ ĐẦU

Melanin là một hợp chất phenolic sinh học cao phân tử có vai trò quan trọng trong việc tạo nên sắc tố ở da người. Các hắc tố (melanin) trong da được sản xuất bởi tế bào hắc tố nằm trong lớp nền của biểu mô. Trong tế bào hắc tố, melanin được tổng hợp trong một bào quan đặc biệt gọi là melanosome. Melanosome chứa nhiều enzyme cần thiết cho quá trình tổng hợp melanin⁽¹⁾. Enzyme chính, tyrosinase (a tyrosine hydroxylase; EC 1.14.18.1), có vai trò oxy hóa L-tyrosine thành 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) và DOPA thành DOPA quinone. Đây là hai phản ứng đầu tiên và quan trọng nhất trong con đường tổng hợp melanin⁽³⁾. Ngoài ra, còn có 2 enzyme khác tham gia vào quá trình tổng hợp melanin là TRP-1 (DHICA oxidation) và TRP-2 (DOPACHrome tautomerase)⁽²⁾.

Tuy nhiên, việc gia tăng lượng melanin tổng hợp ở biểu mô sẽ gây ra hiện tượng đen da. Ngoài ra, một số bệnh về da có thể dẫn đến việc 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⁾. Những 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 hay tự kỷ⁽⁶⁾. Do đó, có rất nhiều nghiên cứu được tiến hành và rất nhiều hoạt chất có khả năng làm trắng da đang được sàng lọc^(11,5). 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 tác dụng nguy hại của chúng⁽¹⁰⁻⁷⁾. Một số chất khác như arbutin, kojic acid, vitamin C cũng được sử dụng nhưng những chất này có nhược điểm là

hiệu quả không cao hoặc không bền. Do đó, nhiều công trình đang được tiến hành để tìm ra các hợp chất làm trắng da mới, an toàn và hiệu quả hơn. Những hợp chất làm trắng da lý tưởng để sử dụng trong mỹ phẩm là những hợp chất có thể ức chế quá trình sản xuất melanin nhưng không gây chết cho tế bào và có nguồn gốc thiên nhiên.

Rau diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb) chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như aristolactams, 5,4-dioxoaporphines, oxoaporphines, amides, benzenoids, steroids...⁽¹¹⁾. Trong y học cổ truyền, rau diếp cá được sử dụng để trị bệnh như tiêu chảy, bệnh lý và tăng cường sức đề kháng. Các nghiên cứu gần đây cho thấy rau diếp cá có khả năng kháng khuẩn, tiêu diệt ký sinh trùng, chống ung thư, chữa mụn trứng cá, chống lão hóa⁽⁸⁾. Tuy nhiên, khả năng làm trắng da của rau diếp cá vẫn chưa được nghiên cứu chuyên sâu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành kiểm tra khả năng ức chế quá trình sinh tổng hợp melanin từ rau diếp cá.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

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).

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.

Phương pháp tách chiết

Rau diếp cá khô được nghiền mịn thành dạng bột. Bột rau diếp cá được chiết ba 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.

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). Sau 24 giờ nuôi cấy, tế bào được ủ với các mẫu cần kiểm tra trong vòng 48 giờ. Sau 48 giờ nuôi cấy, tế bào được thu nhận và được hòa tan trong 200µl 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 405nm. Arbutin (200µl/ml) được sử dụng như là đối chứng dương⁽⁹⁾.

Phương pháp xác định độc tính (MTT assay)

Để xác định độc tính của rau diếp cá 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 2.5×10^3 . 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 540nm⁽⁹⁾.

Phương pháp xác định hoạt tính *in vitro* tyrosinase

Phương pháp này để xác định tác dụng

trực tiếp của rau diếp cá lên hoạt tính tyrosinase. Hỗn hợp phản ứng gồm 100µl dung dịch mẫu, 22U mushroom tyrosinase, 40µl L-DOPA (5mM) được ủ trong đĩa 96 giếng ở 37°C. Sau 20 phút, mẫu được đem đo quang phổ ở bước sóng 475nm. Kojic acid được sử dụng làm chứng dương⁽⁶⁾.

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⁽¹¹⁾.

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 µl mẫu, 100 µl dung dịch DPPH trong đĩa 96 giếng được ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó mẫu được đem đi đo quang phổ ở bước sóng 517nm. Khả năng chống oxy hóa được xác định theo công thức % scavenging activity = $[A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}] / A_{\text{control}} * 100$.

Phương pháp xử lý số liệu

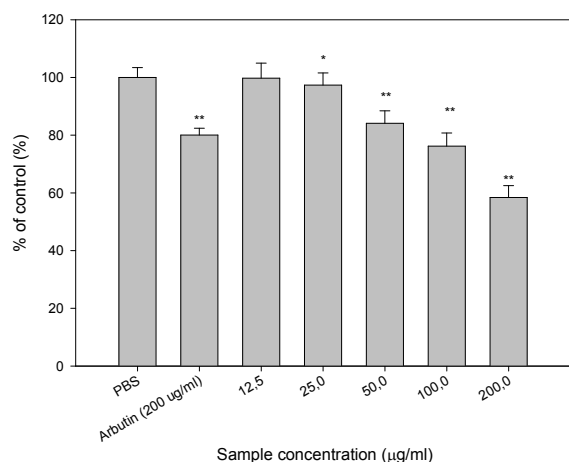
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị số liệu được biểu thị ở giá trị trung bình \pm SD (standard derivation). Sự khác biệt giữa các mẫu được kiểm tra bằng t-test với giá trị $p < 0,05$ được xem là khác biệt có ý nghĩa.

KẾT QUẢ

Khảo sát tác dụng của rau diếp cá lên quá trình tổng hợp melanin

Để kiểm tra tác động của rau diếp cá lên quá trình tổng hợp melanin, tế bào u hắc tố B16F10 được xử lý với cao methanol của rau diếp cá ở các nồng độ khác nhau từ 12,5µg/ml đến 200µg/ml trong 48 giờ. Sau đó, lượng hắc tố (melanin) trong tế bào được xác định (hình 1).

Kết quả khảo sát cho thấy, cao methanol của rau diếp cá ức chế quá trình tổng hợp melanin tùy thuộc theo nồng độ xử lý. Ở nồng độ 100µg/ml và 200µg/ml, cao methanol rau diếp cá có thể ức chế 24,8% và 42,6% quá trình tổng hợp hắc tố. Ở mẫu đối chứng, Arbutin ức chế 20% quá trình tổng hợp melanin ở nồng độ 200µg/ml. Kết quả cho thấy, cao chiết methanol của rau diếp cá có hiệu quả tốt hơn đối chứng Arbutin thường được sử dụng trong mỹ phẩm.



Hình 1. Tác dụng của cao methanol rau diếp cá lên quá trình tổng hợp melanin của tế bào u sắc tố B16F10. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$: khác biệt có ý nghĩa so với nhóm đối chứng

Khảo sát tác dụng của rau diếp cá lên hoạt tính tyrosinase

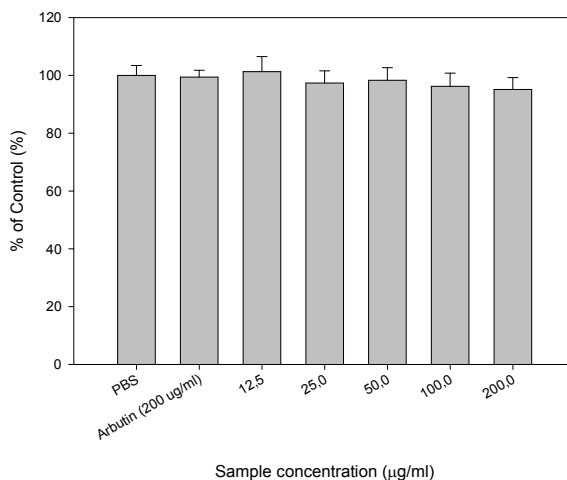
Tác dụng của rau diếp cá lên hoạt tính tyrosinase được tiến hành khảo sát. Kết quả cho thấy rau diếp cá không gây ức chế trực tiếp hoạt tính tyrosinase. Tuy nhiên, rau diếp cá có khả năng ức chế hoạt tính của tyrosinase trên dòng tế bào u hắc tố B16F10 (Bảng 1) theo nồng độ tăng dần. Ở mẫu đối chứng, Arbutin có khả năng ức chế hoạt tính tyrosinase ở dòng tế bào u hắc tố B16F10 ở nồng độ 200µg/ml là 18,92%.

Khảo sát tác dụng của rau diếp cá lên hoạt tính chống oxy hóa

Để kiểm tra xem cao methanol của rau diếp cá có hoạt tính chống oxy hóa hay không, chúng tôi tiến hành thử nghiệm DPPH. Kết quả cho

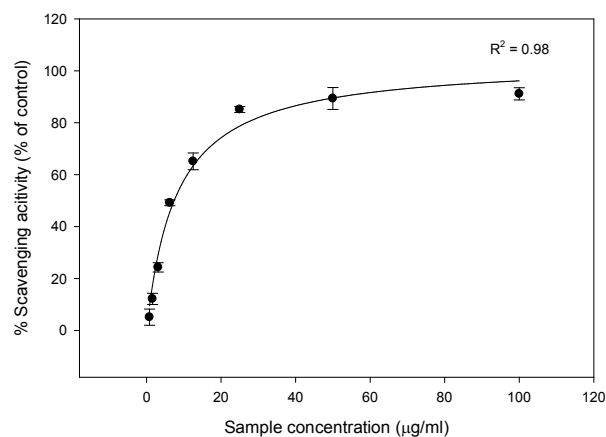
Khảo sát tác dụng của rau diếp cá lên độc tính của tế bào u sắc tố B16F10

Để khảo sát độc tính của rau diếp cá, tế bào u sắc tố B16F10 được xử lý với cao methanol của rau diếp cá 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 200µg/ml, rau diếp cá không gây bất kỳ độc tính nào lên tế bào.



Hình 2. Tác dụng của cao methanol rau diếp cá lên độc tính tế bào u sắc tố B16F10

thấy rau diếp cá có hoạt tính chống oxy cao với $IC_{50} = 7,71\mu\text{g/ml}$ (Hình 3)

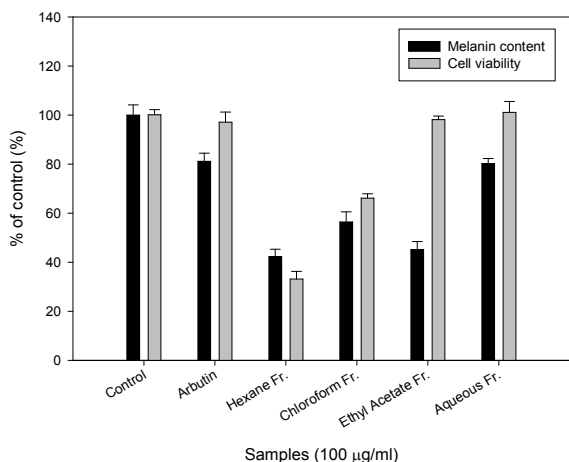


Hình 3. Tác dụng chống oxy hóa của rau diếp cá

Bảng 1. Tác dụng của rau diếp cá lên hoạt tính tyrosinase

Nồng độ (µg/ml)	Hoạt tính tyrosinase (% đối chứng)	
	Cellular tyrosinase	Mushroom tyrosinase
100	81,12 ± 3,48	102 ± 0,45
200	68,23 ± 4,25	100 ± 1,42
Arbutin (200 µg/ml)	81,08 ± 2,61	100 ± 0,45

Khảo sát tác dụng của các phân đoạn dung môi của rau diếp cá lên quá trình tổng hợp melanin



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

Cao methanol của rau diếp cá 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 cho tác dụng ức chế tổng hợp hắc tố (54,86%) mà không gây độc cho tế bào (Hình 4).

BÀN LUẬN

Hiện nay, có rất nhiều chất có khả năng làm trắng da đang được nghiên cứu cũng như sử dụng. Tuy nhiên, rất nhiều chất có hoạt tính không cao, gây ra tác dụng phụ khi sử dụng trong thời gian dài hoặc không bền. Vì thế, nhiều nỗ lực đang được tiến hành để tìm ra các hợp chất làm trắng da tiềm năng có nguồn gốc tự nhiên.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát tác dụng của rau diếp cá lên quá trình tổng hợp melanin cũng như xem xét độc tính của nó trên tế bào. Kết quả cho thấy cao methanol của rau diếp cá ức chế hiệu quả quá trình tổng hợp hắc tố và không gây độc cho tế bào ở nồng độ 200 µg/ml. 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. Rau diếp cá có tác dụng chống oxy cao (IC₅₀ = 7,71µg/ml). Khi khảo sát ảnh hưởng của rau diếp cá lên hoạt tính tyrosinase, kết quả cho thấy rau diếp cá có khả năng ức chế hoạt tính tyrosinase trên dòng tế bào u hắc tố B16F10 nhưng không ức chế trực tiếp hoạt tính tyrosinase *in vitro*. Kết quả cho thấy, rau diếp cá có thể tác động lên sự biểu hiện của một số gen liên quan đến quá trình tổng hợp sắc tố như tyrosinase, TRP-1, TRP-2. Các kết quả trên cho thấy tác dụng làm trắng da của rau diếp cá là do kết hợp hoạt tính chống oxy hóa và khả năng ức sự biểu hiện của một số gen liên quan đến quá trình tổng hợp sắc tố.

Sau khi phân đoạn bằng dung môi, phân đoạn ethyl acetate cho tác dụng hiệu quả trong việc ức chế quá trình tổng hợp melanin và không gây độc cho tế bào. Phân đoạn này đang được tiếp tục tách chiết nhằm xác định các chất có hoạt tính.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, rau diếp cá 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 rau diếp cá là do hoạt tính chống oxy hóa cao và khả năng ức chế sự biểu hiện của một số gen liên quan đến quá trình tổng hợp sắc tố. Vì rau diếp cá là một loại rau mùi và thảo dược truyền thống được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam, Trung Quốc và một số nước châu Á khác, chúng tôi đề nghị

ràng rau diếp cá 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. Barr RD, Woodger BA and Rees PH (1973). Levels of mercury in urine correlated with the use of skin lightening creams. *Am. J. Clin. Pathol*, 59, pp. 36-40.
2. Blois MS (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, pp. 1199-2000.
3. Briganti S, Camera E and Picardo M (2003). Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. *Pigment Cell Res*, 16, pp. 101-110.
4. Cayce KA, McMichael AJ and Feldman SR (2004). Hyperpigmentation: an overview of the common afflictions. *Dermatol Nurs*, 401, pp. 6-13.
5. Findlay GH and de Beer HA (1980). Chronic hydroquinone poisoning of the skin from skin lightening cosmetics, A South African epidemic of ochronosis of the face in dark-skinned individuals. *S. Afr. Med. J*, 57, pp. 187-190.
6. Kim DS, et al (2005). Inhibitory Effects of 4-n-Butylresorcinol on Tyrosinase Activity and Melanin Synthesis. *Biol. Pharm. Bull*, 28, pp. 2216-2219.
7. Kim YJ and Uyama H (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition, mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci*, 62, pp. 1707-1723.
8. Kumar M, Prasad SK, Hemalatha S (2014). A current update on the phytopharmacological aspects of *Houttuynia cordata* Thunb. *Pharmacogn Rev*, 8, pp. 22-35.
9. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, pp. 55-63.
10. Solano F, et al (2006). Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res*, 19, pp. 550-571.
11. Verspohl EJ, Bauer K and Neddermann E (2005). Antidiabetic effect of *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum zeylanicum* *vivo* and *in vitro*. *Phytother Res*, 19, pp. 203-206.

Ngày nhận bài báo: 24/11/2015

Ngày phản biện nhận xét bài báo: 30/11/2015

Ngày bài báo được đăng: 20/02/2016