

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG ỨC CHẾ CỦA CURCUMIN TỪ NGHỆ *CURCUMA LONGA* TỚI HOẠT TÍNH CỦA PHOSPHOLIPAZA A_2 , ENZYM TÁCH RA TỪ NỌC RẮN HỔ MÀNG (*NAJA NAJA*)

Đến Tòa soạn 10-7-2007

TRẦN ĐÌNH TOẠI, NGUYỄN THIANH HẠNH, NGUYỄN BÍCH THỦY

Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

SUMMARY

Studies on the inhibition of curcumin from Curcuma longa on phospholipase A_2 from cobra venom (Naja naja) were carried out. The phospholipase was fractionated by ion-exchange chromatography on a CM-cellulose column (10 x 60 mm) following chromatography on a superdex G-75 column (16 x 90 mm) and its biochemical properties were studied accurately. The phospholipid's hydrolysis catalyzed by phospholipase A_2 has been inhibited by curcumin from Curcuma longa. It seems that, the phospholipase A_2 inhibition is following the purely competitive mechanism. The constant of phospholipide hydrolysis K_1 and inhibition constant k_2 have been calculated: $K_1 = 5.8 \times 10^{-4} M$, $k_2 = 0.21 \cdot 10^{-3} \cdot s^{-1}$.

I - MỞ ĐẦU

Phospholipaza A_2 (EC 3.1.1.4) thuộc nhóm các enzym thủy phân liên kết carboxy ester (EC 3.1.1 Carboxylic Ester Hydrolases) [1]. Phospholipaza A_2 có tên phân loại (tên khoa học) là: phosphatidylcholine 2-acylhydrolase và các tên khác: lecithinase A; phosphatidase; phosphatidolipase; phospholipaza A.

Phospholipaza A_2 là enzym ngoại bào [2], được tách từ các nguồn như nọc rắn độc [3 - 5], não thỏ [6].

Phospholipaza là enzym thủy phân phospholipide giải phóng axit béo. Các sản phẩm thủy phân của các phospholipaza gọi là lysophospholipit có thể là cơ chất cho các enzym acyltransferaza. Về cơ chế, phospholipaza A_2 tác động tới vị trí C-2 trong màng phospholipide, giải phóng axit arachidonic. Axit arachidonic được giải phóng sẽ là cơ chất để tổng hợp prostaglandins và leukotrien.

Phospholipaza A_2 có hoạt tính sinh học rất cao, có bản chất myotoxin [7] có tính chất kháng khuẩn và kháng virus rất mạnh [8], được ứng dụng nhiều trong y học.

Các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, ion canxi có tác dụng hoạt hoá [9], trong khi đó các ion kẽm, bari, mangan ... có tác dụng ức chế hoạt tính của phospholipaza A_2 [10]. Các nghiên cứu gần đây còn cho thấy rằng, curcumin từ nghệ *Curcuma longa* cũng có tác dụng ức chế mạnh hoạt tính của phospholipaza A_2 [11]. Như vậy, ngoài những tác dụng y học quý khác, củ nghệ còn là phương tiện để bào chế thuốc chữa rắn cắn với tác dụng ức chế phospholipaza A_2 . Để hiểu rõ thêm tác động của curcumin, chúng tôi nghiên cứu động học của hiện tượng ức chế này.

II - NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu, hoá chất và thiết bị nghiên cứu

a) Nguyên liệu

- Nọc rắn hổ mang (*Naja naja*) đông khô (dạng ampul 5 g) để tách phospholipaza A₂ được mua từ làng nghề nuôi rắn Vĩnh Sơn, huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc.

- Enzym phospholipaza A₂ thu được từ nọc rắn thô bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên CM-cellulose [12].

b) Dụng cụ và hoá chất

- Cột sắc ký trao đổi ion -CM-cellulose.

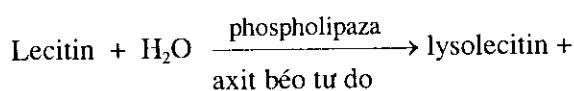
2. Phương pháp nghiên cứu

a) Phương pháp xác định protein [13]

Hàm lượng protein trong mẫu nọc rắn và dung dịch được xác định bằng phương pháp quang phổ: đo hấp thụ protein ở các bước sóng 260 và 280 nm trên máy quang phổ UV 1601 Shimadzu.

b) Phương pháp xác định hoạt độ phospholipaza nọc rắn [14]

Nguyên tắc của phương pháp:



Lượng axit được đo bởi sự mất màu của thuốc chỉ thị ở 578 nm.

III - KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ỨC CHẾ PHOSPHOLIPAZA A₂ BỞI CURCUMIN

Để nghiên cứu động học của hiện tượng ức

chế, trước hết cần xem xét động học tạo sản phẩm $P = f(t)$ khi chưa có chất ức chế. Sau đó xem xét ảnh hưởng của chất ức chế tới động học như thế nào.

Chúng tôi sử dụng cơ chất với các nồng độ khác nhau trong các điều kiện pH và nồng độ enzym [E] thích hợp. Kết quả xem xét động học tạo sản phẩm $P = f(t)$ khi chưa có chất ức chế được trình bày trong bảng 1.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất ức chế tới động học của phản ứng được trình bày trong bảng 2 và 3.

Từ các kết quả thực nghiệm ghi trong bảng 1, dựa vào phương pháp gần đúng Niuton-Gregori [15] cho phép tính tốc độ ban đầu (V_0) của phản ứng. Các giá trị tốc độ ban đầu (V_0) của phản ứng được ghi trong bảng 4.

Từ các kết quả tính toán thu được trong bảng 4, lấy các giá trị nghịch đảo của $[S_0]$ và V_0 vẽ đồ thị $1/V_0 = f(1/[S_0])$ với các giá trị nồng độ chất ức chế khác nhau, thu được các đường thẳng cắt nhau tại một điểm trên trục tung (hình 1).

Đồ thị thu được là một chùm đường thẳng cắt nhau tại trục tung. Điều này chứng tỏ, đây là hiện tượng ức chế cạnh tranh (purely competitive inhibition). Trong trường hợp này, chất ức chế chỉ kết hợp với enzym, không kết hợp với phức enzym - cơ chất [ES], đồng thời chất ức chế không gây ảnh hưởng tới V_M chỉ gây ảnh hưởng tới K_M . Hiện tượng ức chế này được mô tả theo sơ đồ dưới đây [15]:

Bảng 1: Động học của quá trình tạo sản phẩm $P = f(t)$ từ các nồng độ cơ chất [S] khác nhau trong các điều kiện pH_{opt} khi chưa có chất ức chế

t (phút) [S], mg/ml	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1,0	1,67	3,34	5,00	6,7	8,5	10,0	11,6	13,1	14,6	15,9
0,625	1,43	2,86	4,29	5,7	7,1	8,5	9,8	11,1	12,4	13,6
0,500	1,33	2,66	4,00	5,2	6,4	7,8	9,1	10,3	11,4	12,4
0,417	1,25	2,50	3,75	4,9	6,0	7,1	8,2	9,2	10,2	11,0
0,264	1,00	2,00	3,00	4,0	5,0	6,0	7,0	7,8	8,6	9,3

Bảng 2: Động học của quá trình tạo sản phẩm $P = f(t)$ từ các nồng độ cơ chất [S] khác nhau trong các điều kiện pH_{opt} khi chất ức chế $[I] = 0,6 \cdot 10^{-3}$, M

t (phút) [S], mg/ml	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1,677	1,67	3,34	5,00	6,68	8,35	10,0	11,6	13,1	14,6	16,0
1,00	1,43	2,86	4,29	5,71	7,10	8,5	9,8	11,1	12,4	13,6
0,625	1,18	2,36	3,54	4,69	5,89	7,02	8,24	9,3	10,3	11,3
0,500	1,04	2,08	3,12	4,15	5,18	6,23	7,21	8,17	9,12	9,93
0,33	0,83	1,66	2,48	3,31	4,10	4,94	5,75	6,50	7,32	8,08

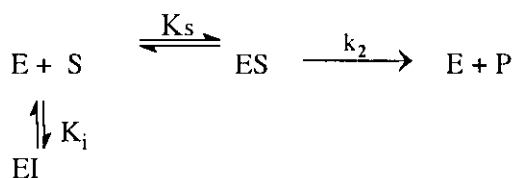
Bảng 3: Động học của quá trình tạo sản phẩm $P = f(t)$ từ các nồng độ cơ chất [S] khác nhau trong các điều kiện pH_{opt} khi chất ức chế $[I] = 3,0 \cdot 10^{-3}$, M

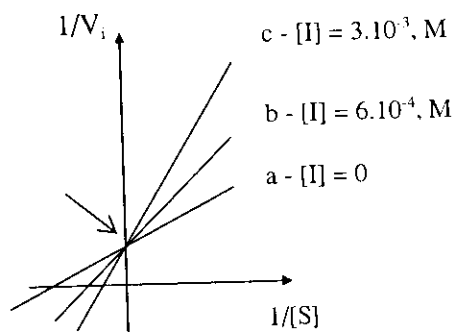
t (phút) [S], mg/ml	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
5,000	1,56	3,11	4,66	6,21	7,7	9,31	10,85	12,3	13,7	15,1
1,677	1,00	2,00	2,99	4,00	5,01	5,98	7,01	7,8	8,6	9,4
1,000	0,77	1,43	2,29	3,05	3,83	4,57	5,31	6,08	6,75	7,5
0,625	0,57	1,13	1,7	2,26	2,83	3,41	3,94	4,48	5,05	5,5
0,500	0,45	0,89	1,33	1,73	2,11	2,55	3,01	3,5	3,86	4,32

Bảng 4: Tốc độ ban đầu (V_0) của phản ứng khi chưa và có chất ức chế [I]:

a- $[I] = 0$, b- $[I] = 0,6 \cdot 10^{-3}$, M, c- $[I] = 3,0 \cdot 10^{-3}$, M

$[I] = 0$		$[I] = 0,6 \cdot 10^{-3}$, M		$[I] = 3,0 \cdot 10^{-3}$, M	
[S]. 10^4 , M	$V_0 \cdot 10^6$, M. min 10^{-1}	[S]. 10^4 , M	$V_0 \cdot 10^6$, M. min 10^{-1}	[S]. 10^4 , M	$V_0 \cdot 10^6$, M. min 10^{-1}
1,000	1,67	1,677	1,62	5,000	1,56
0,625	1,43	1,000	1,43	1,677	1,00
0,500	1,33	0,625	1,18	1,000	0,77
0,417	1,25	0,500	1,04	0,625	0,57
0,264	1,00	0,330	0,83	0,500	0,45





Hình 1

Khi ấy, có thể tính tốc độ phản ứng như sau:

$$V_i = k_2 [ES]$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] = [ES] \left[\frac{K_s}{[S]} + 1 + \frac{[I]}{K_i} \cdot \frac{K_s}{[S]} \right]$$

$$[E]_0 = [ES] \left\{ 1 + \frac{K_s}{[S]} \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \right\} \rightarrow [ES] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{K_s}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)};$$

Như vậy, tốc độ phản ứng có thể viết bằng biểu thức sau:

$$V_i = \frac{k_2 [E]_0}{1 + \frac{K_s}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}; \quad V_i = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

$$\text{hoặc } V_i = \frac{V_M [S]}{K_{Mi} + [S]}$$

$$K_{Mi} = K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

$$K_i = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

$$V_{Mi} = k_2 [E]_0$$

$$\text{Suy ra: } V_{Mi} = V_M$$

Từ công thức cho thấy, chất ức chế hoàn toàn cạnh tranh không gây ảnh hưởng tới V_M chỉ gây ảnh hưởng tới K_M .

III - KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu ảnh hưởng ức chế curcumin từ nghệ *Curcuma longa* tới phản ứng thủy phân phospholipide xúc tác bởi phospholipaza A₂ tách từ nọc rắn hổ mang (*Naja naja*). Kết quả cho thấy, curcumin có tác dụng ức chế mạnh hoạt tính của phospholipaza A₂ và hiện tượng ức chế này xảy ra theo cơ chế cạnh tranh.

Đã tính toán các thông số động học của phản ứng thủy phân phospholipit xúc tác bởi phospholipaza A₂.

$$K_1 = 5,8.10^{-4} \text{ M}, k_2 = 0,21.10^{-3} .s^{-1}$$

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) Enzyme Nomenclature (1992). Recommendations
2. Van den Bosch H. Biochim. Biophys. Acta 604, 191 - 246 (1980).
3. K. Saito and D. J. Hanahan. Biochemistry 1, 521 - 532 (1962).
4. Carlos Santamarora, Silda Larios, Steve Quirús, Javier Pizarro-Cerda, Jean-Pierre Gorvel, Bruno Lomonte, and Edgardo Moreno. Antimicrob Agents Chemother, 49(4), 1340 - 1345 (2005).
5. Angulo Yamileth, Lomonte Bruno. Facultad de Microbiologia, Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica (2003).
6. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A₂. Biochemical Pharmacology, 66(10), 1993 - 2000.
7. Naruhiro Tanaka, Tetsuo Ishida, Sinsuke Hukuda, and Kihachiro Horiike. J. Biochem. Vol. 127, 985 - 991 (2000).
8. J. M. Gutioorrez, and B. Lomonte. Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms, 321-352 In R. M. Kini (ed.), Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function, and mechanism. John Wiley & Sons, Chichester, England (1997).
9. J. B. Harris, B. D. Grubb, C. A. Maltin and R. Dixon. The neurotoxicity of the venom phospholipases A₂, notexin and taipoxin. Exp. Neurol. 161, 517 - 526 (2000).
10. E. Dennis. Phospholipase A₂ Mechanism: Inhibition and Role in Arachidonic Acid Release, Drug Devt Res, 10, 205 (1987).
11. J. Golec, C. Hedgecock, R. Murdoch, and W. Tully. A New Approach to Phospholipase-A₂ Inhibition, Tetrahedron Lett, 33, 551 (1992).
12. M. M. Melo, G. G. Habermehl, N. J. F. Oliveira, E. F. Nascimento, M. M. B. Santos, M. Lycia. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 57 (1), 7 - 17 (2005).
13. Trần Đình Toại, Nguyễn Văn Thiết, Nguyễn Thanh Hạnh. Nghiên cứu chiết tách và hoạt tính sinh học của enzyme thủy phân Phospholipase A₂, tách ra từ nọc rắn hổ mang Việt nam *Naja naja*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ (2006).
14. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951).
15. X. Брокерхоф, Р. Дженсен. Липолитические Ферменты, Издательство "Мир" Москва, 247 - 249 (1978).
16. Trần Đình Toại. Động học các quá trình xúc tác sinh học. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội (2005).