

# Xác định khả năng ức chế rotavirus của hoạt chất genipin

Nguyễn Thanh Việt<sup>1</sup>, Thân Văn Thái<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành

\*tvthai@ntt.edu.vn

## Tóm tắt

Rotaviruses (RVs) là nguyên nhân chủ yếu gây bệnh tiêu chảy cấp tính đối với trẻ em trên toàn thế giới nhưng lại không có thuốc điều trị đặc hiệu. Genipin là hợp chất tự nhiên trong cây dành dành có nhiều đặc tính dược lý như khả năng kháng viêm, kháng apoptotic, kháng vi sinh vật và khối u. Trong nghiên cứu này, hoạt chất genipin được thử nghiệm hoạt tính ức chế RVs trong điều kiện in-vitro. Ngưỡng gây độc tế bào MA104 của genipin là  $\geq 150\mu\text{M/ml}$ ; Hiệu quả ức chế RVs của genipin sử dụng ở nồng độ 10-150 $\mu\text{M/ml}$  so với đối chứng lần lượt như sau: xử lý RVs với genipin trước và trước/sau gây nhiễm là 28.7-54.1% và 47.3-90.0%; xử lý tế bào MA104 với genipin sau gây nhiễm là 0-66%; và xử lý tế bào MA104 với genipin trước và trước/sau gây nhiễm là 27.3-71.8% và 54.1-90%. Từ các kết quả trên cho thấy hoạt chất genipin có thể được sử dụng để ngăn ngừa và hạn chế sự xâm nhiễm RVs.

Nhận 06.05.2019

Được duyệt 15.06.2019

Công bố 20.09.2019

## Từ khóa

Genipin, rotavirus, ức chế rotavirus, in-vitro

© 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

## 1 Giới thiệu

Nhiễm Rotaviruses (RVs) là một trong những nguyên nhân phổ biến gây bệnh tiêu chảy cấp tính cho người và động vật[1]. RVs lây lan trên người chủ yếu thông qua đường miệng và gây chết chủ yếu ở trẻ em dưới 5 tuổi. Ước tính trung bình mỗi năm có khoảng nửa triệu trẻ em chết do nhiễm RVs trên toàn thế giới[2]. Phần lớn trẻ em chết do nhiễm RVs tập trung ở những nước nghèo tại Châu Á và Châu Phi là những nơi có điều kiện vệ sinh, nước sạch và điều kiện y tế yếu kém. Tuy nhiên, tỉ lệ nhiễm RVs là tương đương nhau ở cả các nước phát triển và các nước đang phát triển, với thống kê 95% trẻ em sẽ nhiễm RVs ít nhất một lần trong đời[3]. Tại nước ta, ước tính tỉ lệ nhiễm RVs ở bệnh nhân tiêu chảy khoảng 67,4%, trong đó mỗi năm khoảng 5.300-6.800 trẻ em dưới 5 tuổi chết do nhiễm RVs[4,5].

Chủng ngừa với RVs vắc-xin vẫn đóng vai trò chủ đạo trong việc bảo vệ trẻ em tránh sự xâm nhiễm, gây bệnh và gây chết do RVs[6]. Ngoài ra, bệnh nhân nhiễm RVs được khuyến cáo sử dụng thuốc nhằm điều trị các triệu chứng và bảo vệ chống mất nước cơ thể. Có nhiều hợp chất đã được chứng minh có tác động ức chế hoạt động của RVs, bao gồm các hợp chất tổng hợp như 1-3-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (ribavirin), 3-deazaguanine (3-DG), Isoprinosine, NMSO3[7-9]; các hợp chất tự nhiên như chè đen[10], cỏ ngọt[11], mít tố nữ, nhục đậu khấu, kim đồng, đào lộn hột, đào

kim nương, tòng chi[12], cam thảo[13], riềng [14], đậu nành và rong Nhật...[15].

Genipin là dẫn xuất không đường/aglycone của geniposide và là một hợp chất hóa học có trong chiết xuất tự nhiên từ cây dành dành/gardenia (*gardenia jasminoides ellis*). Genipin là một liên kết chéo tự nhiên của protein, gelatin, chitosan và được biết đến như là một dược liệu tự nhiên với nhiều tác dụng dược lý như khả năng kháng viêm, kháng apoptotic, kháng vi sinh vật và chống khối u[16-18]. Điều trị với genipin làm giảm yếu tố apoptosis Fas của tế bào gan. Genipin làm giảm tác động viêm của lipopolysaccharide (LPS) đối với các loại tế bào như RAW 264.7, rat brain microglial, và HepG2/NF-jB [19,20]. Những nghiên cứu gần đây đã chứng minh genipin có hoạt tính kháng một số loại virus như HIV, virus cúm lợn H1N1, Epstein-Barr virus, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[21,22]. Trong Đông y cổ truyền, người ta đã sử dụng quả dành dành làm thuốc dưới tên Chi tử hoặc Sơn chi Nhật. Vị thuốc được thu hoạch từ tháng 9 đến tháng 11 khi quả chuyển sang màu vàng đỏ và được phơi nắng hoặc sấy ở nhiệt độ thấp. Chi tử có những đặc tính chủ yếu như thanh nhiệt và giải độc (sốt nóng, người bứt rứt không yên, tức ngực, khó ngủ), giải nhiệt-thấp (nhiệt thấp tại tam tiêu, gan, túi mật), lương huyết và chỉ huyết (trị nhiệt tại huyết với các triệu chứng như chảy máu mũi, ói ra máu, phân hay nước tiểu có máu, chảy máu cam).



Đến nay chưa có nghiên cứu nào xác định hoạt tính sinh học của genipin đối với sự xâm nhiễm và phát triển của RVs. Do đó, trong nghiên cứu này, genipin được thử nghiệm nhằm xác định khả năng ức chế đối với sự xâm nhiễm và phát triển của RVs trong điều kiện in-vitro với các mục tiêu như sau: xác định được nồng độ genipin gây độc trên dòng tế bào MA104; xác định được nồng độ genipin có khả năng ức chế sự nhiễm của RVs trên dòng tế bào MA104; đưa ra đánh giá về khả năng ứng dụng của genipin trong điều trị bệnh do nhiễm RVs.

## 2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1 Chuẩn bị hóa chất và môi trường

Hoạt chất genipin với độ tinh khiết  $\geq 98\%$  được mua từ Công ty Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) và được hòa loãng trong dung dịch dimethylsulfoxide (DMSO). Môi trường nuôi cấy tế bào MA104 là Minimum Essential Medium alpha (MEM-alpha), huyết thanh bê (FBS) và kháng sinh gentamycin được mua từ Công ty Gibco BRL life technologies (Grand Island, NY, USA).

### 2.2 Nuôi cấy tế bào và tăng sinh RVs

#### 2.2.1 Nuôi cấy tế bào MA104

Tế bào MA104 được nuôi cấy trong môi trường MEM-alpha chứa 5% FBS ở  $37^{\circ}\text{C}$  và có bổ sung 5% khí  $\text{CO}_2$ . Sự phát triển của tế bào được đánh giá thông qua các chỉ số bao gồm hình thái, độ bám dính, tốc độ phát triển và tỉ lệ sống.

#### 2.2.2 Tăng sinh RVs

Chủng RVs Wa/G1P[8] được nhân lên trên tế bào MA104. Các bước lây nhiễm RVs được tóm tắt như sau: tế bào MA104 được nuôi trên đĩa nuôi cấy T25 đến khi phát triển thành lớp tế bào đơn và bao phủ khoảng 85% diện tích mặt đĩa nuôi. RVs được hoạt hóa bằng trypsin ở nồng độ  $10\mu\text{g/ml}$  và ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong vòng 30 phút. Sau khi hoạt hóa, RVs được lây nhiễm trên tế bào MA104 và ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc ngang trong khoảng 1 giờ. Sau lây nhiễm, RVs không bám sẽ được hút bỏ và tế bào được nuôi trong môi trường MEM-alpha bổ sung trypsin nồng độ  $5\mu\text{g/ml}$  tại  $37^{\circ}\text{C}$  bổ sung 5%  $\text{CO}_2$ .

RVs được đánh giá các chỉ tiêu như khả năng nhiễm, gây bệnh tích (cytopathic effect, CPE) và gây chết đối với tế bào MA104, nồng độ RVs sau gây nhiễm. RVs được thu hoạch và bảo quản tại  $-80^{\circ}\text{C}$  cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 2.3 Xác định ngưỡng gây độc của genipin với tế bào MA104

Độc tính của genipin đối với tế bào MA104 được xác định bằng phương pháp MTT. Genipin được hòa loãng ở các nồng độ từ  $10\text{-}200\mu\text{M/ml}$  trong môi trường MEM-alpha. Thí nghiệm được tóm tắt như sau: Lấy  $3 \times 10^4$  tế bào MA104 trải đều lên đĩa 96 giếng và nuôi trong vòng 24 giờ. Tiếp theo, tế bào MA104 được xử lý với  $100\mu\text{l}$  của môi trường MEM-alpha có bổ sung genipin ở các nồng độ 10, 50, 100, 150, 160, 180 và  $200\mu\text{M/ml}$ , và tiếp tục nuôi trong 24 giờ.

Khả năng sống của tế bào sau khi xử lý với genipin được xác định bằng phương pháp MTT: môi trường nuôi cấy tế bào được thay thế bằng  $100\mu\text{l}$  môi trường chứa hợp chất MTT ở

nồng độ  $0.5\text{mg/ml}$  và ủ tối ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ; môi trường chứa MTT được loại bỏ, bổ sung thêm  $100\mu\text{l}$  DMSO và lắc trong vòng 15 phút. Độ hấp phụ của dung dịch được đo ở bước sóng  $590\text{nm}$  bằng máy đo Infinite®200 PRO NanoQuant microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

### 2.3 Thí nghiệm ức chế khả năng xâm nhiễm và nhân lên của RVs

#### 2.3.1 Thí nghiệm 1: xử lý RVs với genipin trước / trước và sau khi lây nhiễm tế bào MA104

RVs ở nồng độ MOI 0.01 được xử lý với genipin ở các nồng độ 10, 50, 100, 130,  $150\mu\text{M/ml}$  có bổ sung trypsin nồng độ  $10\mu\text{g/ml}$  và ủ ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong vòng 4 giờ. Tiếp theo, tế bào MA104 được gây nhiễm với hỗn hợp RVs trên nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong vòng 1 giờ. Tế bào MA104 gây nhiễm được nuôi duy trì với môi trường MEM-alpha không (thí nghiệm 1.1) và có (thí nghiệm 1.2) bổ sung genipin ở các nồng độ 10, 50, 100, 130,  $150\mu\text{M/ml}$ , bổ sung trypsin nồng độ  $5\mu\text{g/ml}$  và ủ ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong vòng 24 giờ hoặc tới khi CPE xuất hiện. Tế bào MA104 không được xử lý với genipin được sử dụng làm đối chứng.

#### 2.3.2 Thí nghiệm 2: không xử lý RVs với genipin trước khi gây nhiễm tế bào MA104

Tế bào MA104 được lây nhiễm với RVs ở nồng độ MOI 0.01 có bổ sung trypsin nồng độ  $10\mu\text{g/ml}$  và ủ ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong vòng 1 giờ. Tế bào MA104 gây nhiễm được nuôi duy trì với môi trường MEM-alpha có bổ sung genipin ở các nồng độ 10, 50, 100, 130,  $150\mu\text{M/ml}$  và bổ sung trypsin nồng độ  $5\mu\text{g/ml}$  và ủ ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong vòng 24 giờ hoặc tới khi CPE xuất hiện. Tế bào MA104 không được xử lý với genipin được sử dụng làm đối chứng.

#### 2.3.3 Thí nghiệm 3: tế bào MA104 được xử lý với genipin trong vòng 24 giờ trước khi được lây nhiễm với RVs

Tế bào MA104 được xử lý trước với genipin ở nồng độ 10, 50, 100, 130,  $150\mu\text{M/ml}$  trong vòng 24 giờ. Tế bào MA104 được rửa 2 lần với môi trường MEM-alpha và lây nhiễm với RVs ở nồng độ MOI 0.01 có bổ sung trypsin nồng độ  $10\mu\text{g/ml}$  và ủ ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong vòng 1 giờ. Tế bào MA104 lây nhiễm được nuôi duy trì với môi trường MEM-alpha không thí nghiệm (3.1) và có thí nghiệm (3.2) genipin ở các nồng độ 10, 50, 100, 130,  $150\mu\text{M/ml}$ , bổ sung trypsin nồng độ  $5\mu\text{g/ml}$  và ủ ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong vòng 24 giờ hoặc tới khi CPE xuất hiện. Tế bào MA104 không được xử lý với genipin được sử dụng làm đối chứng.

### 2.4 Tách chiết RVs RNA

RNA được tách chiết bằng bộ kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các bước tách chiết được tóm tắt như sau: Lấy  $140\mu\text{l}$  dung dịch vi-rút và trộn lẫn với  $560\mu\text{l}$  dung dịch đệm AVL đã bổ sung carrier RNA vào ống nghiệm  $1.5\text{ml}$  và vortex đều trong vòng 15 giây. Ủ hỗn hợp trong vòng 10 phút ở nhiệt độ phòng; Tiếp tục bổ sung  $560\mu\text{l}$  ethanol và trộn đều trong vòng

15 giây. Hỗn hợp được đưa vào cột hấp thụ thể tích 2ml (collection tube) và li tâm với gia tốc 8.000g trong 1 phút; Tiếp theo, RNA trong cột hấp thụ được rửa hai lần với dung dịch rửa (washing buffer AW1, AW2) và li tâm với gia tốc 8.000g trong 1 phút. RNA được làm khô bằng cách li tâm với gia tốc 13.000g trong 1 phút. Cuối cùng, 50 $\mu$ l nước cất khử ion (RNase-free water) được bổ sung vào cột thu để giải phóng RNA, ủ trong 1 phút ở nhiệt độ phòng và li tâm với gia tốc 13.000g trong 1 phút. RNA được bảo quản tại -80°C cho phản ứng real-time PCR.

2.5 Phương pháp Real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR)

2.5.1 Lựa chọn khuôn mẫu, thiết kế mồi và probe

RVs VP6 gen được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng real-time PCR do gen này có đặc tính bảo tồn cao ở các chủng RVs. RVA/Human-wt/USA/Wa/1974/G1P[8], số đăng kí KT694943. Primers và probe được thiết kế sử dụng chương trình phần mềm Primer3 program: VP6/Wa/F (AATGGAGTAGCGCCACAATC), VP6/Wa/R (TAAGCCACATGGTTCCCATT), VP6/Wa/Probe (6FAM-GCACCGGATTTGTTTTTCAT-MGBNFQ).

2.5.2 Phản ứng reverse transcription tạo cDNA

RVs có chứa RNA sợi đơn nên trước khi thực hiện phản ứng real-time PCR cần tạo sản phẩm cDNA. Các bước tạo sản phẩm cDNA được mô tả vắn tắt như sau: Làm biến tính RNA: trộn đều 5 $\mu$ l RNA RVs với 1.4 $\mu$ l DMSO và ủ ở 97°C trong vòng 5 phút. Sau đó làm lạnh nhanh trong đá; Thực hiện phản ứng reverse transcription: hỗn hợp phản ứng gồm 1 $\mu$ l của dung dịch đệm 10x buffer, 0.4 $\mu$ l của 1x dNTPs, 0.2 $\mu$ l cho mỗi mồi xuôi và mồi ngược nồng độ 10 $\mu$ M, 0.1 $\mu$ l enzyme AMV, và bổ sung nước cất khử ion (RNAase free water) cho tới thể tích phản ứng là 10 $\mu$ l; Thực hiện phản ứng: phản ứng được

thực hiện trên máy PCR (GeneAmp® PCR System 9700, Life Technologies) ở 42°C trong 60 phút. Tiếp theo Enzyme AMV được bất hoạt ở nhiệt độ 95°C trong vòng 5 phút.

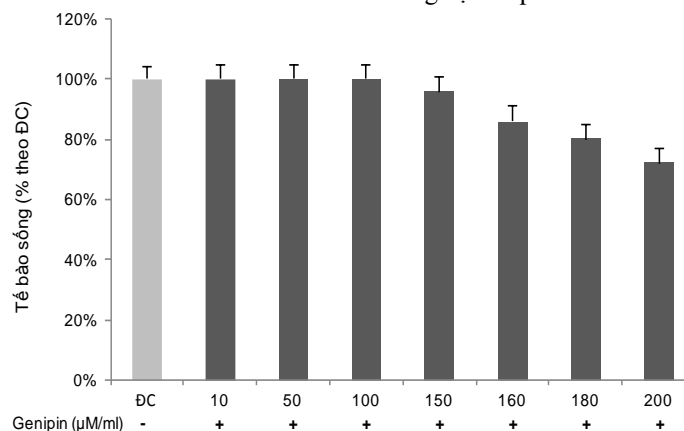
2.5.3 Phản ứng realtime PCR

Phản ứng real-time PCR được thực hiện trên máy ABI 7500 real-time thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Thành phần của phản ứng real-time PCR bao gồm 2 $\mu$ l cDNA, 5 $\mu$ l hỗn hợp phản ứng (Taq polymerase 1.5U, MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTP 0.2mM mỗi loại, dung dịch đệm), 0.2 $\mu$ l của mỗi primer (10 $\mu$ M), 1.5 $\mu$ l của probe (2pM), và bổ sung nước cất khử ion (RNAase free water) tới tổng lượng 10 $\mu$ l. Chu trình nhiệt được thực hiện như sau: 2 phút ở 50°C, tiếp theo là hoạt hóa polymerase trong 10 phút ở 95°C. Làm biến tính trong 15 giây ở 94°C và bước kéo dài trong 1 phút ở 60°C. Phản ứng được thực hiện lặp lại 40 vòng. Giá trị threshold cycles (Ct) được so sánh để đánh giá kết quả định tính và định lượng của phản ứng real-time PCR.

### 3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ngưỡng gây độc của genipin với tế bào MA104

Độc tính của genipin đối với tế bào MA104 được xác định bằng phương pháp MTT. Tế bào MA104 được xử lý với genipin trong môi trường MEM-alpha ở các nồng độ lần lượt là 10, 50, 100, 150, 160, 180, 200 $\mu$ M/ml. Kết quả MTT được biểu thị trong Hình 1. Trong đó, tỉ lệ sống (%) của tế bào MA104 sau khi xử lý với genipin ở các nồng độ 10, 50, 100, 150, 160, 180, 200 $\mu$ M/ml lần lượt là 100, 100, 100, 96, 86, 80, 72% (so với tỉ lệ % của đối chứng, 100%). Dựa vào kết quả trên cho thấy, khi xử lý tế bào MA104 với genipin ở nồng độ  $\leq 150\mu$ M/ml thì tỉ lệ sống của tế bào MA104 trong khoảng 96-100%. Do đó, nồng độ genipin  $\leq 150\mu$ M/ml được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 1** Hiệu quả gây độc của genipin với tế bào MA104. Tế bào MA104 được xử lý với genipin ở nồng độ 0, 10, 50, 100, 150, 160, 180, and 200 $\mu$ M/ml. Cột biểu đồ biểu thị giá trị trung bình với  $p \leq 0.01$ .

3.2 Khả năng ức chế của genipin với RVs lây nhiễm trên tế bào MA104

3.2.1 Công thức tiêu chuẩn định lượng RVs

Công thức tiêu chuẩn được xây dựng nhằm định lượng số lượng bản sao của RVs trong các thí nghiệm xác định hoạt

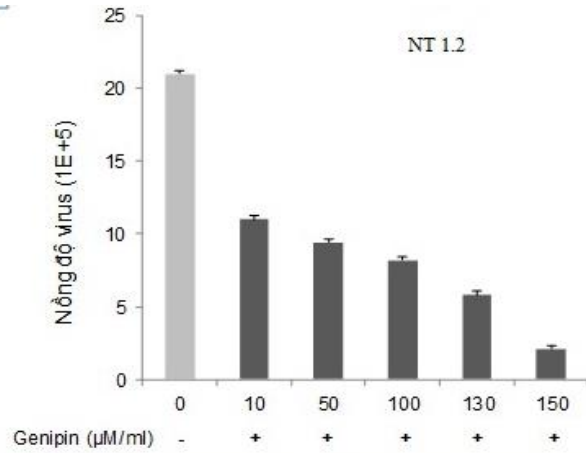
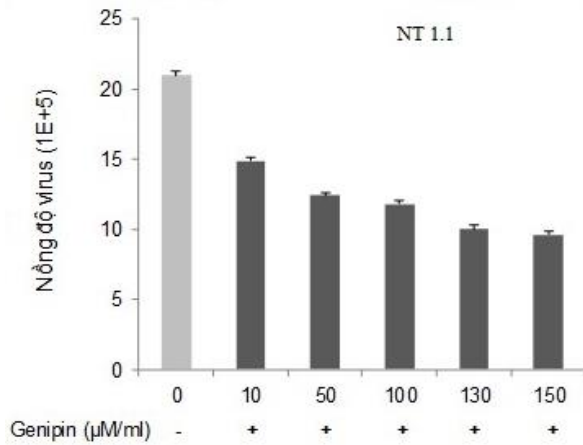
tính ức chế RVs của genipin. Gen VP6 được gắn vào vector qua cầu nối TA sử dụng bộ kit RBC T&A cloning vector (RBCbioscience, RC001). Vector được biến nạp sử dụng bộ kit HIT™-DH5 $\alpha$  Value (RBCbioscience, RH617) và nhân lên trong vòng 18-24 giờ trong tủ ủ lắc 200rpm ở 37°C.

Nồng độ vi khuẩn chứa vector mang gen VP6 được xác định bằng phương pháp hòa loãng theo cơ số 10. Phản ứng real-time PCR được thực hiện như ở trên. Công thức tiêu chuẩn được xây dựng dựa trên giá trị Ct và mối tương quan giữa giá trị Ct (y) và số lượng bào sao khuôn mẫu 1.E+(x) như sau:  $y = -4.4877x + 35.63$ .

3.2.2 Thí nghiệm 1: xử lý RVs với genipin trước / trước và sau khi lây nhiễm tế bào MA104

Khi xử lý RVs với genipin trước gây nhiễm, nồng độ RVs được xác định sau thí nghiệm sử dụng nồng độ genipin 10, 50, 100, 130, 150µM/ml lần lượt là 14.9, 12.4, 11.8, 10.0, 9.6 ×10<sup>5</sup> pfu/ml; giảm lần lượt là 28.7, 40.7, 43.5, 52.2, 54.1% khi so

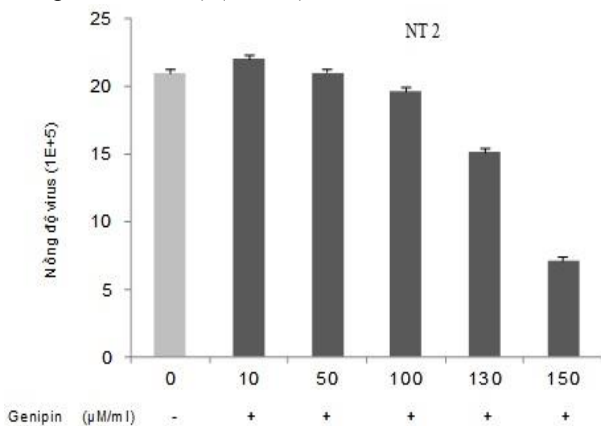
sánh với mẫu đối chứng (20.9 ×10<sup>5</sup>pfu/ml, 100%) (Hình 2, NT 1.1). Khi xử lý RVs với genipin cả trước và sau gây nhiễm, nồng độ RVs được xác định sau thí nghiệm sử dụng nồng độ genipin 10, 50, 100, 130, 150µM/ml lần lượt là 11.0, 9.4, 8.2, 5.8, 2.1 ×10<sup>5</sup> pfu/ml; giảm lần lượt là 47.3, 55.0, 60.7, 72.2, 90% khi so sánh với mẫu đối chứng (20.9 ×10<sup>5</sup>pfu/ml, 100%) (Hình 2, NT 1.2). Kết quả này cho thấy, hiệu quả ức chế RVs của genipin ở trước và sau của quá trình gây nhiễm lên tế bào MA104. Genipin có tác động ngăn cản sự xâm nhiễm của RVs cũng như tác động xâm nhiễm của RVs sang các tế bào chưa nhiễm.



**Hình 2** Hoạt tính ức chế RVs của hợp chất genipin. RVs được xử lý trước với genipin ở các nồng độ 10, 50, 100, 130, 150µM/ml, gây nhiễm trên MA104 và được nuôi duy trì trong môi trường không (NT 1.1) và có bổ sung (NT 1.2) hoạt chất genipin.

3.2.3 Thí nghiệm 2: không xử lý RVs với genipin trước khi gây nhiễm tế bào MA104

Trong nghiệm thức này, nồng độ RVs được xác định sau thí nghiệm sử dụng nồng độ genipin 10, 50, 100, 130, 150µM/ml lần lượt là 22.0, 21.0, 19.6, 15.1, 7.1 ×10<sup>5</sup> pfu/ml; giảm lần lượt là 6.2, 27.8, 66% cho các nồng độ 100, 130, 150µM/ml khi so sánh với mẫu đối chứng (20.9 ×10<sup>5</sup> pfu/ml, 100%) (Hình 3).



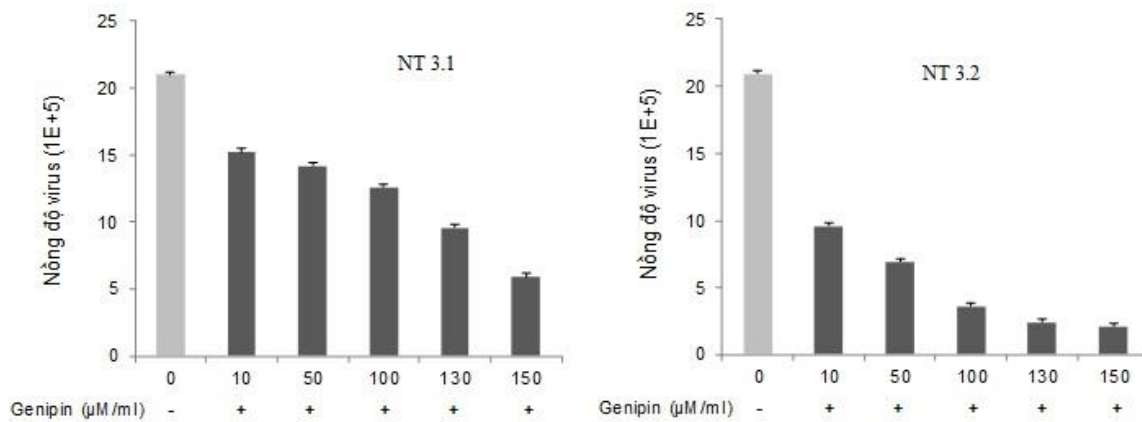
**Hình 3** Hoạt tính ức chế RVs của hợp chất genipin. Tế bào gây nhiễm MA104 được nuôi duy trì trong môi trường có bổ sung hoạt chất genipin ở các nồng độ tương đương 10, 50, 100, 130, 150µM/ml.

Kết quả này cho thấy, hiệu quả ức chế RVs của genipin sau khi tế bào MA104 bị gây nhiễm chỉ biểu hiện ở nồng độ genipin ≥100µM/ml và đạt hiệu quả cao nhất ở nồng độ 150µM/ml.

3.2.4 Thí nghiệm 3: tế bào MA104 được xử lý với genipin trong vòng 24 giờ trước khi được lây nhiễm với RVs

Trong nghiệm thức này, nồng độ RVs được xác định sau thí nghiệm sử dụng nồng độ genipin 10, 50, 100, 130, 150µM/ml lần lượt là 15.2, 14.2, 12.6, 9.6, 5.9 ×10<sup>5</sup> pfu/ml; giảm lần lượt là 27.3, 32.0, 39.7, 54.0, 71.8 % khi so sánh với mẫu đối chứng (20.9 ×10<sup>5</sup>pfu/ml, 100%) (Hình 4, NT 3.1). Kết quả này phù hợp với nghiệm thức 3.1 và cho thấy việc duy trì nồng độ genipin trong môi trường nuôi cấy có hiệu quả tốt trong ức chế sự xâm nhiễm của RVs từ các tế bào đã bị nhiễm qua các tế bào chưa bị nhiễm.

Trong nghiệm thức này, nồng độ RVs được xác định sau thí nghiệm sử dụng nồng độ genipin 10, 50, 100, 130, 150µM/ml lần lượt là 9.6, 6.9, 3.6, 2.4, 2.1 ×10<sup>5</sup> pfu/ml; giảm lần lượt là 54.1, 67.0, 82.8, 88.5, 90 % khi so sánh với mẫu đối chứng (20.9 ×10<sup>5</sup> pfu/ml, 100%) (Hình 4, NT 3.2). Kết quả trên cho thấy, tế bào MA104 đã hấp phụ genipin trong giai đoạn ủ 24 giờ và tương tác đó có hiệu quả ức chế quá trình bám và xâm nhiễm của RVs vào tế bào MA104.



**Hình 4** Hoạt tính ức chế RVs của hợp chất genipin. Tế bào MA104 được xử lý trước với genipin ở các nồng độ 10, 50, 100, 130, 150 $\mu$ M/ml, sau đó được gây nhiễm với RVs và duy trì trong môi trường không (NT 3.1) và có bổ sung (NT 3.2) hoạt chất genipin.

Kết quả các thí nghiệm cho thấy hiệu quả ức chế RVs của hoạt chất genipin thể hiện tốt nhất thông qua việc duy trì genipin trong cả trước và sau gây nhiễm mang lại hiệu quả tối ưu nhất. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 1 dưới đây.

**Bảng 1** Hiệu quả ức chế RVs của genipin trong các thí nghiệm

Thí nghiệm		Nồng độ RVs [ $\times 10^5$ ] (Tỷ lệ giảm với đối chứng [%])				
		Genipin ( $\mu$ M/ml)				
		10	50	100	130	150
1	1.1	14.9 (28.7)	12.4 (40.7)	11.8 (43.5)	10.0 (52.2)	9.6 (54.1)
	1.2	11.0 (47.3)	9.4 (55.0)	8.2 (60.7)	5.8 (72.2)	2.1 (90.0)
2		22.0 (-)	21.0 (-)	19.6 (6.2)	15.1 (27.8)	7.1 (66.0)
3	3.1	9.6 (54.1)	6.9 (67.0)	3.6 (82.8)	2.4 (88.5)	2.1 (90.0)
	3.2	15.2 (27.3)	14.2 (32.0)	12.6 (39.7)	9.6 (54.1)	5.9 (71.8)

#### 4 Kết luận và kiến nghị

Thử nghiệm về hoạt tính ức chế RVs của hoạt chất genipin đạt được các kết quả như sau: Ngưỡng gây độc tế bào MA104 của genipin là  $\geq 150\mu$ M/ml. Nồng độ genipin sử dụng cho các thí nghiệm là 10-150 $\mu$ M/ml; Kết quả từ phản ứng real-time PCR sau khi phân tích như sau: (1) Chỉ xử lý RVs với genipin trước khi gây nhiễm thì hiệu quả ức chế so với đối chứng từ 28.7-54.1%. (2) Xử lý RVs với genipin trước và sau khi gây nhiễm thì hiệu quả ức chế so với đối chứng từ 47.3-90.0%. (3) Chỉ xử lý tế bào MA104 sau khi gây nhiễm RVs thì hiệu quả ức chế so với đối chứng từ 0-66%. (4) Chỉ xử lý tế bào MA104 với genipin thì hiệu quả

ức chế so với đối chứng từ 27.3-71.8%. và (5) Xử lý tế bào MA104 với genipin trước và sau khi gây nhiễm RVs thì hiệu quả ức chế so với đối chứng từ 54.1-90%; Từ các kết quả trên cho thấy, genipin có thể được sử dụng như một loại thuốc giúp ngăn ngừa và hạn chế sự xâm nhiễm RVs. Tuy nhiên, cần tiếp tục nghiên cứu nhằm tìm ra cơ chế tác động và mức độ an toàn của hoạt chất genipin trong các điều kiện thử nghiệm in-vivo.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ NTTU trong đề tài mã số 2018.01.80/HD-KHCN.

#### Tài liệu tham khảo

- Estes, M.K., Rotaviruses. *Fields virology*. 5 (2007) 1917-1974.
- Parashar, U.D., et al., Global mortality associated with rotavirus disease among children in, *J Infect Dis* 200 (2009) S9-15.
- Parashar, U.D., et al., Rotavirus and severe childhood diarrhea, *Emerg Infect Dis* 12 (2006)304-306.
- Van Man, N., et al., Epidemiological profile and burden of rotavirus diarrhea in Vietnam: 5 years of sentinel hospital surveillance, 1998-2003, *J Infect Dis* 192 (2005) S127-132.

5. Nguyen, T.A., et al., Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam, *J Med Virol* 79 (2007) 582-590.
6. WHO, Rotavirus vaccines. WHO position paper - January 2013, *Wkly Epidemiol Rec* 88 (2013) 49-64.
7. Smee, D.F., et al., Inhibition of rotaviruses by selected antiviral substances: mechanisms of viral inhibition and in vivo activity, *Antimicrob Agents Chemother* 21 (182) 66-73.
8. Linhares, R.E., et al., The in vitro antiviral activity of isoprinosine on simian rotavirus, *Braz J Med Biol Res* 22 (1989) 1095-1103.
9. Takahashi, K., et al., Protective efficacy of a sulfated sialyl lipid (NMSO3) against human rotavirus-induced diarrhea in a mouse model, *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2002) 420-424.
10. Clark, K.J., et al., An in vitro study of theaflavins extracted from black tea to neutralize bovine rotavirus and bovine coronavirus infections, *Vet Microbiol* 63 (1998) 147-157.
11. Takahashi, K., et al., Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*, *Antiviral Res* 49 (2001) 15-24.
12. Cecilio, A.B., et al., Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus, *J Ethnopharmacol* 141 (2012) 975-981.
13. Kwon, H.J., et al., In vitro anti-rotavirus activity of polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*, *Bioorg Med Chem* 18 (2010) 7668-7674.
14. Kim, H.H., et al., Antiviral activity of *Alpinia katsumadai* extracts against rotaviruses, *Res Vet Sci* 92 (2012) 320-323.
15. Huang, H., et al., Genistein inhibits rotavirus replication and upregulates AQP4 expression in rotavirus-infected Caco-2 cells, *Arch Virol* 160 (2015) 1421-1433.
16. Yamamoto, M., et al., Genipin, a metabolite derived from the herbal medicine Inchin-ko-to, and suppression of Fas-induced lethal liver apoptosis in mice, *Gastroenterology* 118 (2000) 380-389.
17. Nam, K.N., et al., Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells, *Int Immunopharmacol* 10 (2010) 493-499.
18. Lin, C.H., et al., Potent inhibitor design against H1N1 swine influenza: structure-based and molecular dynamics analysis for M2 inhibitors from traditional Chinese medicine database, *J Biomol Struct Dyn* 28 (2011) 471-482.
19. Koo, H.J., et al., Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia, *Eur J Pharmacol* 495 (2011) 201-208.
20. Li, C.C., et al., Genipin inhibits lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation in mice as evidenced by nuclear factor-kappaB bioluminescent imaging-guided transcriptomic analysis, *Food Chem Toxicol* 50 (2012) 2978-2986.
21. Son, M., et al., Genipin as a novel chemical activator of EBV lytic cycle, *J Microbiol* 53 (2015) 155-165.
22. Cho, M., et al., Genipin Enhances Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Maintenance, *PLoS One* 11 (2016) e0163693.

## Anti-rotavirus effects of genipin in in-vitro model

Thanh Viet Nguyen<sup>1</sup>, Van Thai Than<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>NTT Institute of High Technology, Nguyen Tat Thanh University

<sup>2</sup>Faculty of Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University

\*tvthai@ntt.edu.vn

**Abstract** Rotavirus is the major cause of acute gastroenteritis in children worldwide. So far, there has been no specific medicine of the treatment of this virus. Genipin is a chemical compound found in the natural fruit of gardenia and has been reported to be an excellent traditional oriental medicine that produces various pharmacological functions such as anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-microbial, and anti-tumor effects. In this study, genipin compound was tested as a natural drug in activities of anti-rotavirus in in-vitro model. The potential cytotoxicity of the genipin against the MA104 cells was evaluated at  $\geq 150\mu\text{M/ml}$ . Genipin titer used in this study ranged from 10 to  $150\mu\text{M/ml}$ . Anti-rotavirus effects of genipin compared to controls are as follow: pre-treated RVs before and before/after infection reduced RVs infectivity by 28.7-54.1% and 47.3-90.0%; treated MA104 cells after infection reduced RVs infectivity by 0-66%; pre-treated MA104 cells before and before/after infection reduced RVs infectivity by 27.3-71.8% and 54.1-90%. These results suggested that genipin can be used as a natural and safe drug to inhibit rotavirus infection.

**Keywords** Genipin, rotavirus, anti-rotavirus, in-vitro.