

BÀI BÁO NGHIÊN CỨU GỐC

Hoạt tính kháng viêm của dịch chiết tam thất (*panax pseudoginseng*) trên tế bào đại thực bào

Vương Diệu Linh^{1*}, Nguyễn Ngọc Quang¹, Trương Văn Long²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Phản ứng viêm đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh nhiều loại bệnh như là bệnh tim mạch, viêm khớp, ung thư. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đã đánh giá tác dụng kháng viêm của dịch chiết tam thất (*Panax pseudoginseng*) (PCE) bằng chloroform trên tế bào đại thực bào RAW 264.7 được kích thích với lipopolysaccharide (LPS).

Phương pháp nghiên cứu: Tế bào được xử lý với PCE ở các nồng độ 10, 25, 50, và 100 µg/mL trước 1 giờ, sau đó được kích thích với LPS 1 µg/mL trong 12 giờ. Nồng độ nitơ oxit (NO) được đo bằng phương pháp Griess và mức độ biểu hiện của các protein được xác định bằng phương pháp Western blot.

Kết quả: Nồng độ NO giảm tuyến tính với độ tăng nồng độ của PCE. PCE cũng làm giảm biểu hiện của các protein trung gian cũng như cytokine, bao gồm inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) và interleukin-1β (IL-1β) trong tế bào được kích thích với LPS.

Kết luận: Những kết quả này chứng minh rằng PCE có thể là một chất tiềm năng cho ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh liên quan đến viêm.

Từ khóa: Kháng viêm, tam thất, tế bào đại thực bào RAW 264.7

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm là một đáp ứng của hệ miễn dịch để bảo vệ cơ thể trước sự tấn công của các tác nhân bên trong và bên ngoài như vi sinh vật, tác nhân lý hóa, sinh hóa. Đại thực bào là một nhân tố quan trọng của quá trình viêm và trực tiếp chống lại các kích thích trên. Trong suốt quá trình viêm, đại thực bào sản xuất ra hàng loạt các enzyme, chất trung gian, cytokines, cùng với các protein tín hiệu, qua đó thu hút sự di chuyển của các tế bào miễn dịch đến vị trí mô hoặc tế bào bị lây nhiễm hoặc tổn thương để giải quyết các vấn đề bất thường (1, 2). Tuy nhiên, quá trình viêm kéo dài và không được kiểm soát sẽ dẫn đến sự

phát triển nhiều loại bệnh như là xơ vữa động mạch, bệnh tim mạch, viêm khớp và ung thư. Lipopolysaccharide (LPS) là một thành phần của màng ngoài vi khuẩn Gram âm và thường được dùng để tạo mô hình viêm trong *in vitro* (3). LPS có thể hoạt hóa đại thực bào, qua đó kích thích sự tổng hợp các enzyme và cytokine như inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α (4). LPS cũng tăng cường sản xuất các chất trung gian như nitơ oxit (NO) và prostaglandins (PGs) – lần lượt là sản phẩm của các enzyme iNOS và COX-2 (5). Do đó, mô hình LPS kích thích phản ứng viêm trong tế bào đại thực bào



Địa chỉ liên hệ: Vương Diệu Linh

Email: linhvuong88@gmail.com

¹Trung tâm Giải phẫu bệnh & Sinh học phân tử, Bệnh viện K, Việt Nam

²Khoa thực phẩm thông minh và thuốc, Đại học Inje, Hàn Quốc

Ngày nhận bài: 27/11/2022

Ngày phản biện: 02/02/2023

Ngày đăng bài: 31/10/2023

Mã DOI: <https://doi.org/10.38148/JHDS.0705SKPT22-100>

RAW 264.7 được sử dụng rộng rãi trong sàng lọc và nghiên cứu các chất kháng viêm.

Ức chế các nhân tố gây viêm là một phương thức hiệu quả cho việc ngăn chặn hoặc điều trị các loại bệnh liên quan đến viêm. Trong những năm gần đây, các sản phẩm từ rau củ quả và thảo dược đang thu hút sự chú ý mạnh mẽ của các nhà nghiên cứu cũng như là người tiêu dùng do mang nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng và ít có tác dụng phụ. Tam thất là loại dược liệu quý và đã được dùng trong y học cổ truyền hàng ngàn năm ở các nước Châu Á, đặc biệt ở Trung Quốc, Hàn Quốc và Việt Nam. Củ tam thất được biết đến với nhiều hoạt tính sinh học như chống oxy hóa, kháng viêm, điều hòa miễn dịch, bảo vệ thần kinh và chống ung thư (6). Từ lâu tam thất cũng được dùng để điều hòa tuần hoàn máu, ức chế sự chảy máu, giảm sưng đau, và điều trị bệnh tim mạch. Nghiên cứu của Chen và cs. (2014) cũng chỉ ra rằng thành phần saponins trong củ tam thất có tác dụng chống viêm phổi thông qua việc ức chế sản sinh các cytokine trên chuột thí nghiệm (7). Tuy nhiên, các báo cáo thường chỉ tập trung vào đánh giá hoạt tính sinh học của dịch chiết nước hay các thành phần saponins trong củ tam thất, trong khi đó, các thành phần kỵ nước trong củ tam thất chưa được nghiên cứu nhiều. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng chloroform để tách các thành phần kỵ nước trong củ tam thất (PCE) và đánh giá hoạt tính kháng viêm của dịch chiết này trên tế bào đại thực bào RAW 264.7 được kích thích với LPS.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu: Môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), huyết thanh phôi thai bò và dung dịch penicillin/streptomycin được mua từ Hyclone (Mỹ). Lipopolysaccharide (LPS, Escherichia coli O127:B8) được mua từ Sigma-Aldrich (Mỹ). Kháng thể chống lại iNOS, COX-2, IL-1 β , β -actin, anti-rabbit và anti-goat được mua từ Santa Cruz (Mỹ). Củ tam thất tươi (*Panax*

pseudoginseng) được thu tại Lào Cai, được rửa sạch, thái nhỏ và bảo quản ở từ -20 °C.

Chiết xuất: Củ tam thất tươi được làm khô bằng hệ thống Vacuum Freeze Dryer (Mỹ) và được nghiền thành bột với kích thước hạt nhỏ hơn 450 μ m. Bột tam thất khô được chiết xuất hai lần với chloroform. Dịch chiết sau đó được lọc và cô lại bằng hệ thống rotary evaporator (Mỹ) dưới áp suất giảm. Để loại bỏ hoàn toàn dung môi, dịch chiết được thổi bằng dòng khí nitơ. Chất chiết sau đó được bảo quản ở -20 °C.

Nuôi cấy tế bào: Dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7 được cung cấp bởi American Type Cell Culture (Mỹ) và được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh, 100 đơn vị/mL penicillin và 100 μ g/mL streptomycin. Tế bào được nuôi trong tủ nuôi cấy ở điều kiện 5% CO₂ và 37°C. Môi trường được thay mới hai ngày/lần.

Đo nồng độ NO: Tế bào RAW 264.7 được ủ với PCE ở các nồng độ khác nhau trong 1 giờ, sau đó được xử lý với LPS (1 μ g/mL) trong 12 giờ (3). Nồng độ NO trong môi trường nuôi cấy tế bào được đánh giá bằng phản ứng Griess. Cụ thể, môi trường nuôi cấy được ly tâm 3000 rpm trong 5 phút, dịch nổi sau ly tâm được trộn với một thể tích tương đương của thuốc thử Griess gồm 1% (w/v) sulfanilamide, 5% (v/v) phosphoric axit, 0.1% (w/v) Naphthylethylenediamine dihydrochloride. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và được đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm. Nồng độ NO được tính theo đường chuẩn của NaNO₂. PCE được hòa tan trong DMSO và nồng độ cuối cùng của DMSO trong môi trường nuôi cấy là 0.1%.

Western blot: Sau khi xử lý, tế bào được thu trong 200 μ L RIPA buffer (Cell Signaling) và ủ trên đá 1 giờ. Hỗn hợp đồng nhất sau đó được ly tâm 13000 rpm ở 4°C trong 10 phút để thu dịch nổi. Nồng độ protein tổng số trong mỗi mẫu được xác định bằng việc

sử dụng BCA Protein Assay Kit. Một lượng protein bằng nhau ở mỗi mẫu được phân tách trên SDS-PAGE gel và được chuyển lên màng polyvinylidene fluoride (PVDF) bằng hệ thống semi-dry transfer (Bio-rad). Sau khi blocking với 5% skim milk, màng được lai với kháng thể sơ cấp ở 4 °C trong 24 giờ. Sau đó, màng được rửa với dung dịch PBST (0.1% Tween 20 trong phosphate buffer saline) và tiếp tục được lai với kháng thể thứ cấp thích hợp ở 4 °C trong 3 giờ. Sau khi rửa các đầu dò gắn không đặc hiệu, các băng protein trên màng được phát hiện bằng Western blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology) và được hiển thị trên X-ray phim.

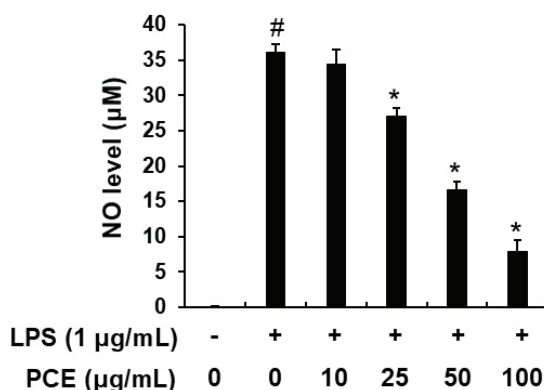
Phân tích số liệu: Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ít nhất ba lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel và được phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS16.0 sử dụng kiểm định Chi-square và Fisher.

Đạo đức trong nghiên cứu: Nghiên cứu tiến hành thí nghiệm trên củ tam thất nên không thuộc phạm vi đối tượng xét duyệt của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học.

KẾT QUẢ

Ảnh hưởng của PCE lên sự hình thành NO trong tế bào RAW 264.7 được kích thích bởi LPS

Chúng tôi đã đánh giá khả năng ức chế sự hình thành NO của PCE trong tế bào RAW 264.7 được kích thích bởi LPS 1 µg/mL. Tế bào được ủ với PCE ở các nồng độ cuối cùng là 10, 25, 50 và 100 µg/mL trước 1 giờ, sau đó được cảm ứng với LPS (1 µg/mL) trong 12 giờ. Nồng độ NO trong môi trường nuôi cấy tế bào được xác định như được đề cập trong mục phương pháp. Kết quả cho thấy LPS kích thích mạnh mẽ sự sản xuất NO của tế bào. Tuy nhiên, PCE đã ức chế sự hình thành NO theo độ tăng nồng độ. Cụ thể, 10 µg/mL PCE không làm thay đổi đáng kể mức độ NO so với nhóm LPS, nhưng từ nồng độ 25 µg/mL đến 100 µg/mL của PCE đã làm giảm đáng kể mức độ của NO trong môi trường nuôi cấy khi so sánh với nhóm LPS. Đặc biệt, PCE ở nồng độ 100 µg/mL ức chế mạnh nhất, làm giảm gần 5 lần mức độ NO được gây ra bởi LPS.



(-): Tế bào RAW 264.7 không kích thích với LPS 1 µg/mL.

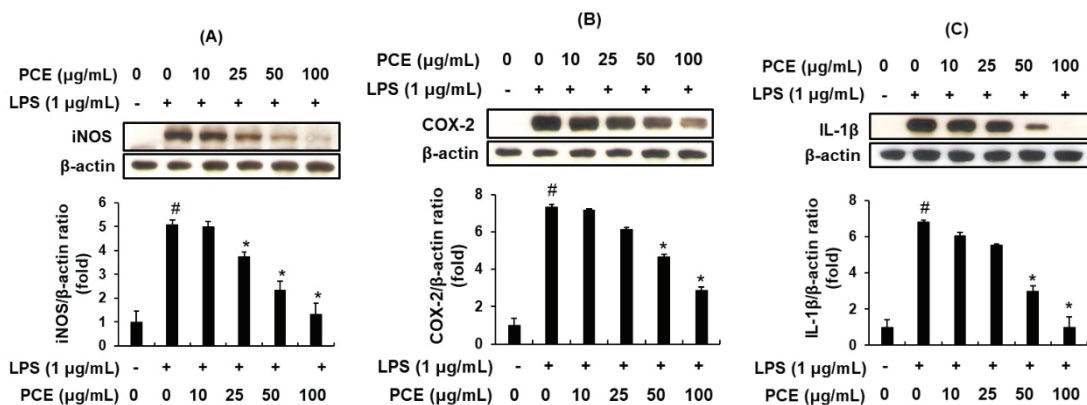
(+): Tế bào RAW 264.7 được kích thích với LPS 1 µg/mL. 0-100: nồng độ PCE cuối cùng trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Hình 1. Ảnh hưởng ức chế của PCE lên sự hình thành NO trong tế bào RAW 264.7 được kích thích bởi LPS

Ảnh hưởng của PCE lên sự biểu hiện iNOS, COX-2 và IL-1 β trong tế bào RAW 264.7 được kích thích với LPS

Trong thí nghiệm này chúng tôi tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của PCE lên sự hiệu hiện của các protein iNOS, COX-2 và IL-1 β trong tế bào RAW 264.7 được kích thích với LPS. Phân tích Western blot cho thấy LPS kích thích biểu hiện của iNOS và COX-2 lần lượt cao gấp 5 lần và 7.5 lần so với đối chứng. Tuy nhiên, tế bào được ủ với PCE đã làm giảm mức độ biểu hiện của iNOS và COX-2 theo độ tăng của nồng độ. Trong đó, nồng độ 10 - 25 $\mu\text{g/mL}$ PCE không làm thay đổi đáng kể mức độ biểu hiện của iNOS và COX-

2 so với nhóm xử lý LPS, nhưng PCE ở các nồng độ cao hơn (50-100 $\mu\text{g/mL}$) làm giảm mạnh biểu hiện của hai protein này. Thêm vào đó, xử lý LPS cũng đã làm tăng sự biểu hiện của cytokine IL-1 β trong tế bào RAW 264.7 cao gấp 7 lần đối chứng. Tuy nhiên, sự biểu hiện của IL-1 β được cảm ứng bởi LPS đã giảm tuyến tính theo độ tăng nồng độ của PCE. Mặc dù 10 và 25 $\mu\text{g/mL}$ PCE không làm thay đổi ~~cần thiết~~ mức độ biểu hiện của IL-1 β nhưng cũng đã làm giảm nhẹ mức độ biểu hiện của protein này so với nhóm LPS. Đặc biệt, PCE ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ đã ức chế gần như hoàn sự biểu hiện của IL-1 β trong tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS.



(-): Tế bào RAW 264.7 không kích thích với LPS 1 $\mu\text{g/mL}$

(+): Tế bào RAW 264.7 được kích thích với LPS 1 $\mu\text{g/mL}$. 0-100: nồng độ PCE cuối cùng trong môi trường nuôi cấy tế bào

Hình 2. Ảnh hưởng ức chế của PCE lên sự biểu hiện của iNOS (A), COX-2 (B) và IL-1 β (C) trong tế bào RAW 264.7 được kích thích bởi LPS

BÀN LUẬN

NO được tổng hợp từ L-arginine bởi một họ các enzyme gồm neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) và inducible NOS (iNOS). NO đóng một vai trò quan trọng trong nhiều chức năng sinh học của cơ thể như dẫn truyền thần kinh, giãn cơ, hay chức năng bảo vệ của hệ miễn dịch (8). Tuy nhiên,

sự hình thành quá mức NO là nguyên nhân dẫn đến nhiều loại bệnh có nguồn gốc từ sự viêm mãn tính. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng NO liên quan đến sự khởi đầu của quá trình đột biến và phát sinh ung thư. NO có thể phản ứng với các loại chất oxi hóa khác để hình thành các chất oxi hóa cực mạnh như là peroxynitrite. Những chất oxi hóa này gây ra sự biến đổi DNA và protein, và oxi hóa lipid

trong tế bào (9, 10). Tăng cường sản xuất NO là dấu hiệu của quá trình viêm gây ra bởi LPS. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng dịch chiết PCE bằng chloroform nhằm đánh giá khả năng ức chế sự hình thành NO trong tế bào RAW 264.7 được kích thích bởi LPS. Tham khảo công bố của Dong L và cs. (2017), tế bào được ủ với PCE ở các nồng độ cuối cùng là 10, 25, 50 và 100 µg/mL trước 1 giờ, sau đó được cảm ứng với LPS (1 µg/mL) trong 12 giờ (3). Kết quả cho thấy LPS kích thích mạnh mẽ sự sản xuất NO của tế bào. Tuy nhiên, PCE đã ức chế sự hình thành NO theo độ tăng nồng độ. Nồng độ từ 25 µg/mL đến 100 µg/mL của PCE đã làm giảm đáng kể mức độ của NO trong môi trường nuôi cấy khi so sánh với nhóm LPS. Đặc biệt, PCE ở nồng độ 100 µg/mL ức chế mạnh nhất, làm giảm gần 5 lần mức độ NO được gây ra bởi LPS. Kết quả bước đầu cho thấy tiềm năng, tính mới cũng như sự khác biệt của dịch chiết PCE bằng chloroform so với các hợp chất hòa tan từ các phương pháp khác trong phản ứng viêm (3).

Cùng với sự hình thành NO, một loạt các tiền chất viêm và các cytokine như là iNOS, COX-2, IL-1β cũng được sản xuất trong quá trình viêm. Biểu hiện bất thường của iNOS được chứng minh là liên quan đến sự phát triển của nhiều loại bệnh xuất phát từ sự viêm mãn tính trong cơ thể người. iNOS biểu hiện quá mức cũng được quan sát trong nhiều loại ung thư như ung thư vú, ung thư đại trực tràng hay ung thư phổi (10). Cùng với iNOS, COX-2 cũng được biết đến như là cầu nối của sự viêm và ung thư. COX-2 góp phần quan trọng vào phát triển của khối u (11). Sự biểu hiện bất thường của COX-2 được chứng minh là ức chế quá trình apoptosis của tế bào ung thư, tăng cường sự sinh sản của tế bào ung thư, dẫn đến tăng cường khả năng xâm lấn và di căn của khối u (9). Trong khi đó, IL-1β là một cytokine quan trọng góp phần vào sự khởi đầu và thúc đẩy của sự hình thành khối u, hình thành mạch máu và di căn (12). Do

vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của PCE lên sự biểu hiện của iNOS (A), COX-2 (B) và IL-1β (C) trong tế bào RAW 264.7 được kích thích bởi LPS. Kết quả cho thấy LPS kích thích biểu hiện của iNOS và COX-2 cao gấp 5 lần và 7.5 lần so với đối chứng, đồng thời dịch chiết PCE có vai trò làm giảm biểu hiện của iNOS và COX-2, đặc biệt ở nồng độ 50-100 µg/mL. Bên cạnh đó, LPS cũng đã làm tăng sự biểu hiện của cytokine IL-1β trong tế bào cao gấp 7 lần đối chứng, tuy nhiên, sự biểu hiện của IL-1β được cảm ứng bởi LPS đã giảm tuyến tính theo độ tăng nồng độ của PCE, ở nồng độ 100 µg/mL ức chế gần như hoàn sự biểu hiện của IL-1β trong tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS. Những kết quả này đã chứng minh rằng PCE đã ức chế quá trình viêm gây ra bởi LPS thông qua việc ức chế sự biểu hiện của các chất tiền viêm và cytokine.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu chúng tôi cho thấy rằng dịch chiết PCE bằng chloroform ức chế sản xuất NO trong tế bào đại thực bào được kích thích với LPS. Thêm vào đó, PCE cũng đã làm giảm sự biểu hiện của các chất tiền viêm và cytokine như iNOS, COX-2 và IL-1β trong tế bào được kích thích với LPS. Những kết quả chứng minh rằng PCE là một chất kháng viêm tiềm năng cho việc phòng ngừa và điều trị các bệnh liên quan đến viêm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jang K=J, Choi SH, Yu GJ, et al. Anti-inflammatory potential of total saponins derived from the roots of Panax ginseng in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;11(3):1109-1115.
2. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *The Journal of pathology*. 2008;214(2):161-178.
3. Dong L, Yin L, Zhang Y, et al. Anti-inflammatory

- effects of ononin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Molecular Immunology*. 2017;83:46-51.
4. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K-i, et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003;100(2):171-194.
 5. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*. 2001;13(2):85-94.
 6. Xiong Y, Chen L, Man J, et al. Chemical and bioactive comparison of *Panax notoginseng* root and rhizome in raw and steamed forms. *Journal of Ginseng Research*. 2017.
 7. Chen YQ, Rong L, Qiao JO. Antiinflammatory effects of *Panax notoginseng* saponins ameliorate acute lung injury induced by oleic acid and lipopolysaccharide in rats. *Molecular medicine reports*. 2014;10(3):1400-1408.
 8. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, et al. Nitric oxide and cancer: a review. *World journal of surgical oncology*. 2013;11:118-118.
 9. Surh Y-J, Chun K-S, Cha H-H, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;480-481:243-268.
 10. Funaro A, Wu X, Song M, et al. Enhanced Anti-Inflammatory Activities by the Combination of Luteolin and Tangeretin. *Journal of Food Science*. 2016;81(5):H1320-H1327.
 11. Ghosh N, Chaki R, Mandal V, et al. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacological Reports*. 2010;62(2):233-244.
 12. Lin W-W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1175-1183.

Anti-inflammatory activity of extract from *Panax Pseudoginseng* in macrophage cells

Linh Dieu Vuong¹, Quang Ngoc Nguyen¹, Van-Long Truong²

¹ Pathology and Molecular Biology Center, National Cancer Hospital K, Vietnam

² Department of Smart Food and Drug, Inje University, Korea

Background: Inflammation plays an important role in the pathogenesis of various diseases such as cardiovascular diseases, arthritis, obesity and cancer. Thus, in the present study, we evaluated the anti-inflammatory effect of extract from *Panax pseudoginseng* (PCE) in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Materials and methods:** The cells were pretreated with PCE (10, 25, 50, and 100 μ g/mL) for 1 h and then treated with LPS 1 μ g/mL for an additional 12 h. The concentration of nitric oxide (NO) cell culture media was measured according to the Griess method and protein expression was determined using Western blotting. **Results:** The results showed that PCE treatment decreased LPS-induced NO production in a dose-dependent manner. In addition, PCE inhibited the protein expression of enzymes as well as pro-inflammatory cytokines such as inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), Cyclooxygenase-2 (COX-2), and Interleukin-1 β (IL-1 β) in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Especially, 100 μ g/mL of PCE exhibited the strongest inhibitory effects on these proteins expression. **Conclusion:** Overall, these findings suggest that PCE may be a potent therapeutic agent for the prevention and/or treatment of inflammation-associated diseases.

Keywords: Anti-inflammation, *Panax pseudoginseng*, RAW 264.7 macrophages.