

Dịch chiết Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) ức chế hoạt động của thụ thể neurokinin-1 (NK-1R) được kích thích bởi chất P (substance P) ở tế bào lympho chuột

Trịnh Tất Cường^{1,*}, Giang Huy Diễm², Trần Trung Đoàn²,
Phạm Thanh Huyền³, Đinh Đoàn Long^{1,4}

¹Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ enzyme-protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược Liệu, 3B Quang Trung, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

⁴Khoa Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 01 tháng 12 năm 2013

Chỉnh sửa ngày 08 tháng 01 năm 2014; chấp nhận đăng ngày 24 tháng 3 năm 2014

Tóm tắt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chứng minh chất P (SP), phối tử đặc hiệu thụ thể NK-1R, thúc đẩy tế bào lympho chuột giải phóng cytokine interferon-gamma (IFN- γ) trong điều kiện *in vitro*. Ngoài ra, SP kích thích (hoặc ít nhất làm tăng) sự biểu hiện của thụ thể này ở tế bào nuôi cấy. Dịch chiết metanotol hạt Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) ức chế mạnh hoạt động của thụ thể NK-1R được hoạt hóa bởi SP cho thấy thụ thể này có thể là đích tác động của thành phần nào đó có trong dịch chiết, mặc dù có thể không liên quan đến capsaicin qua con đường truyền tin của thụ thể vanilloid loại 1 (TRPV1) vốn đã biết trước đây. Thành phần nào trong dịch chiết: Hồ tiêu có hoạt tính đối kháng (đối vận) thụ thể NK-1R cần được tiếp tục quan tâm nghiên cứu.

Từ khóa: Thụ thể neurokinin-1 (NK-1R), Chất P (Substance P - SP), Capsaicin, Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.), Chất đối kháng thụ thể.

1. Đặt vấn đề

Thụ thể neurokinin-1 (NK-1R) thuộc nhóm các thụ thể xuyên màng liên kết với G-protein, biểu hiện mạnh nhất ở khu vực não bộ và có mặt ở các tế bào của hệ thống miễn dịch [1]. Chất P (SP) là phối tử có ái lực đặc hiệu với NK-1R. Khi kết cặp với SP, NK-1R kích thích

quá trình truyền tin trong tế bào dẫn tới điều hòa cảm giác đau từ vùng thần kinh ngoại vi về hệ thần kinh trung ương, gây ra các trạng thái lo âu và các triệu chứng trầm cảm, ngoài ra cũng gây tác dụng kích thích cơ cơ trơn và ảnh hưởng đến điều hòa phản ứng miễn dịch của cơ thể [2]. Ngoài ra, NK-1R khi hoạt hóa còn gây các tín hiệu đáp ứng viêm trên một số mô hình chuột bị viêm do nhiễm trùng [3]. Theo nghiên cứu gần đây, NK-1R ở trạng thái hoạt hóa thúc

* Tác giả liên hệ. Tel. 84-0984814776.
E-mail: cuongtrinhhat@gmail.com

đây tế bào lympho (lymphocyte) tiết interferon gamma (IFN- γ) [3]. Capsaicin được tách chiết từ Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.), ớt (*Capsicum frutescens* L.) ... được biết có tác dụng giảm đau thần kinh sau khi kết cặp với thụ thể TRPV1 thông qua thúc đẩy giải phóng SP [4]. Để tìm hiểu dịch chiết Hồ tiêu được giả thiết có chứa capsaicin có tác động trực tiếp đến thụ thể NK-1R hay không, chúng tôi tiến hành xây dựng điều kiện kỹ thuật cho phép đánh giá sự biểu hiện chức năng của thụ thể NK-1R ở tế bào lympho chuột do tác động của phối tử SP và khả năng ảnh hưởng của dịch chiết được liệu từ cây Hồ tiêu đến con đường truyền tin này. Kết quả nghiên cứu cho thấy, dịch chiết Hồ tiêu không làm tăng hoạt động của thụ thể NK-1R như dự đoán và thay vào đó ức chế hoạt động của nó. Như vậy, có thể trong Hồ tiêu, ngoài capsaicin, còn chứa các thành phần nào đó có tác động đến hoạt động của thụ thể NK-1R được hoạt hóa bởi SP theo cơ chế đối kháng (antagonist).

2. Vật liệu và phương pháp

Đối tượng và vật liệu: Chuột nhắt trắng (*Mus musculus*) dòng Swiss được mua từ Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Kit tách tế bào lympho Ficol-paque PLUS của GE-Health care (Mỹ); chất P (SP), aprepitant (AP, là chất ức chế NK-1R), kháng thể kháng NK-1R được mua từ Sigma (Đức); kit ELISA IFN- γ được mua từ BD Biociences (Mỹ); môi trường RPMI 1640, FBS, kháng sinh được mua từ Invitrogen™ (Life Technologies, Singapo); đĩa ELISA 24 giếng và 96 giếng được mua từ Corning (Mỹ). Dược liệu được Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu cung cấp trong khuôn khổ Đề tài độc lập cấp nhà nước mã số PTNTĐ2011-G/04.

Tách và nuôi tế bào lympho: Tế bào được tách từ huyết thanh chuột bằng kit Ficol-paque PLUS theo quy trình của hãng. Tế bào sau đó được nuôi trong RPMI 1640 chứa 10% FBS.

Phân tích ELISA: Tế bào lympho được xử lý rồi phân tích bằng ELISA như mô tả trước đây [5]. Cytokine IFN- γ mà tế bào tiết ra được định lượng bằng ELISA. Các bước phân tích được thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (BD Biociences).

Western Blot: Tế bào lympho được xử lý và phân tích Western Blot như mô tả trước đây [5]. Kháng thể kháng NK-1R được pha loãng với tỉ lệ 1:1000. Màng chuyển protein được phát hiện bằng Chemiluminescence (ECL, GE HealthCare).

Thử hoạt tính sinh học: Dịch chiết methanol được liệu có nồng độ khác nhau (từ 0 đến 40 g/ml) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào với với thể tích không quá 5%. Đối chứng được bổ sung cùng thể tích dung môi nhưng không chứa dịch chiết được liệu. Cytokine được so sánh giữa các lô đối chứng và các lô thí nghiệm.

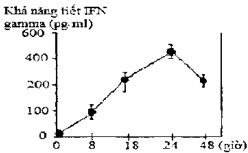
Thu thập số liệu và xử lý thống kê: Số liệu được thu từ 3 thí nghiệm lặp lại độc lập, được biểu hiện bằng giá trị trung bình \pm phương sai tiêu chuẩn (\pm SD) và được phân tích bằng Student's T-test với điều chỉnh Bonferroni hoặc ANOVA. Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. SP kích thích tế bào lympho tăng tiết IFN- γ

Công bố trước đây [2] cho thấy SP có khả năng kích hoạt NK-1R trong tế bào lympho thúc đẩy sản sinh IFN- γ . Do vậy, để khẳng định

lại khả năng kích thích sinh IFN- γ của SP, tế bào lympho chuột đã được tách và nuôi ủ với SP ở nồng độ 10^{-4} mM qua các khoảng thời gian khác nhau là 0, 8, 18, 24 và 48 giờ. Sau đó, tế bào từ dịch nuôi được thu lại bằng ly tâm và IFN- γ tiết ra được định lượng bằng ELISA. Kết quả thí nghiệm (Hình 1) cho thấy dưới tác dụng của SP, lượng IFN- γ sinh ra tăng dần trong ngày đầu tiên và đạt tối đa sau khoảng 24 giờ nuôi cấy. Đây là thời điểm tế bào nuôi được lựa chọn để định lượng cytokine IFN- γ trong các thí nghiệm tiếp theo.

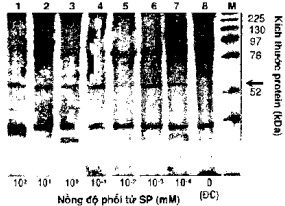


Hình 1. Phôi từ SP kích thích tế bào lympho sản sinh IFN- γ . Trong thí nghiệm, 5×10^5 tế bào được ủ với 10^{-4} mM phôi từ, IFN- γ qua thời gian được định lượng bằng ELISA.

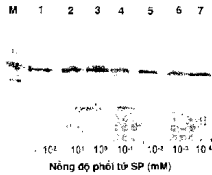
3.2. Phôi từ SP kích thích tăng biểu hiện của thụ thể NK-1R trên tế bào lympho

Để đánh giá sự biểu hiện thụ thể NK-1R trên tế bào lympho có được kích thích bởi SP, các tế bào lympho đã được ủ với SP ở các nồng độ tăng dần từ 0 đến 10^{-2} mM (với các bậc pha loãng như mô tả ở Hình 2), rồi sau đó phức hệ protein được phân tích bằng điện di trên gel SDS-PAGE. Kết quả thí nghiệm (Hình 2) cho thấy: nếu như các tế bào lympho đối chứng (không được ủ với SP; lần điện di số 8 trên hình) không cho bằng protein có kích thước

kDa (vị trí mũi tên), thì các tế bào lympho được xử lý với SP ở các nồng độ thí nghiệm trong khoảng 10^{-4} đến 10^{-2} mM (các lần điện di 1 - 7) đều cho bằng này. Đây chính là kích thước phân tử của protein mong đợi NK-1R.



Hình 2. Tế bào lympho biểu hiện NK-1R do kích thích của phôi từ SP. Vị trí mũi tên (58 kDa) là kích thước phân tử của NK-1R; các lần 1-7: các tế bào được xử lý với SP ở nồng độ khác nhau, lần 8: đối chứng (không xử lý với SP), M: thang kích thước protein (marker).



Hình 3. Xác định thụ thể NK-1R bằng Western Blot. Các lần 1-7: các tế bào được xử lý với SP ở nồng độ khác nhau từ 10^{-2} đến 10^{-4} mM. M: hỗn hợp protein trong thang kích thước (marker).

Tuy vậy, để khẳng định chắc chắn protein 58 kDa là NK-1R, các tế bào lympho sau khi được ủ với SP ở các nồng độ khác nhau đã được thu protein và phân tích Western blot với

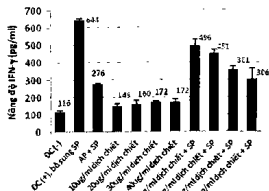
kháng thể kháng NK-1R như mô tả ở phần phương pháp. Kết quả trên Hình 3 cho thấy các tế bào được ủ với SP ở các nồng độ từ 10^{-4} đến 10^2 mM đều cho một băng duy nhất. Điều này khẳng định chính xác protein 58 kDa thu được là NK-1R và SP đã kích thích thụ thể NK-1R biểu hiện và hoạt động trên tế bào lympho chuột trong nuôi cấy invitro.

Từ kết quả nghiên cứu này có thể nhận định phối tử SP kích thích (hoặc ít nhất làm tăng) sự biểu hiện của thụ thể NK-1R trên tế bào lympho chuột nuôi cấy invitro. Sự kích thích này thu được ngay ở nồng độ SP thấp nhất trong thí nghiệm là 10^{-4} mM.

3.3. Dịch chiết Hồ tiêu ức chế hoạt động của thụ thể NK-1R trên tế bào lympho được kích thích bởi phối tử SP

Để đánh giá khả năng tác động của dịch chiết Hồ tiêu lên NK-1R, tế bào lympho được ủ với AP (chất ức chế NK-1R) ở nồng độ 10^{-2} mM trong 24 giờ làm đối chứng dương (ĐC(+)). Sau đó, các tế bào được ủ với AP hoặc không (ĐC(-)) được ủ kế tiếp với SP ở nồng độ 10^{-4} mM hoặc với dịch chiết Hồ tiêu ở các nồng độ 10, 20, 30 và 40 μ g/ml (được liệu khô/dung môi) trong 24 giờ (xem mô tả các phương thức thí nghiệm ở Hình 4). Dịch tế bào thu được sau đó được phân tích bằng ELISA để đánh giá khả năng sinh IFN- γ . Kết quả trên hình 4 cho thấy, việc bổ sung SP rõ ràng làm tăng sinh IFN- γ từ 116 pg/ml (ĐC (-)) lên 644 pg/ml (ĐC (+)); tuy vậy, nồng độ IFN- γ giảm rõ rệt khi dịch nuôi được bổ sung chất ức chế NK-1R là aprepitant (AP). Nồng độ IFN- γ lúc này giảm chỉ còn 276 pg/ml. Việc bổ sung dịch chiết Hồ tiêu vào tế bào lympho khi vắng mặt SP không làm tăng đáng kể sự tiết IFN- γ so với đối chứng (ĐC (-)) có thể được giải thích do sự biểu hiện yếu của NK-1R ở dòng tế bào này khi thiếu vắng phối tử. Điều này đồng thời khẳng định sự tăng giảm

nồng độ IFN- γ được tiết ra trong phép thử được thiết lập chủ yếu được điều hòa qua NK-1R.



Hình 4. Sự ức chế sinh IFN- γ của dịch chiết Hồ tiêu tác động qua thụ thể NK-1R ở tế bào lympho chuột nuôi cấy invitro. ĐC (-) = Tế bào không được xử lý, ĐC (+) = Dịch tế bào được bổ sung SP (10^{-4} mM), AP = aprepitant (chất ức chế NK-1R) được bổ sung ở nồng độ 10^{-2} mM, SP = substance P (phối tử đặc hiệu NK-1R) được bổ sung ở nồng độ 10^{-4} mM, dịch chiết = dịch chiết methanol Hồ tiêu ở nồng độ khác nhau (10 – 40 μ g/ml).

Tuy vậy, khi các tế bào lympho đồng thời được xử lý với phối tử SP và ủ với nồng độ tăng dần của dịch chiết Hồ tiêu từ 0 (ĐC (+)) lên 10, 20, 30 và 40 μ g/ml thì lượng IFN- γ sinh ra giảm rõ rệt tương ứng từ 644 xuống 496, 451, 361 và 306 pg/ml. Từ kết quả này, có thể xác định dịch chiết Hồ tiêu có khả năng ức chế quá trình hoạt động của NK-1R. Vì capsaicin được cho có thể thúc đẩy hoạt động của thụ thể NK-1R do kích thích sản sinh SP thông qua hoạt hóa con đường truyền tin của thụ thể TRPV1 [4], nhưng trong nghiên cứu này dịch chiết Hồ tiêu ức chế mạnh hoạt động của NK-1R cho thấy hoạt động ức chế thụ thể NK-1R có thể không liên quan đến capsaicin thông qua con đường TRPV1. Đồng thời, kết quả nghiên cứu cho thấy, có lẽ trong dịch chiết Hồ tiêu đã chứa hợp chất nào đó ức chế mạnh hoạt động của thụ thể NK-1R theo cơ chế đối kháng (antagonist). Để xác định bản chất hóa học thành phần đối kháng thụ thể NK-1R ở Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) cần có những nghiên cứu bổ sung.

4. Kết luận

Chúng tôi đã thiết lập được mô hình đánh giá khả năng tương tác của các dịch chiết được liệu với thụ thể NK-1R trên tế bào lympho chuột nuôi cấy invitro thông qua đo khả năng sinh IFN- γ được kích thích bởi phối tử đặc hiệu thụ thể là SP (substance P). Sự sinh IFN- γ trong tế bào lympho chuột khi được kích thích bởi SP chủ yếu là do hoạt động truyền tín hiệu của thụ thể NK-1R. Dịch chiết được liệu từ cây Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) ức chế mạnh hoạt động của NK-1R được hoạt hóa bởi SP cho thấy nhiều khả năng được liệu này chứa được chất tác động lên thụ thể NK-1R theo cơ chế đối kháng.

Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Bộ Khoa học và Công nghệ (Việt Nam) cho đề tài PINTĐ.2011-G/04 để thực hiện nghiên cứu này

Methanolic Extracts of Pepper (*Piper nigrum* L.) Inhibits Substance P-Induced Activation of Neurokinin 1 Receptor (NK-1R) in Murine Lymphocytes

Trịnh Tất Cường¹, Giang Huy Diễm², Trần Trung Đoàn²,
Phạm Thanh Huyền³, Đinh Đoàn Long^{1,2}

¹Key Lab for Enzyme-Protein Technology, VNU University of Science, 334 Nguyễn Trãi, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyễn Trãi, Hanoi, Vietnam

³Department of Medicinal Resources, Institute of Medicinal Materials, 3rd Quang Trung, Hanoi, Vietnam

⁴School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University,
144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hanoi, Vietnam

Abstract: In this study, we demonstrated Substance P (SP) induced the release of interferon-gamma (IFN- γ) from murine lymphocytes under invitro conditions. Moreover, SP stimulated the expression of neurokinin-1 receptor (NK-1R) on lymphocytes. Methanolic extracts derived from pepper (*Piper nigrum* L.) seeds inhibited potently SP-induced activity of NK-1R suggested that these receptors might be the target sites for certain constituents of pepper extracts, though may not associate with capsaicin via TRPV1 pathway. What constituents in pepper extracts that might provoke antagonistic activity of on NK-1R may be another topic for further pharmacological studies of *Piper nigrum* L.

Keywords: Neurokinin-1 Receptor, Substance P, Capsaicin, Pepper (*Piper nigrum* L.), Antagonist.

Tài liệu tham khảo

- [1] Cook GA, Elliott D, Metwally A, Blum AM, Sandor M, Lynch R, Weinstock JV (1994). Molecular evidence that granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni express an authentic substance P (NK-1) receptor. *J. Immunol.* 152, 1830-5
- [2] Beamborn M, Blum A, Hang L, Setiawan T, Schroeder JC, Stoyanoff K, Leung J, Weinstock JV. TGF-beta regulates T-cell neurokinin-1 receptor internalization and function (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 107(9): 4293-8.
- [3] Baker SJ, Morris JL, Gibbins IL (2003). Cloning of a C-terminally truncated NK-1R from guinea-pig nervous system *Bran Res Mol Brain Res*. 11(1-2), 136-47.
- [4] Arpad S, Peter MB (1999). Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacol Rev*. 51(2): 159-212.
- [5] Chul-Su Y, Sung-Ryong K, Byung-Goo C, Dong-Min S, Jae-Min Y, Sheng-Jin L, Jin-Mao K, Evans RM, Jun-Sub J, Dong-Keun S, Eun-Kyeong (2008). The ginsenoside metabolite compound K, a novel agonist of glucocorticoid receptor, induces tolerance to endotoxin-induced lethal shock *J. Cell Mol. Med*, 12 (1): 1-17.