

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC PHÂN ĐOẠN PEPTIDE TỪ LÁ CÂY THUỐC THANH TÁO (*Justicia gendarussa* Burm f.) TRÊN SỰ GIẢI PHÓNG CỦA CÁC CYTOKINE TIỀN VIÊM *IN VITRO*

Võ Hoài Bắc^{1,2,*}, Lê Thị Thu Hồng^{1,2}, Trịnh Tất Cường³, Lê Văn Trường¹

¹ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

*Email: vhbac@ibt.ac.vn

TÓM TẮT

Cây thanh táo (*Justicia gendarussa* Burm f.) là một cây thuốc quý thuộc họ Acanthaceae mọc ở nhiều nơi tại Việt Nam và được sử dụng trong dân gian để chữa một số bệnh như: Đau xương, viêm khớp, giảm ho, hạ sốt, mụn nhọt.... Trong những năm gần đây, việc sử dụng các peptide tự nhiên có hoạt tính sinh học từ các loại thảo mộc để điều trị các bệnh mãn tính và cải thiện sức khỏe của con người được sử dụng rộng rãi. Trong nghiên cứu này, các peptide tự nhiên và peptide sau thủy phân của cây thuốc Thanh táo (TT) được phân lập và đánh giá ảnh hưởng trên sự giải phóng của các cytokine tiền viêm *in vitro*. Các phân đoạn peptide đã được phân lập bằng cột siêu lọc Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore) với các mức cắt giảm khối lượng phân tử khác nhau (≤ 30 kDa, ≤ 10 kDa và ≤ 5 kDa), xác định độ sạch và khối lượng phân tử bằng phương pháp điện di trên gel Tricine-SDS-PAGE. Kết quả cho thấy, lá cây TT chiết bằng nước cất lạnh đã thu nhận được phân đoạn chứa peptide tự nhiên có khối lượng phân tử 14 kDa. Protein từ lá cây TT được thủy phân bằng pepsin và pancreatin trong 1 giờ đã thu nhận được phân đoạn peptide ≤ 10 kDa. Ảnh hưởng của các phân đoạn peptide trên các cytokine tiền viêm được đánh giá trên tế bào macrophage gây viêm bằng LPS và xác định sự giải phóng của các cytokine bằng phương pháp ELISA. Kết quả cho thấy, các phân đoạn peptide TT tự nhiên và peptide TT sau thủy phân thu nhận được với nồng độ (10 - 40 $\mu\text{g/mL}$) không gây độc với đại thực bào. Phân đoạn peptide TT sau thủy phân ≤ 10 kDa với nồng độ 10 - 40 $\mu\text{g/mL}$ có khả năng ức chế sự giải phóng của TNF- α , IL-6 và IL-8 trên *in vitro* cao hơn so với phân đoạn peptide TT tự nhiên. Đây là cơ sở ban đầu để chứng minh tác dụng điều trị sưng viêm trong dân gian của lá cây TT.

Từ khóa: Cytokine, kháng viêm, *justicia gendarussa*, thanh táo, peptide.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, đã có sự gia tăng các nghiên cứu về các peptide có hoạt tính sinh học từ thảo dược để chống lại các bệnh mãn tính và nâng cao sức khỏe con người [1]. Thực vật giàu peptide có hoạt tính kháng viêm (AIPs) đã được sử dụng trong điều trị viêm [2]. Một số AIPs đã được sử dụng như thuốc để ngăn ngừa và kiểm soát viêm [3]. Các peptide tự nhiên có thể được thu nhận trực tiếp từ ngũ cốc, các loại hạt, trái cây và các nguồn tự nhiên khác... Cordymin là một loại

peptide được tách chiết từ quả khô của nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps sinensis* đã làm giảm sự giải phóng TNF- α và IL-1 β [4]. Citrusin XI, một peptide được tinh sạch từ trái cây *Citrus unshiu* có hoạt tính kháng viêm, ức chế sự giải phóng các chất trung gian gây viêm [5]. Các peptide hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ thực vật có thể thu được với số lượng lớn bằng phương pháp thủy phân bằng enzym, thủy phân hóa học và lên men vi sinh các protein thực vật. Các peptide hoạt tính sinh

học từ thực vật có kích thước nhỏ hơn thường có hoạt tính sinh học cao hơn do tăng khả năng hấp thụ ở ruột cao hơn so với các protein và peptide có kích thước lớn [6]. Một số peptide có nguồn gốc từ protein của thực phẩm có hoạt tính sinh học cao sau quá trình tiêu hóa hoặc lên men thực phẩm [7]. Một nghiên cứu khác cho thấy, các protein từ hạt cây dền *Amaranthus* sau quá trình thủy phân tạo các peptide có hoạt tính kháng viêm và điều hòa miễn dịch trên mô hình chuột gây dị ứng [8]. Hiện nay, các peptide hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ thực vật đang nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học trong cả lĩnh vực dinh dưỡng và dược phẩm.

Cây TT (*Justicia gendarussa* Burm f.) còn gọi là tần cừu, thuộc họ Ô rô (Acanthaceae). Theo kinh nghiệm dân gian, lá hoặc cành TT giã nát được sử dụng để đắp vào các vết sưng, chữa đau xương hoặc chữa các bệnh vàng da hay ho, sốt... Một số chất thứ cấp đã được phân lập từ cây TT và xác định cấu trúc như: 2-amino benzyl alcohol [9], stigmasterol, lupeol, 1 6-hydroxylupeol, β -sitosterol, aromadendrin, β -Sitosterol- β -D-glycoside [10]. Subramanian (2012) [11] đã chứng minh dịch chiết bằng ethanol và methanol của cây TT có tác dụng kháng viêm trên chuột sau khi gây viêm cục bộ bằng carrageenan. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu phân lập và xác định các tác dụng sinh học của các peptide từ cây TT.

Trong nghiên cứu này, các phân đoạn peptide từ lá cây TT sẽ được phân lập và đánh giá ảnh hưởng lên sự giải phóng các cytokine tiền viêm của đại thực bào. Các kết quả nghiên cứu là những dẫn chứng khoa học ban đầu, làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo đánh giá tác dụng kháng viêm trên *in vivo* và các tác dụng sinh học khác của các peptide từ lá cây thuốc TT.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị

2.1.1. Vật liệu

Mẫu lá cây TT được thu nhận tại thành phố Hà Nội và được Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật phân loại, xác định tên khoa học.

2.1.2. Hóa chất

Pepsin®, Pancreatin®, Folin, BSA, Acrylamide, Bis-acrylamide, PMSF (Sigma-

Aldrich, Mỹ); Temed, Protein Ladder (Thermoscientific, Mỹ); ethanol 96° (Việt Nam). Tế bào macrophage RAW 264.7 có nguồn gốc từ ATCC (American Type Culture Collection), kit đo CCK8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto) được sử dụng để đo nồng độ cytokine từ BD Pharmingen (Franklin Lakes).

2.1.3. Thiết bị

Máy quang phổ UV 1601 (Visible Spectrophotometer 1601, Trung Quốc), máy đo pH Corning 215 (Anh), máy điện di protein (Bio-Rad, Mỹ), tủ nuôi cấy tế bào (Thermo Scientific, Mỹ), cân kỹ thuật (Caltex, Đức), máy ly tâm lạnh (Thermo Fisher, Mỹ), bể ổn nhiệt (Trung Quốc), bộ lọc Amicon Ultra Centrifugal Filters (Merck Millipore, Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xử lý nguyên liệu

Lá tươi cây TT sau khi thu hái, rửa sạch được để - 20°C trong 24 giờ, được nghiền mịn đồng nhất trong nước cất lạnh theo phương pháp của Shen và cs (2019) [12] hoặc trong axit acetic 10% theo phương pháp của Barashkova và Rogozhin (2020) [13].

2.2.2. Thu nhận các phân đoạn peptide

- Thu nhận các phân đoạn peptide TT tự nhiên

Lá tươi TT để ở - 20°C được nghiền mịn đồng nhất bằng nước cất lạnh hoặc trong axit acetic 10% với tỷ lệ 1 g/5mL dịch chiết và bổ sung chất ức chế protease với nồng độ 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) trong dịch chiết. Sau đó dịch chiết được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C thu dịch chứa hỗn hợp protein và các peptide tự nhiên. Protein và các peptide được rửa bằng ethanol theo tỷ lệ 1 V dịch chiết/4 V ethanol ở 4°C trong 24 giờ, sau đó thu rửa protein và peptide bằng ly tâm 12.000 vòng/phút ở 4°C. Rửa protein và peptide được hòa lại bằng nước cất theo tỷ lệ (10 mg rửa/mL). Các protein và peptide sẽ được phân tách các phân đoạn có khối lượng phân tử khác nhau bằng bộ lọc Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore) với các mức sàng lọc ≤ 30 kDa, ≤ 10 kDa và ≤ 5 kDa theo phương pháp của Laviada-Castillo (2019) [14].

- Thu nhận các phân đoạn peptide TT sau thủy phân bằng enzym

Quá trình chiết xuất protein và các peptide tương tự như chiết các protein và peptide tự nhiên đã mô tả ở trên. Dịch chiết sau ly tâm được rửa ethanol tỷ lệ 1/4 (1 dịch chiết/4 ethanol) thu được chế phẩm gồm các protein và peptide. Các protein thu nhận từ lá cây TT được phân hủy bằng enzyme pepsin và pancreatin [15].

Hòa tan chế phẩm protein thu được sau rửa cồn bằng nước cất và được thủy phân bằng pepsin với tỷ lệ enzym/cơ chất là 5% ở 37°C, pH 2,0 trong thời gian 30, 60 và 90 phút. Tiếp theo, thủy phân lần 2 bằng pancreatin với tỷ lệ enzym/cơ chất 5%, thời gian 30, 60 và 90 phút ở nhiệt độ 37°C, pH 7,5 theo phương pháp của Herrera Chalé và cs (2014) [15]. Các phân đoạn peptide sau thủy phân sẽ được phân tách theo khối lượng phân tử bằng bộ lọc Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore) với các mức sàng lọc ≤ 30 kDa, ≤ 10 kDa và ≤ 5 kDa theo phương pháp của Laviada-Castillo (2019) [14]. Dịch chứa các phân đoạn peptide được bảo quản lạnh ở nhiệt độ -20°C để sử dụng cho các phân tích tiếp theo.

2.2.3. Xác định độ sạch và khối lượng phân tử của peptide bằng phương pháp điện di trên gel Tricine-SDS-PAGE 16%

Điện di Tricine-SDS-PAGE được tiến hành theo phương pháp của Schägger và Von Jagow (1987) [16]. Mẫu peptide 3 μ L được chạy trên gel acrylamide Tricine-SDS 16% với cường độ dòng điện 80 V trong 15 phút, sau đó tăng cường độ lên 150 V trong khoảng 1 giờ cho chạy điện di 1 bản gel.

2.2.4. Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein của mẫu được xác định theo phương pháp Lowry và cs (1951) [17]. Dịch mẫu (1 mL) được thêm vào 5 mL dung dịch D (bao gồm: 100 thể tích dung dịch A (2% Na_2CO_3 trong 0,1 M NaOH + 1 thể tích dung dịch B (1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pha trong nước cất) + 1 dung dịch C (2% sodium potassium tartrate pha trong nước cất), lắc nhẹ, để 10 phút ở nhiệt độ thường. Phản ứng được thêm 0,5 mL dung dịch Folin & Ciocalteu's (Sigma-Aldrich, Mỹ) pha loãng 2 lần để

trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Màu của phản ứng được đo độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm (mẫu đối chứng là mẫu nước cất không chứa protein). Hàm lượng protein được định lượng dựa trên số đo OD thu được của mẫu thí nghiệm đối chiếu với đồ thị chuẩn BSA (albumin huyết thanh bò).

2.2.5. Đánh giá ảnh hưởng của các phân đoạn peptide lên khả năng sống sót của đại thực bào

Tế bào macrophage RAW264.7 (ATCC) được nuôi trên đĩa 96 giếng với mật độ 5.10^4 tế bào/mL trong 200 μ L/giếng môi trường DMEM, 10% FBS ở điều kiện 37°C, 5% CO_2 trong 24 giờ. Các mẫu peptide được pha loãng ở các nồng độ 10, 20, 40 μ g/mL tương đương đưa lần lượt vào mỗi giếng 2, 4, 8 μ L mẫu peptide được pha trong DMSO (100 μ g/100 μ L) hoặc với 10% DMSO (mẫu đối chứng - ĐC). Mỗi nồng độ peptide và ĐC được bổ sung vào 3 giếng tế bào, tiếp tục duy trì ở 37°C, 5% CO_2 trong tủ ấm trong 24 giờ. Khả năng sống của tế bào được đánh giá sử dụng bộ dung dịch CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Merck, 96992), 10 μ L dung dịch CCK-8 được ủ trong 1 giờ với các tế bào được xử lý bằng mẫu peptide. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc ELISA (BioTek Synergy® HT microplate reader – Mỹ).

2.2.6. Xác định ảnh hưởng của các phân đoạn peptide lên sự giải phóng các cytokine

Tế bào macrophage RAW264.7 (đại thực bào tham gia vào quá trình sinh ra các chất tiền viêm chẳng hạn như các cytokine: TNF- α , IL-6, IL-8 hoặc các cytokine kháng viêm như: IL-10 trong quá trình miễn dịch bẩm sinh khi có vi sinh vật xâm nhập vào cơ thể), đây cũng là dòng tế bào được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu kháng viêm [18], được tiền xử lý cùng với peptide trong 45 phút. Sau đó, các tế bào được xử lý tiếp với LPS (lipopolysaccharide từ vi khuẩn gram âm) trong 18 giờ, sau đó thu dịch để xác định nồng độ các cytokine giải phóng ra và được đo bằng kit ELISA của hãng BD Biosciences [19].

2.2.7. Phân tích thống kê

Phân tích thống kê được thể hiện ý nghĩa bằng $\pm$ SD. Sự khác biệt giữa các nhóm được xử lý thống kê theo bảng ANOVA One way. Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

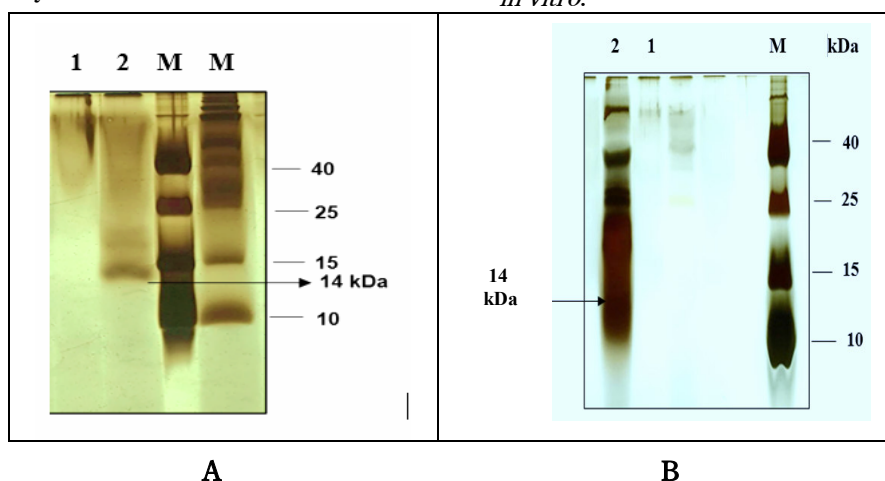
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết và thu nhận các phân đoạn peptide từ lá cây TT

3.1.1. Tách chiết và thu nhận các phân đoạn peptide tự nhiên từ lá cây TT

Nghiên cứu của Shen và cs (2019) [12], Kini và cs (2017) [20], Wong và cs (2017) [21], Barashkova và Rogozhin (2020) [22] cho thấy, nước hoặc dung dịch axit acetic 10% có khả năng chiết xuất hiệu quả peptide từ thực vật, đây cũng là các dung môi an toàn. Các dung môi khác nhau sẽ chiết xuất được các protein và peptide có khối lượng phân tử khác nhau, do vậy đã lựa chọn 2 dung dịch chiết này để thu nhận các peptide tự nhiên từ lá cây TT.

Kết quả hình 1 cho thấy, lá cây TT chiết bằng nước cất lạnh thu nhận được băng peptide khoảng 14 kDa (Hình 1A). Kết quả hình 1B cho thấy, lá TT chiết bằng axit acetic 10% thu nhận nhiều các protein khác nhau có khối lượng phân tử cao hơn so với chiết bằng nước cất lạnh. Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy, các peptide có khối lượng phân tử nhỏ như peptide collagen (11,93 kDa) và peptide gelatin (16,62 kDa) từ da của cá ngừ vây vàng *Thunnus albacares* có hoạt tính chống oxy hóa [23]. Peptide 14 kDa từ loài sâu bột *Tenebrio molitor* có khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* [24]. Do vậy, đã lựa chọn phân đoạn peptide TT tự nhiên chiết bằng nước cất lạnh để sử dụng cho các nghiên cứu đánh giá tác dụng kháng viêm *in vitro*.



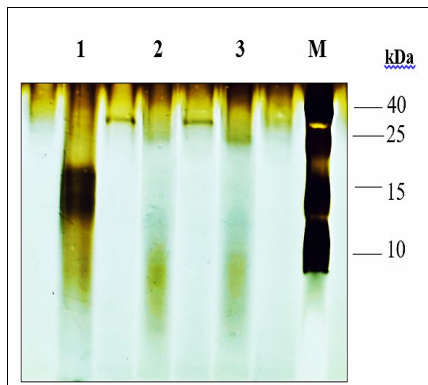
Hình 1. Điện di trên Gel Tricine-SDS-PAGE 16% các peptide TT tự nhiên từ lá cây TT. Gel được nhuộm bạc sau điện di

Ghi chú: M: Marker; 1: Phân đoạn peptide từ 5 - 10kDa, 2: Phân đoạn peptide từ 10 - 30kDa; A: Lá TT chiết bằng nước cất lạnh, B: Lá TT chiết bằng axit acetic 10%.

3.1.2. Tách chiết và thu nhận các phân đoạn peptide thủy phân từ protein của lá cây TT

Các peptide có khối lượng phân tử < 10kDa thường có hoạt tính sinh học mạnh so với các peptide khối lượng phân tử cao hơn do khả năng hấp thu tốt và vận chuyển nhanh đến cơ quan đích trong cơ thể [25, 26]. Nghiên cứu của González-Montoya và cs (2018) [27] cho thấy, phân đoạn peptide có khối lượng phân tử (5 - 10kDa) từ thủy phân protein đậu nành có hoạt động kháng viêm tốt nhất [27]. Do vậy, chúng tôi đã sử dụng 2 enzym là pepsin và pancreatin để thủy phân các

protein từ lá cây TT với mục đích thu nhận các phân đoạn peptide có kích thước ≤ 10 kDa. Kiểm tra dịch thủy phân tại các thời gian khác nhau bằng điện di Tricine SDS-PAGE, kết quả ở hình 2 (giếng 1) cho thấy, sau 30 phút thủy phân vẫn còn băng peptide đậm có kích thước trong khoảng 14 - 15kDa, sau 60 và 90 phút thủy phân, sử dụng cả 2 loại enzym pepsin và pancreatin đã cho phân đoạn peptide ≤ 10 kDa (hình 2; giếng 2 và 3). Như vậy, sau 1 giờ thủy phân protein từ lá cây TT đã thu nhận được phân đoạn chứa các peptide có khối lượng phân tử ≤ 10 kDa.

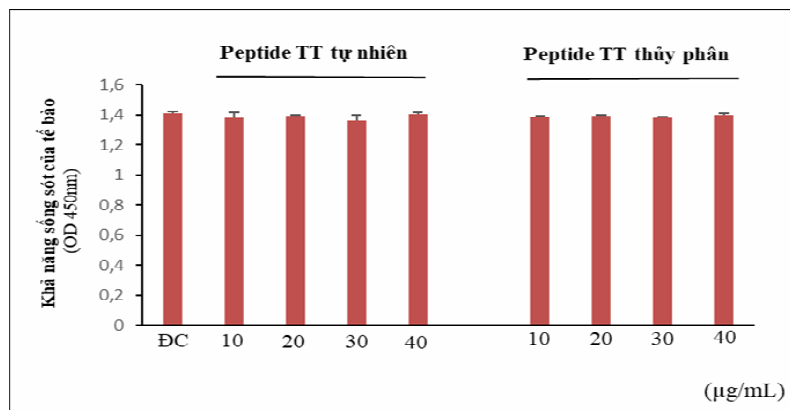


Hình 2. Điện di trên Gel Tricine-SDS-PAGE 16% các peptide TT thủy phân từ protein lá cây TT. Gel được nhuộm bạc sau điện di

Ghi chú: M: Marker; 1: Phân đoạn peptide dịch thủy phân sau 30 phút; 2: Phân đoạn peptide dịch thủy phân sau 60 phút; 3: Phân đoạn peptide dịch thủy phân sau 90 phút.

3.2. Đánh giá ảnh hưởng của các phân đoạn peptide đến khả năng sống sót của tế bào macrophage

Ảnh hưởng của peptide từ cây TT đến khả năng sống sót của đại thực bào RAW264.7 được xác định bằng thí nghiệm MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), đây là phương pháp đã được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của các chất đến khả năng sống sót của các tế bào [28].



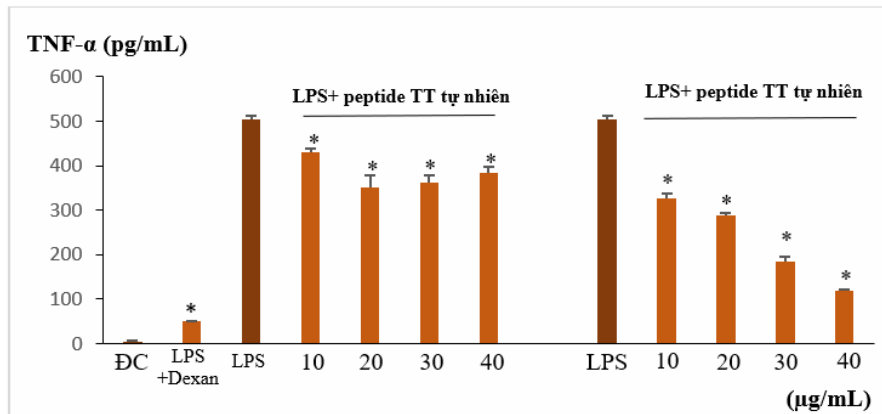
Hình 3. Ảnh hưởng của các phân đoạn peptide TT tự nhiên và TT thủy phân lên khả năng sống sót của tế bào RAW264.7

Khả năng sống sót của tế bào tại các giếng được tra mẫu chứa phân đoạn peptide tự nhiên và phân đoạn peptide sau thủy phân tại các nồng độ 10, 20, 30, 40 µg/mL không có sự khác biệt đáng kể so với khả năng sống sót của tế bào tại giếng đối chứng sinh học (giếng tế bào chỉ nuôi trong môi trường nuôi cấy) (Hình 3). Kết quả cho thấy, các peptide từ lá cây TT với nồng độ từ 10 - 40 µg/mL không ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tế bào macrophage RAW264.7.

3.3. Đánh giá ảnh hưởng của các phân đoạn peptide đến sự giải phóng cytokine tiền viêm trên *in vitro*

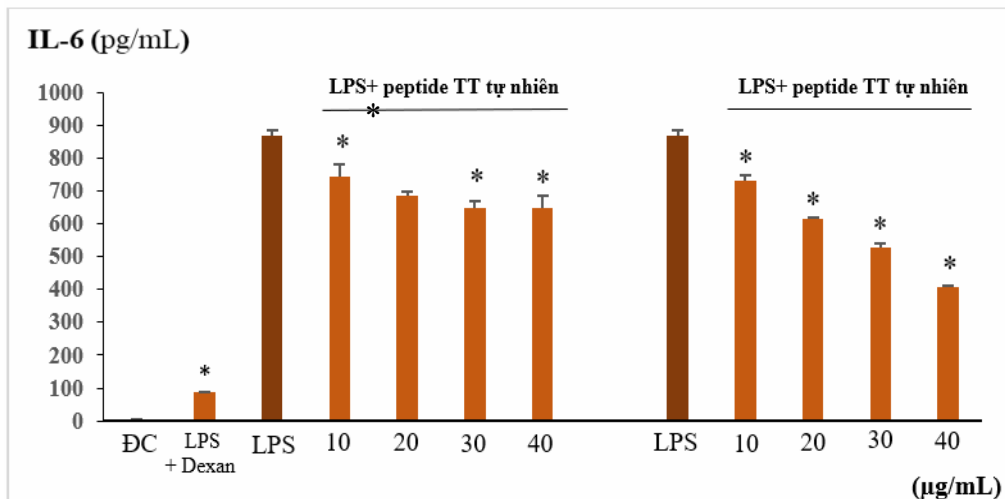
Mẫu chứa các phân đoạn peptide tự nhiên và peptide sau khi thủy phân protein từ lá cây TT ở các nồng độ 10, 20, 30, 40 µg/mL được tra vào giếng chứa tế bào RAW 264.7. Cảm ứng đại thực bào RAW 264.7 bằng LPS với nồng độ 1 µg/mL

trong 24 giờ gây đáp ứng viêm. Hình 4, 5, 6 cho thấy, các đại thực bào được kích thích bởi LPS đã giải phóng mạnh các cytokine tiền viêm TNF α , IL-6, IL-8. Khi giải phóng các cytokine gây viêm quá mức có thể dẫn đến tình trạng viêm mãn tính và gây ra các vấn đề có hại cho sức khỏe như: Ung thư [29], bệnh tim mạch [30]. Do đó, kiểm soát việc giải phóng các cytokine gây viêm sẽ làm giảm biểu hiện viêm quá mức ở những bệnh nhân bị viêm cấp tính. Kết quả ở hình 4 cho thấy, nhóm điều trị peptide TT tự nhiên và peptide TT sau thủy phân đều có khả năng ức chế TNF- α với nồng độ từ 10 - 40 µg/mL. Nhóm điều trị peptide TT sau thủy phân ở nồng độ 40 µg/mL đã ức chế sự giải phóng TNF- α 4 lần, trong khi điều trị peptide TT tự nhiên chỉ ức chế sự giải phóng TNF- α 1,3 lần so với nhóm gây cảm ứng LPS không điều trị peptide TT ($p \leq 0,05$).



Hình 4. Ảnh hưởng của các phân đoạn peptide TT tự nhiên và TT thủy phân trên sự giải phóng của TNF-α

Ghi chú: * $p < 0,05$: Sự khác nhau có ý nghĩa của nhóm cảm ứng LPS điều trị peptide TT so với nhóm gây cảm ứng LPS không điều trị.



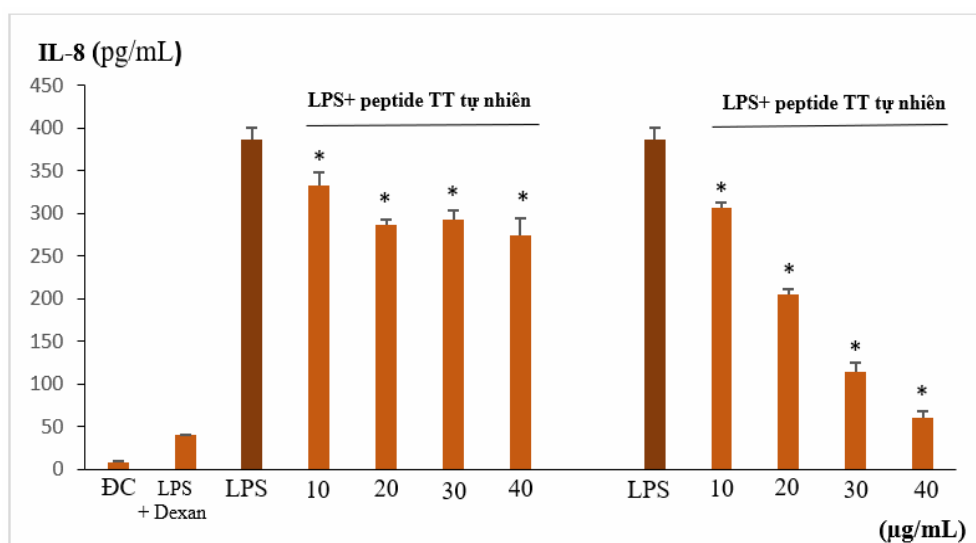
Hình 5. Ảnh hưởng của các phân đoạn peptide TT tự nhiên và TT sau thủy phân trên sự giải phóng của IL-6

Ghi chú: * $p < 0,05$: Sự khác nhau có ý nghĩa của nhóm cảm ứng LPS điều trị peptide TT so với nhóm LPS không điều trị.

Kết quả ở hình 5 cũng cho thấy, phân đoạn peptide TT sau thủy phân có khả năng ức chế IL-6 cao hơn so với phân đoạn peptide TT từ dịch chiết tự nhiên. Tại cùng nồng độ 40μg/mL, phân đoạn peptide TT tự nhiên ức chế sự giải phóng của IL-6 khoảng 1,3 lần, trong khi đó phân đoạn peptide TT sau thủy phân có khả năng ức chế sự giải phóng của IL-6 là 2,1 lần so với nhóm LPS không điều trị ($p \leq 0,05$).

Kết quả ở hình 6 cho thấy, khả năng ức chế IL-8 của phân đoạn peptide TT sau thủy phân cao hơn rất

nhiều so với phân đoạn peptide TT tự nhiên. Sự khác biệt được thể hiện rõ nhất tại nồng độ 40μg/mL khi điều trị peptide TT tự nhiên, sự giải phóng IL-8 chỉ giảm khoảng 1,4 lần, trong khi đó khi điều trị peptide TT sau thủy phân, sự giải phóng của IL-8 giảm khoảng 6,3 lần so với nhóm LPS không điều trị và gần bằng nhóm điều trị Dexamethasone (một thuốc kháng viêm corticosteroid) (Hình 6). Cả 2 phân đoạn peptide TT tự nhiên và TT sau thủy phân đều không ảnh hưởng đến sự giải phóng của IL-10 (kết quả không trình bày).



Hình 6. Ảnh hưởng của peptide TT trên sự giải phóng của IL-8

Ghi chú: * $p < 0,05$: Sự khác nhau có ý nghĩa của nhóm cảm ứng LPS điều trị peptide TT so với nhóm gây cảm ứng LPS không điều trị.

Như vậy, các phân đoạn peptide TT tự nhiên và peptide TT thủy phân đều ức chế sự giải phóng của các cytokine tiền viêm trên mô hình *in vitro*. Kết quả nghiên cứu trên cho thấy, khi thủy phân các protein từ lá TT đã thu được các phân đoạn peptide có khối lượng phân tử ≤ 10 kDa, làm tăng khả năng ức chế sự giải phóng của các cytokine. Điều này cũng đã được chỉ ra trong một nghiên cứu tổng quan về các peptide từ thực vật cho thấy, các peptide có khối lượng phân tử nhỏ hơn thường có hoạt tính sinh học cao hơn do tăng khả năng hấp thụ ở tế bào ruột cao hơn so với các protein và peptide có khối lượng phân tử lớn hơn [6].

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, peptide TT tự nhiên từ lá cây TT có hoạt tính ức chế sự giải phóng của các cytokine gây viêm, có thể sử dụng trực tiếp đắp trên các vết sưng đau như kinh nghiệm đã được dùng trong dân gian Việt Nam [31] hoặc khi sử dụng bằng đường uống sau khi tiêu hóa, các protein từ lá cây TT được các enzym đường tiêu hóa thủy phân sẽ tạo thành các peptide có kích thước nhỏ hơn và có tác dụng kháng viêm mạnh như đã được sử dụng trong y học cổ truyền của Trung Quốc [32]. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, các peptide có khối lượng phân tử thấp sau khi được thủy phân bằng một số enzym tiêu hóa có khả năng hấp thu tốt hơn các protein có

khối lượng phân tử cao, làm tăng khả năng vận chuyển đến các cơ quan đích để phát huy tác dụng kháng viêm của chúng [33]. Gần đây, một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy, các peptide từ thực vật là nguồn dược liệu tiềm năng [34]. Các peptide sau quá trình thủy phân từ hạt cây dền *Amaranthus* có hoạt tính kháng viêm và điều hòa miễn dịch trên mô hình chuột gây dị ứng [8]. Các phân đoạn peptide sau thủy phân protein từ hạt cây chia *Salvia. hispanica* L có tác dụng ức chế sự giải phóng của các cytokine và kháng viêm mạnh [35].

4. KẾT LUẬN

Lá cây TT chiết bằng nước cất lạnh đã thu nhận được phân đoạn chứa peptide tự nhiên có khối lượng phân tử khoảng 14 kDa và không lẫn nhiều các protein có khối lượng phân tử cao so với chiết bằng axit acetic 10%. Thủy phân protein từ lá cây TT bằng 2 loại enzym pepsin và pancreatin trong 1 giờ đã thu nhận được phân đoạn peptide ≤ 10 kDa. Các phân đoạn peptide TT tự nhiên và peptide TT sau thủy phân với nồng độ 10 - 40 µg/mL không gây độc với đại thực bào. Phân đoạn peptide TT sau thủy phân với nồng độ 10 - 40 µg/mL có khả năng ức chế mạnh sự giải phóng của TNF- α , IL-6 và IL-8 trên *in vitro* cao hơn so với phân đoạn peptide TT tự nhiên.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.02-2020.27.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Udenigwe C. C. & Aluko R. E (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1): R11 - R24.
2. Rivera-Jiménez J, Berraquero-García C, Pérez-Gálvez R, García-Moreno P. J, Espejo-Carpio F. J, Guadix A, Guadix E. M (2022). Peptides and protein hydrolysates exhibiting anti-inflammatory activity: sources, structural features and modulation mechanisms. *Food Funct*, 13(24): 12510 - 12540.
3. Usmani S. S., Bedi G., Samuel J. S., Singh S., Kalra S., Kumar P., Ahuja A. A., Sharma M., Gautam A. & Raghava G. P (2017). THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. *PloS one*, 12(7): e0181748.
4. Qian G. M., Pan G. F. & Guo J. Y (2012). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*. *Natural Product Research*, 26(24): 2358 - 2362.
5. Noh H. J., Hwang D., Lee E. S., Hyun J. W., Yi P. H., Kim G. S., Lee S. E., Pang C., Park Y. J. & Chung K. H (2015). Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrussin XI, isolated from the fruits of *Citrus unshiu*. *Journal of Ethnopharmacology*, 163: 106 - 112.
6. Liu W, Chen X, Li H, Zhang J, An J, Liu X. (2022). Anti-inflammatory function of plant-derived bioactive peptides: A Review. *Foods*, 11(15): 2361.
7. Guha S. & Majumder K (2019). Structural-features of food-derived bioactive peptides with anti-inflammatory activity: A brief review. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1): e12531.
8. Moronta J., Smaldini P. L., Docena G. H. & Anón M. C. (2016). Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. *Journal of Functional Foods*, 21: 463 - 473.
9. Chakravarty A. K., Dastidar P. P. G. & Pakrashi S. C (1982). Simple aromatic amines from *Justicia gendarussa*. 13C NMR spectra of the bases and their analogues. *Tetrahedron*, 38(12): 1797 - 1802.
10. Bachheti R., Pandey D., Joshi A. & Rana V. (2011). Chemical analysis of aerial parts of *Justicia gendarussa*. *International Journal of ChemTech Research*, 3(1): 244 - 247.
11. Subramanian N., Jothimanivannan C., Moorthy K (2012). Antimicrobial activity and preliminary phytochemical screening of *Justicia gendarussa* (Burm. f.) against human pathogens. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3): 229 - 233.
12. Shen Y., Xu L., Huang J., Serra A., Yang H., Tam J. P (2019). Potentides: new cysteine-rich peptides with unusual disulfide connectivity from *potentilla anserina*. *ChemBioChem*, 20: 1995 - 2004.
13. Barashkova A. S. & Rogozhin E. A (2020). Isolation of antimicrobial peptides from different plant sources: Does a general extraction method exist? *Plant Methods*, 16(1): 143.
14. Laviada-Castillo R. E., Segura-Campos M. R., Chan-Zapata I., Torres-Romero J. C., Guillermo-Cordero J. L. & Arana-Argáez V. E (2019). Immunosuppressive effects of protein derivatives from *Mucuna pruriens* on a streptozotocin-induced type 1 diabetes murine model. *Journal of Food Biochemistry*, 43(5): e12834.
15. Herrera Chalé F. G., Ruiz Ruiz J. C., Acevedo Fernández J. J., Betancur Ancona D. A., Segura Campos M. R (2014). ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochemistry*, 49(10): 1691 - 1698.
16. Schägger H. & Von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2): 368 - 379.

17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193(1): 265 - 275.
18. Bezerra I. D., Caillot A.vR., Palhares L. C., Filho A. P., Chavante S. F., Sassaki G. L (2018). Structural characterization of polysaccharides from Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc wines: Anti-inflammatory activity in LPS stimulated RAW264.7 cells. *Carbohydr. Polym*, 186: 91 - 99.
19. Cuong T. T., Diem G. H., Doan T. T., Huy N. Q., Phuong N. & Hung H. T (2018). Wedelolactone from Vietnamese *Eclipta prostrata* (L) L. protected zymosan-induced shock in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical research: IJPR*, 17(2): 653 - 660.
20. Kini S. G., Wong K. H., Tan W. L., Xiao T., Tam J. P. (2017). Morintides: cargo-free chitinbinding peptides from *Moringa oleifera*. *BMC Plant Biol*, 17: 1 - 13.
21. Wong K. H., Tan W. L., Kini S. G., Xiao T., Serra A., Sze S. K., James P. T (2017). Vaccatides: antifungal glutamine-rich hevein-like peptides from *Vaccaria hispanica*. *Front Plant Sci*, 8: 1100.
22. Barashkova A. S. & Rogozhin E. A (2020). Isolation of antimicrobial peptides from diferent plant sources: Does a general extraction method exists. *Plant Methods*, 16: 143.
23. Nurilmala M., Hizbullah H. H., Karnia E., Kusumaningtyas E. & Ochiai Y (2020). Characterization and antioxidant activity of collagen, gelatin and the derived peptides from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin. *Marine drug*, 18(2): 98.
24. Chae J. H., Kurokawa K., So Y. I., Hwang H. O., Kim M. S., Park J. W., Jo Y. H., Lee Y. S. & Lee B. L (2012). Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. *Developmental & Comparative Immunology*, 36(3): 540 - 546.
25. Wattanasiritham L., Theerakulkait C., Wickramasekara S., Maier C. S., Stevens J. F (2016). Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chem*, 192: 156 - 162.
26. Daliri E. B., Oh D. H., Lee B. H (2017). Bioactive Peptides. *Foods*, 26, 6(5): 32.
27. González-Montoya M., Hernández-Ledesma B., Silván J. M., Mora-Escobedo R., Martínez-Villaluenga C. (2018). Peptides de-rived from *in vitro* gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells prolifera-tion and inflammation. *Food Chem*, 242: 75 - 82.
28. Lim S. W., Loh H. S., Ting K. N., Bradshaw T. D., Allaudin Z. N (2015). Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells. *Trop Life Sci Res*, 26(1): 111 - 120.
29. Lin W. W., Karin M (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*, 117(5): 1175 - 1183.
30. Kofler S., Nickel T., Weis M (2005). Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond)*, 108(3): 205 - 213.
31. Võ Văn Chi (1997). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nxb Y học, Hà Nội, 135.
32. Paval J., Kaitheri., S. K., Potu B. K., Govindan S., Kumar R. S., Narayanan S. N., Moorkoth S (2009). Anti-arthritis potential of the plant *Justicia Gendarussa* Burm F, 64 (4): 357 - 362.
33. Brodkorb A., Egger L., Almingier, M., Alvito P., Assuncao R., Balance S., Bohn T., Bourlieu-Lacanal C., Boutrou R., Carriere F., *et al.* (2019) INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat. Protoc*, 14: 991 - 1014.
34. Fosgerau K. & Hoffmann T (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today*, 20(1): 122 - 128.
35. Zapata I. C., Arana-Argáez V. E., Torres-Romero J. C., Segura-Campos M. R (2019). Anti-inflammatory effects of the protein hydrolysate and peptide fractions isolated from *Salvia hispanica* L. seeds. *Food and Agricultural Immunology*, 30 (1): 786 - 803.

ISOLATION AND THE EFFECT OF PEPTIDE FRACTIONS FROM *Justicia gendarussa* Burm f.
LEAVES ON THE RELEASE OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES *IN VITRO*

Vo Hoai Bac^{1,2}, Le Thi Thu Hong^{1,2}, Trinh Tat Cuong³, Le Van Truong¹

¹ *Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

² *Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³ *Key Laboratory for Enzyme and Protein Technology, Hanoi University of Science, Hanoi, Vietnam*

Summary

Thanh tao plant (*Justicia gendarussa* Burm f.) is a medicinal plant belonging to the Acanthaceae family that it grows in many places in Vietnam and is used in folk medicine to treat a number of diseases such as: bone pain, arthritis, cough relief, fever reduction, acne... In recent years, the use of bioactive natural peptides from herbs to treat chronic diseases and improve human health has been increasing. In this study, natural peptides and hydrolyzed peptides from proteins of thanh tao plant (TT) were isolated and evaluated for their effects on the release of inflammatory cytokines *in vitro*. Natural peptide fractions and hydrolyzed peptides from protein of TT leaves were isolated using Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore) with different molecular weight cut-offs ($\leq 30\text{kDa}$, $\leq 10\text{kDa}$ and $\leq 5\text{kDa}$). The purity and molecular weight of peptides were determined by Tricine-SDS-PAGE gel electrophoresis. The results showed that the leaves of the TT were extracted with cold distilled water to obtain the natural peptide with molecular weight (14 kDa). Protein from the TT leaves was hydrolyzed by pepsin and pancreatin for 1 hour to obtain a peptide fraction $\leq 10\text{ kDa}$. The effects of peptide fractions on inflammatory cytokines were evaluated on LPS-induced macrophages. The release of inflammatory cytokines was determined by ELISA method. The natural TT peptide fractions and hydrolyzed TT peptide fractions obtained at concentrations (10 - 40 $\mu\text{g/mL}$) had no effect on macrophages. The hydrolyzed TT peptide fraction $\leq 10\text{ kDa}$ at a concentration of 10 - 40 $\mu\text{g/mL}$ higher inhibit the release of TNF- α , IL-6 and IL-8 than the natural TT peptide fraction *in vitro*. This is the initial basis to demonstrate the folk anti-inflammatory effect of this medicinal plant leaf.

Keywords: *Justicia gendarussa*, Thanh tao, anti-inflammatory, cytokine, peptide.

Ngày nhận bài: 2/7/2024

Ngày chuyển phản biện: 19/8/2024

Ngày thông qua phản biện: 9/10/2024

Ngày duyệt đăng: 6/1/2025