

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG *IN VITRO* CỦA NANO BERBERINE LÊN MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA NGUYÊN BÀO SỢI NƯỚC NGƯỜI

Trần Văn Vui^{1*}, Nguyễn Quang Tâm²

1. Đại học Y Dược Cần Thơ

2. Bệnh viện Răng Hàm Mặt thành phố Hồ Chí Minh

*Email: vuidentist@gmail.com

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Berberine (BBr) là một alkaloid thuộc nhóm isoquinoline, được sử dụng trong y học cổ truyền để trị các bệnh đường ruột, gan mật, ngoài da... Gần đây, BBr được đưa vào các sản phẩm chăm sóc răng miệng nhằm thúc đẩy quá trình lành thương. Nguyên bào sợi nước người (NBSNN) là thành phần chính của mô nước, đóng vai trò chính trong lành thương nước. **Mục tiêu nghiên cứu:** Đánh giá ảnh hưởng *in vitro* của Nano BBr lên một số đặc tính sinh học (tăng sinh, di cư) của NBSNN. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nano Berberine 2% được pha loãng 1, 1/10, 1/10², 1/10³, 1/10⁴ để cho vào các đĩa nuôi NBSNN ở thể hệ P3 (nuôi cấy đến lần chuyển thứ 3) nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12 có chứa 10% FBS đã được ủ qua 24 giờ. Dùng phương pháp MTT để thử nghiệm độc tính của Nano BBr từ đó xác định nồng độ không gây độc cho tế bào. Sử dụng Nano BBr với nồng độ được chứng minh là không gây độc tính để đánh giá các đặc tính sinh học của NBSNN (tăng sinh, di cư và co collagen). Nuôi cấy tế bào và các thử nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm kỹ nghệ mô và vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. **Kết quả:** Với nồng độ pha loãng 1/10³ và 1/10⁴ NBSNN sống sót trên 70%, và cũng với nồng độ Nano BBr 1/10⁴ đã có sự tăng sinh và di cư của NBSNN. **Kết luận:** Nano BBr 2% được pha loãng 1/10⁴ có ảnh hưởng lên đặc tính sinh học của NBSNN và xu hướng tăng sinh liên tục môi trường CM10.

Từ khóa: Nano Berberine, nguyên bào sợi nước, đặc tính sinh học.

ABSTRACT

EVALUATION THE *IN VITRO* EFFECT OF
NANO BERBERINE ON SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF
HUMAN GINGIVAL FIBROBLATSTran Van Vui^{1*}, Nguyen Quang Tam²

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

2. Odonto Maxillo Facial Hospital of Ho Chi Minh City

Background: Berberine (BBr) is an alkaloid belonging to the isoquinoline group, which has been widely used in traditional medicine, often used to treat intestinal diseases, hepatobiliary diseases, skin diseases... Recently BBr has also been included in products. oral care products to help promote healing. Human gingival fibroblast (hGF) is a major component of gingival tissue, playing a key role in gingival healing. **Objectives:** In order to provide a scientific basis for the application of BBr in the healing of gingival-oral tissues, we carried out a research survey with the aim of evaluating the *in vitro* effects of Nano BBr on some biological properties (proliferation, migration) of hGF. **Materials and methods:** P3 generation human NBSN cells (cultured to the third pass) cultured in DMEM/F12 medium containing 10% FBS were used to evaluate the cytotoxicity of Nano Berberine on cell survival. Nano Berberine 2% was diluted 1, 1/10, 1/102, 1/103, 1/104 to the hGF culture plates that had been incubated for 24h. Using MTT method to test the toxicity of Nano BBr at original concentrations and diluting on hGF to determine the concentration that is not cytotoxic. Use Nano BBr at a proven non-toxic concentration to evaluate the biological properties of hGF (proliferation, migration and collagen contraction) in cultures containing Nano BBr. Cell culture and tests were carried out at the Laboratory of Biomedical Materials and Tissue Engineering, University of Natural Sciences, Viet Nam National University, Ho Chi Minh City. **Results:** With a dilution of 1/103 and 1/104 of hGF over 70%, and also with a concentration of Nano BBr 1/104, the following experiments were performed, there was proliferation and migration of hGF. **Conclusions:** Nano BBr 2% diluted 1/104 has a positive effect on the biological properties of hGF.

Keywords: Nano Berberine, human gingival fibroblasts, biological properties.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Berberin (BBr) là một alkaloid thuộc nhóm isoquinoline gần đây có được sự chú ý trong những năm gần đây do có tác dụng dược lý như chống ung thư, kháng virus, kháng khuẩn và kháng viêm. Berberine cũng có thể được đưa vào ứng dụng trong các sản phẩm chăm sóc răng miệng hỗ trợ và thay thế dần cho kháng sinh, sử dụng trong các trường hợp vết thương hở [2], [7]. Berberine cũng đã được sử dụng trong Y học Trung Quốc để phòng ngừa và điều trị các bệnh răng miệng. Berberine được chứng minh có tác dụng tăng sinh nguyên bào sợi có nguồn gốc từ dây chằng nha chu ở người (tế bào hPDL) [1].

Nguyên bào sợi là kiểu tế bào đặc biệt nhất trong mô liên kết loại tế bào thường gặp nhất trong các mô liên kết, có nguồn gốc từ những tế bào trung mô trong phôi thai và những tế bào nguyên bào sợi phân chia trong cơ thể trưởng thành [4]. Collagen là thành phần chính của nước và nguyên bào sợi là tế bào sản xuất collagen chính trong nước [6]

Với xu hướng phát triển của nha khoa thẩm mỹ và nha khoa phục hình trong thời gian gần đây, một số tổn thương tại vùng răng miệng gây nên do vật thể lạ như: trụ cây ghép, vật thể dùng trong chỉnh hình nha... Với mục tiêu: Đánh giá ảnh hưởng của Nano Berberine lên sự tăng sinh và di cư của nguyên bào sợi nước người.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tế bào nguyên bào sợi nướu người (hGF) ở thể hệ P3 (tế bào nuôi cấy đến lần chuyển thứ 3). Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm kỹ nghệ mô và vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. Từ tháng 6/2021- 12/2021.

- **Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu thử nghiệm *in vitro*.

- **Cỡ mẫu:** Nghiên cứu thăm dò, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

- **Chọn mẫu:** Nguyên bào sợi nướu người hGF được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm kỹ nghệ mô và vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nguyên bào sợi nướu người hGF được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm kỹ nghệ mô và vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

Tế bào sau khi được giải đông sẽ được huyền phù trong môi trường dinh dưỡng DMEM/F12 bổ sung 10% FBS và trải vào các flask (bình nuôi cấy). Đặt các flask trong tủ nuôi ở điều kiện 37⁰C, 5% CO₂. Môi trường được thay mỗi 3 ngày. Tiến hành cấy chuyển khi đạt số lượng tế bào đạt 70- 80% diện tích bề mặt nuôi.

- **Phân tích và xử lý số liệu nghiên cứu:** Sử dụng phần mềm GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, CA, USA) cho phân tích thống kê. Sử dụng kiểm định t-test cho việc phân tích giữa các nhóm thí nghiệm khác nhau, với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tác động của BBr lên sự tăng sinh

Bảng 1. Đánh giá tác động của Berberine lên sự tăng sinh

	Đĩa	CM10	B-CM	B-F12	F12
Ngày 5	Đĩa 1	2250 ± 1044	800 ± 442	1000 ± 452	650 ± 310
	Đĩa 2	1225 ± 580	200 ± 155	175 ± 113	200 ± 155
	Đĩa 3	1925 ± 548	850 ± 363	125 ± 175	350 ± 122
Ngày 7	Đĩa 1	4000 ± 499	1425 ± 325	525 ± 325	450 ± 329
	Đĩa 2	2300 ± 295	325 ± 113	125 ± 61	100 ± 77
	Đĩa 3	2100 ± 972	400 ± 279	50 ± 77	150 ± 134
Ngày 9	Đĩa 1	3750 ± 1196	1075 ± 258	325 ± 240	175 ± 175
	Đĩa 2	1275 ± 575	50 ± 77	200 ± 155	125 ± 175
	Đĩa 3	4200 ± 999	400 ± 324	50 ± 122	200 ± 77

Kết quả trình bày Trung bình ± Độ lệch chuẩn.

Nhận xét: Thí nghiệm được thực hiện trên 4 môi trường gồm CM10, B-CM, B-F12, F12. Mỗi môi trường được đánh giá trên 3 đĩa, mỗi đĩa 6 giếng với lượng tế bào ban đầu tại ngày 0 là 1000. Trung bình và độ lệch chuẩn của các đĩa tương ứng được mô tả ở bảng dưới.

Bảng 2. Tăng sinh tế bào của các mẫu nghiên cứu tại các thời điểm

Ngày	Mẫu	Tế bào TB ± DLC	p1	p2			
				CM10	B-CM	B-F12	F12
Ngày 5	CM10	1800,0 ± 837,5	<0,001	1			

TẠP CHÍ Y DƯỢC HỌC CẦN THƠ – SỐ 51/2022

Ngày	Mẫu	Tế bào TB ± ĐLC	p1	p2			
				CM10	B-CM	B-F12	F12
	B-CM	616,7 ± 442,3	0,033	<0,001	1		
	B-F12	433,3 ± 493,2	0,002	<0,001	0,267	1	
	F12	400,0 ± 277,1	0,001	<0,001	0,282	0,840	1
Ngày 7	CM10	2800,0 ± 1070,6	<0,001	1			
	B-CM	716,7 ± 569,6	0,115	<0,001	1		
	B-F12	233,3 ± 282,8	<0,001	<0,001	0,003	1	
	F12	233,3 ± 253,2	<0,001	<0,001	0,016	1,000	1
Ngày 9	CM10	3075,0 ± 1600,9	<0,001	1			
	B-CM	508,3 ± 493,9	0,006	<0,001	1		
	B-F12	191,7 ± 204,5	<0,001	<0,001	0,055	1	
	F12	166,7 ± 144,5	<0,001	<0,001	0,090	0,880	1

p1 Kiểm định so sánh nội bộ nhóm tại mỗi thời điểm với ngày 0.

p2 Kiểm định so sánh giữa các nhóm tại cùng thời điểm.

Nhận xét: Qua 3 ngày thực hiện nghiên cứu, kết quả cho thấy môi trường CM10 có xu hướng tăng sinh liên tục, môi trường B-F12 và F12 có xu hướng giảm lượng tế bào. Lượng tế bào ở môi trường B-F12 và F12 thấp hơn đáng kể so với B-CM.

3.2. Tác động của BBr lên sự di cư của HGF

Bảng 3. Nghiệm thức đánh giá tác động của Berberine lên sự di cư HGF

Giếng	Nghiệm thức					
	Âm		Dương		Thí nghiệm	
	0 giờ	24 giờ	0 giờ	24 giờ	0 giờ	24 giờ
Giếng 1	585170	395660	658870	217560	636266	236468
Giếng 2	611249	360043	622294	182901	643787	317229
Giếng 3	620658	400388	702345	169881	678041	278700
Giếng 4	617064	413073	685439	205199	573093	143420
Giếng 5	642731	436337	672342	209280	599040	135923
Giếng 6	649462	442988	688650	191585	619482	205259
Giếng 7	478730	221455	521989	179944	619326	315895
Giếng 8	521045	279448	531878	131181	622787	277009
Giếng 9	492758	229420	582556	145293	582712	231837

Nghiệm thức âm: D MEMF12, Nghiệm thức dương: CM10, Nghiệm thức thí nghiệm: BBr

Nhận xét: Đánh giá tác động của Berberine lên sự di cư HGF được thực hiện dựa trên đối sánh 3 nghiệm thức âm, dương, và nghiệm thức thí nghiệm. Mỗi nghiệm thức được thực hiện trên 9 giếng. Kết quả đánh giá được thực hiện tại thời điểm 0 giờ và 24 giờ.

Bảng 4. Kích thước ảnh thí nghiệm tại các thời điểm

Thời gian	Nghiệm thức	Kích thước hình ảnh TB ± ĐLC	p
0 giờ	Âm	579874 ± 65319	0,191
	Dương	629596 ± 68899	0,618
	Thí nghiệm	619392 ± 32083	1*
24 giờ	Âm	353201 ± 87144	0,001
	Dương	181424 ± 28978	0,006
	Thí nghiệm	237971 ± 67082	1*

Nhận xét: Tại thời điểm 24 giờ, nghiệm thức dương cho thấy phần kích thước ảnh thí nghiệm còn lại thấp nhất và nghiệm thức âm cao nhất. Nghiệm thức âm và dương đều có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với nghiệm thức thí nghiệm.

Bảng 5. Thay đổi kích thước ảnh thí nghiệm tại 24 giờ so với 0 giờ

Nghiệm thức	Thay đổi kích thước hình ảnh TB (KTC 95%)	p1	p2
Âm	-226672 (-257785 – -195561)	<0,001	<0,001
Dương	-448171 (-448171 – -417059)	<0,001	<0,001
Thí nghiệm	- 381422 (-412534 – -350310)	<0,001	1*

p1 So sánh sự thay đổi với ngưỡng tham chiếu bằng 0.

p2 So sánh sự thay đổi kích thước giữa các nghiệm thức.

*Nghiệm thức thí nghiệm là nhóm tham chiếu.

Nhận xét: Ghi nhận xu hướng di cư, giảm đáng kể kích thước trên hình ảnh thí nghiệm với tất cả giá trị p so sánh thời điểm 24 với 0 đều đạt $p < 0,05$. Nghiệm thức dương có mức di cư mạnh nhất, kế đến là nghiệm thức thí nghiệm và nghiệm thức âm là kém nhất.

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng in vitro của nano berberine lên một số đặc tính sinh học của nguyên bào sợi nướu người cho thấy:

4.1. Tác động của BBr lên sự tăng sinh

Thí nghiệm đánh giá tác động của BBr lên sự tăng sinh được thực hiện trên 4 môi trường gồm CM10, B-CM, B-F12, F12. Mỗi môi trường được đánh giá trên 3 đĩa, mỗi đĩa 6 giếng với lượng tế bào ban đầu tại ngày 0 là 1000. Trung bình và độ lệch chuẩn của các đĩa tương ứng được mô tả ở bảng dưới. Tại ngày 5, môi trường CM10 tiếp tục cho thấy xu hướng tăng sinh. Các môi trường B-F12 và F12 tiếp tục xu hướng giảm lượng tế bào. Môi trường B-CM đã bắt đầu giảm lượng tế bào có ý nghĩa thống kê so với ngày 0. Các môi trường B-CM, B-F12 và F12 không có sự khác biệt đáng kể về lượng tế bào tại ngày 5. Tại ngày 7, môi trường CM10 tiếp tục xu hướng tăng sinh tế bào. Môi trường B-F12 và F12 tiếp tục xu hướng giảm lượng tế bào. Môi trường B-CM không ghi nhận mức giảm đáng kể so với ngày 0. Lượng tế bào ở môi trường B-F12 và F12 thấp hơn đáng kể so với B-CM. Tại ngày 9, môi trường CM10 tiếp tục xu hướng tăng sinh tế bào. Môi trường B-CM, B-F12, F12 tiếp tục xu hướng giảm lượng tế bào so với ngày 0 có ý nghĩa thống kê. Số lượng tế bào giữa các môi trường này không khác biệt thống kê.

Kết quả cho thấy xu hướng tăng sinh liên tục của môi trường CM10 từ ngày 1 đến ngày 9. Các môi trường còn lại có xu hướng giảm số lượng tế bào theo thời gian.

Nghiên cứu thu được kết quả tương tự kết quả nghiên cứu của N. Ivanovska và cộng sự cho thấy sự tăng sinh của tế bào dưới ảnh hưởng của BBr sau 14 ngày [5].

4.2. Tác động của BBr lên sự di cư của HGF

Sự di chuyển của tế bào là quá trình cần thiết cho hoạt động sinh lý, bệnh lý chẳng hạn như hình thành và phát triển khối u, sửa chữa mô, hình thành mạch máu cũng như chữa lành vết thương của cơ thể [1]. Khi mô bị tổn thương, nguyên bào sợi lập tức di chuyển vào vùng sang thương và tiết ra chất nền ngoại bào cần thiết để chữa lành vết thương [3]. Đánh giá tác động của Berberine lên sự di cư HGF được thực hiện dựa trên đối sánh 3 nghiệm thức

âm, dương, và nghiệm thức thí nghiệm. Mỗi nghiệm thức được thực hiện trên 9 giếng. Kết quả đánh giá được thực hiện tại thời điểm 0 giờ và 24 giờ. Không ghi nhận sự khác biệt về kích thước hình ảnh đánh giá di cư tại thời điểm 0 giờ. Tại thời điểm 24 giờ, nghiệm thức dương cho thấy phần kích thước ảnh thí nghiệm còn lại thấp nhất và nghiệm thức âm cao nhất. Nghiệm thức âm và dương đều có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với nghiệm thức thí nghiệm. Nghiệm thức dương có mức di cư mạnh nhất, kế đến là nghiệm thức thí nghiệm và di cư kém nhất là nghiệm thức âm. Mức di cư có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đưa ra kết quả cho thấy có sự tăng sinh liên tục của môi trường CM10 từ ngày 1 đến ngày 9. Nghiệm thức dương có mức di cư mạnh nhất, kế đến là nghiệm thức thí nghiệm và di cư kém nhất là nghiệm thức âm. Mức di cư có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aggarwal B.B, S.C. Gupta, B. Sung (2013) “Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers”, *Br J Pharmacol*, 169(8), 1672-1692.
2. Amin A, T Subbaiah, K Abbasi (1969), “Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action”, *Canadian journal of microbiology*, 15(9), 1067-1076.
3. M. Chiquet, C. Katsaros, D. Kletsas (2015), “Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair”, *Periodontol 2000*, 68(1), 21-40.
4. Fernandes I.R, *et al.* (2016) “Fibroblast sources: Where can we get them?”. *Cytotechnology*, 68 (2), 223-228.
5. Ivanovska N, S Philipov, M Hristova (1999), “Immunopharmacol Immunotoxicol”, 21(4), 771-786.
6. Moscato S, *et al.* (2008), “Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine sponges”, *Micron*, 39(5), 569-579.
7. Mirhadi E, M. Rezaee, B. Malaekheh-Nikouei (2018), “Biomedicine & Pharmacotherapy”, *Nano strategies for berberine delivery, a natural alkaloid of Berberis*, 104, 465-473.

(Ngày nhận bài: 22/7/2022 – Ngày duyệt đăng: 09/9/2022)
