

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CỦA CAO SÂM VIỆT NAM (*PANAX VIETNAMENSIS*) ĐỐI VỚI TẾ BÀO CƠ TIM H9C2 TRONG MÔ HÌNH THIẾU OXY-TÁI CUNG CẤP OXY *IN VITRO*

Vũ Thị Thu^{1*}, Ngô Thị Hải Yến¹, Phạm Thị Bích¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*, SVN) hay Sâm Ngọc Linh là dược liệu quý được sử dụng phổ biến ở Việt Nam. Tuy nhiên, tác dụng của SVN đối với tế bào cơ tim trong tổn thương thiếu máu-tái tưới máu vẫn chưa được làm sáng tỏ. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào cơ tim H9C2 của cao SVN trong tổn thương thiếu máu-tái tưới máu sử dụng mô hình thiếu oxy-tái cung cấp oxy (hypoxia/reoxygenation, HR) *in vitro* được gây bởi CoCl_2 . **Phương pháp:** Tế bào H9C2 được nuôi trong điều kiện thường (đối chứng) và điều kiện HR. Khả năng sống, thành phần cardiolipin và điện thế màng ty thể của tế bào H9C2 ở các nhóm mẫu thí nghiệm được phân tích bằng các kit phù hợp. **Kết quả:** Kết quả thu được cho thấy, bổ sung cao SVN ($10\div 500 \mu\text{g/ml}$) làm tăng đáng kể tỷ lệ sống của tế bào H9C2 trong điều kiện HR. Đặc biệt, cao SVN có hiệu quả bảo toàn chức năng ty thể cao nhất ở nồng độ $31,25 \mu\text{g/ml}$. Trong điều kiện HR, hàm lượng cardiolipin và giá trị điện thế màng ty thể của tế bào H9C2 giảm mạnh, chỉ còn khoảng $59,78\pm 1,15\%$ và $67,40\pm 1,54\%$ so với nhóm đối chứng (100%); khi bổ sung cao SVN, các thông số ty thể kể trên tăng có ý nghĩa thống kê với các giá trị tương ứng là $77,67\pm 2,29\%$ và $84,52\pm 4,14\%$ ($p<0,05$). **Kết luận:** Kết quả thu được là dẫn liệu bước đầu về tác dụng của SVN trong việc bảo vệ tế bào cơ tim hướng đích ty thể chống lại tổn thương HR.

Từ khóa: H9C2, Sâm Việt Nam, cardiolipin, ty thể, CoCl_2 .

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tổn thương thiếu oxy-tái cung cấp oxy (hypoxia-reoxygenation, HR), là hiện tượng tổn thương mô cơ tim gây ra bởi sự tái thông dòng máu đến mô cơ tim sau một thời gian vùng mô này bị thiếu máu hoặc ngừng cung cấp máu [6]. Nhiều nghiên

cứu đã chỉ ra rằng ty thể đóng vai trò quan trọng trong sinh lý bệnh HR [10]. Do vậy, sự bảo toàn chức năng ty thể là cần thiết để hạn chế những tổn thương cho tế bào cơ tim, qua đó hạn chế tiến triển bệnh. Trong thập niên gần đây, việc sàng lọc và tìm ra các hoạt chất thiên nhiên có tác dụng bảo vệ cơ tim hướng đích ty thể đã đạt được những thành tựu đáng kể, tuy nhiên, các nghiên cứu vẫn cần tiếp tục được mở rộng nhằm tìm ra các hoạt chất tiềm năng mới cũng như tối ưu hóa điều kiện sử dụng các thuốc có sẵn.

Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*, SVN) hay còn gọi là Sâm Ngọc Linh là một

¹ Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

* Tác giả thực hiện

Và chịu trách nhiệm chính:

Vũ Thị Thu

Email: vtthu2015@gmail.com

Ngày tiếp nhận: 19/10/2020

Ngày phản biện: 20/10/2020

Ngày chấp nhận đăng: 25/3/2021

được liệu quý với nhiều công dụng như tăng cường sức khỏe, giảm căng thẳng, chống viêm, chống ung thư [12]... Mặc dù được sử dụng phổ biến ở Việt Nam nhưng tới thời điểm hiện tại, cơ sở khoa học liên quan đến tác dụng của SVN trong bệnh tim mạch nói chung và trong tổn thương HR nói riêng còn chưa được làm rõ. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành với mục đích khảo sát ảnh hưởng của cao SVN trong mô hình bệnh lý HR *in vitro* được gây bởi Cobalt chlorit (CoCl_2) trên tế bào cơ tim chuột H9C2.

CoCl_2 là tác nhân có khả năng mô phỏng điều kiện thiếu oxy. Khi vào trong tế bào, Co^{2+} làm bất hoạt enzym hydroxylase làm HIF-1 α bền vững giúp tế bào phản ứng với tình trạng thiếu oxy [4]. Mặt khác, CoCl_2 còn làm tăng quá trình sản sinh gốc tự do oxy hóa, giảm điện thế màng ty thể và kích thích sự chết theo chương trình của tế bào [7]. Do vậy, CoCl_2 được sử dụng khá phổ biến để mô phỏng bệnh lý HR *in vitro*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng quy trình gây tổn thương HR bằng CoCl_2 đã được thiết lập trước đây [1] để đánh giá ảnh hưởng của SVN thông qua phân tích tỷ lệ sống, cấu trúc và chức năng ty thể tế bào H9C2.

Kết quả thu được cho thấy, cao SVN có tác dụng bảo vệ tế bào H9C2 chống lại tổn thương HR và có độc tính yếu đối với tế bào cơ tim ($\text{IC}_{50} = 1059,84 \mu\text{g/ml}$). Tác dụng bảo vệ tế bào cơ tim chống lại tổn thương HR thể hiện rõ ở dải nồng độ $10\div 500 \mu\text{g/ml}$. Trong đó, ở nồng độ $31,25 \mu\text{g/ml}$, cao SVN thể hiện hiệu quả bảo vệ tế bào cơ tim và chức năng ty thể cao nhất thông qua việc làm giảm tỷ lệ tế bào chết, giảm sự bất thường cấu trúc và chức năng ty thể gây ra do HR. Kết quả thu được là dẫn liệu bước đầu về tác dụng của SVN

trong việc bảo vệ tế bào cơ tim hướng đích ty thể chống lại tổn thương HR.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Dòng tế bào cơ tim phôi chuột H9C2 (hãng ATCC®, Mỹ) được tặng bởi Trung tâm nghiên cứu bệnh chuyển hóa tim mạch, Trường Đại học Inje, Hàn Quốc (CMDU, Inje, Hàn Quốc). Cao SVN được cung cấp bởi PGS.TS. Nguyễn Hữu Tùng, Trường Đại học Phenikaa, Việt Nam.

2.2. Hóa chất, thiết bị

Môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Mỹ); phosphate buffered saline (PBS, Gibco, Mỹ); huyết thanh phôi bê (fetal bovine serum, FBS, Gibco, Mỹ); Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Nhật Bản); chất nhuộm chỉ thị cardiolipin màng ty thể 10-N-nonyl acridine orange (NAO, Invitrogen, Mỹ); chất chỉ thị điện thế màng ty thể Tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE, Invitrogen, Mỹ); penicillin-streptomycin (PS, Gibco, Mỹ); dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, Mỹ); đĩa nuôi cấy $60\times 15\text{mm}$, $90\times 20\text{mm}$, đĩa 96 giếng trong (SPL-Life Sciences, Hàn Quốc); đĩa 96 giếng đen (Corning, Mỹ); tủ ấm CO_2 ; kính hiển vi soi ngược Axiovert (Carl Zeiss, Đức); kính hiển vi Apotome 2 (Carl Zeiss, Đức); máy đọc đĩa 96 giếng SpectraMax plus 384 (Molecular devices, Mỹ) và các thiết bị vật tư tiêu hao khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

* Nuôi cấy tế bào cơ tim chuột H9C2

Tế bào cơ tim chuột H9C2 được nuôi cấy trong môi trường DMEM 4,5 g/l glucose có bổ sung 10% FBS và 1% PS ở điều kiện 37°C và 5% CO_2 . Môi trường nuôi được thay sau 2-3 ngày và tế bào

được cấy chuyển khi mật độ che phủ đĩa nuôi đạt 80%.

*** Gây mô hình thiếu oxy-tái cung cấp oxy và thử tác dụng của cao SVN**

Mô hình thiếu oxy-tái cung cấp oxy (HR) được tạo ra bằng cách sử dụng CoCl_2 như đã được mô tả trong công bố trước đây của nhóm nghiên cứu [1]. Cao SVN được hòa tan trong DMSO 0.1% và được pha trong môi trường nuôi thành các nồng độ khác nhau. Tế bào H9C2 được nuôi trong đĩa 96 giếng với mật độ 5×10^3 tế bào/giếng. Sau 24 giờ nuôi cấy, tế bào được chia thành nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm mô hình như sau:

1) Nhóm đối chứng là nhóm tế bào tiếp tục được nuôi trong điều kiện thường (DMEM, 10% FBS, 1% PS, 37°C và 5% CO_2) trong 48 giờ;

2) Nhóm thử nghiệm là nhóm tế bào được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung CoCl_2 trong 24 giờ (mô phỏng giai đoạn thiếu oxy) ở 37°C và 5% CO_2 . Sau đó, môi trường chứa CoCl_2 được loại bỏ, tế bào tiếp tục được nuôi thêm 24 giờ trong các môi trường mới (mô phỏng giai đoạn tái cung cấp oxy) để gây mô hình HR hoặc HR+DMSO hoặc HR+SVN. Cụ thể:

+ Nhóm HR (hay HR- CoCl_2): môi trường giai đoạn tái cung cấp oxy chứa DMEM, 10% FBS, 1% PS.

+ Nhóm DMSO (hay HR- CoCl_2 +DMSO): môi trường giai đoạn tái cung cấp oxy chứa DMEM, 10% FBS, 1% PS, DMSO 0,1%.

+ Nhóm SVN (hay HR- CoCl_2 +DMSO+SVN): môi trường giai đoạn tái cung cấp oxy chứa DMEM, 10% FBS, 1% PS, DMSO 0,1%, SVN (ở dải nồng độ $10 \div 500 \mu\text{g/ml}$).

Cuối thời điểm thí nghiệm, hình ảnh tế bào được ghi lại bằng kính hiển vi soi

ngược Axiovert và kính hiển vi huỳnh quang Apotome 2. Tỷ lệ sống của tế bào được đánh giá bằng kit CCK-8. Thành phần lipid và điện thế màng ty thể được xác định gián tiếp thông qua phân tích chỉ thị huỳnh quang NAO và TMRE. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần.

*** Đánh giá khả năng sống của tế bào bằng kit CCK-8**

Khả năng sống của tế bào được xác định thông qua CCK-8 như mô tả trong nghiên cứu trước đây [11]. Tế bào được nuôi trên đĩa 96 giếng thành trong với mật độ $5 \cdot 10^3$ tế bào/giếng ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Tại cuối thời điểm mỗi thí nghiệm, mẫu tế bào được ủ với CCK-8 ở 37°C , 5% CO_2 trong thời gian 2 giờ. Tiếp đó, mẫu phân tích được đo bằng máy đọc đĩa 96 giếng ở bước sóng hấp thụ 450 nm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần.

*** Đánh giá thành phần cardiolipin và điện thế màng trong ty thể**

Thành phần cardiolipin và điện thế màng trong ty thể được đo gián tiếp bằng kit huỳnh quang NAO và TMRE như mô tả trong nghiên cứu của Thu VT et al [11]. Tế bào H9C2 được nuôi cấy trên đĩa 96 giếng thành đen, đáy kính trong với mật độ $5 \cdot 10^3$ tế bào/giếng ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Sau bước gây mô hình HR và thử tác dụng của cao SVN, tế bào được nhuộm NAO ($0,1 \mu\text{M}$, ex/em: 495/519 nm) và TMRE ($1 \mu\text{M}$, ex/em: 549/575 nm) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng và được rửa 2-3 lần bằng PBS. Hình ảnh huỳnh quang và mật độ huỳnh quang NAO, TMRE được ghi lại bằng kính hiển vi Apotome 2 và được phân tích bằng phần mềm Zen Blue 2.5. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần.

2.4. Xử lý số liệu

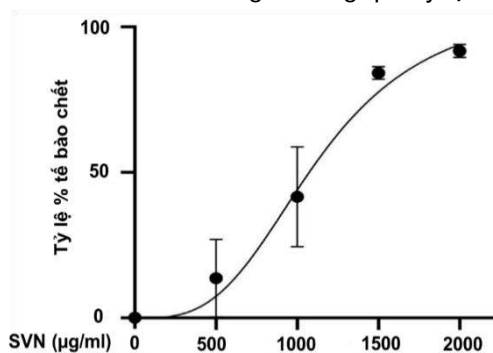
Phần mềm Excel 2016 và Origin 8.5 được sử dụng để xử lý thống kê. Số liệu

được trình bày dưới dạng $X \pm SD$ (X: giá trị trung bình, SD: độ lệch chuẩn). Sự khác biệt được giữa các nhóm được phân tích bằng Anova và t-test. Giá trị p theo hai phía $< 0,05$ phản ánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

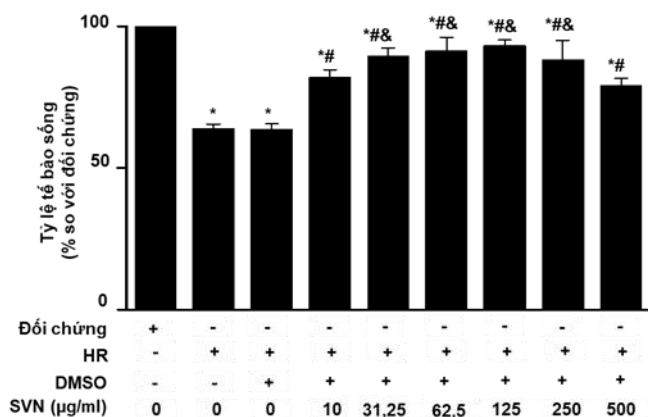
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Cao SVN thể hiện độc tính yếu đối với dòng tế bào H9C2

Tế bào H9C2 được nuôi trong điều kiện thường có bổ sung cao SVN ở dải nồng độ $10 \div 2000 \mu\text{g/ml}$ trong 48 giờ. Cuối thời điểm thí nghiệm, ảnh hưởng hay độc tính của cao SVN lên tế bào H9C2 được đánh giá thông qua tỷ lệ sống/chết của tế bào.



Hình 1. Ảnh hưởng của cao SVN đối với khả năng sống của tế bào H9C2



Hình 2. Ảnh hưởng của cao SVN lên khả năng sống của tế bào H9C2 trong điều kiện HR- CoCl_2

Đối chứng: nhóm tế bào được nuôi trong điều kiện thường; *HR:* tế bào được nuôi trong điều kiện HR gây bởi CoCl_2 $300 \mu\text{M}$; *DMSO:* tế bào được nuôi trong điều kiện HR- CoCl_2 có bổ sung DMSO $0,1\%$; *SVN:* tế bào được nuôi trong điều kiện HR- CoCl_2 có bổ sung cao SVN ở các nồng độ $10 \div 500 \mu\text{g/ml}$; *: sự khác biệt so với đối chứng; #: sự khác biệt so với nhóm HR- CoCl_2 +DMSO; &: sự khác biệt so với nhóm SVN $10 \mu\text{g/ml}$ và $500 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$).

Kết quả cho thấy cao SVN thể hiện độc tính yếu trên tế bào H9C2 với $\text{IC}_{50} = 1059,84 \mu\text{g/ml}$ (Hình 1). Trên cơ sở dữ liệu này, nhóm nghiên cứu lựa chọn dải nồng

độ 10÷500 µg/ml để tiếp tục khảo sát tác dụng của cao SVN lên khả năng sống của tế bào H9C2 trong mô hình HR-CoCl₂.

3.2. Cao SVN làm tăng tỷ lệ sống của tế bào H9C2 trong mô hình HR-CoCl₂

Tác động của cao SVN ở các nồng độ khác nhau đối với tế bào H9C2 trong mô hình HR-CoCl₂ được đánh giá thông qua xác định tỷ lệ sống của tế bào bằng kit CCK-8. Kết quả trên Hình 2 cho thấy, tỷ lệ tế bào H9C2 sống trong điều kiện HR được xử lý bằng CoCl₂ 300 µM giảm đáng kể ($63,96 \pm 3,49\%$) là tương đương trong điều kiện DMSO ($63,17 \pm 2,78\%$). Điều này thể hiện mô hình thiếu oxy-tái cung cấp oxy sử dụng CoCl₂ 300 µM hoạt động khá tốt và sự có mặt của DMSO 0.1% không gây ảnh hưởng tới mô hình. Do vậy DMSO 0,1% tiếp tục được sử dụng làm đối chứng âm trong các thí nghiệm tiếp theo.

Hơn nữa, kết quả ở Hình 2 còn chỉ ra rằng tỷ lệ sống của nhóm tế bào trong mô hình HR-CoCl₂ có bổ sung cao SVN ở dải nồng độ 10÷500 µg/ml tăng lên đáng kể so với nhóm tế bào DMSO ($p < 0.05$). Đặc biệt, tỷ lệ tế bào sống tăng mạnh ở nhóm có SVN với các nồng độ 31,25; 62,5, 125 và 250 µg/ml với giá trị % lần lượt là $89,5 \pm 2,84\%$, $91,32 \pm 4,81\%$, $93,09 \pm 1,99\%$ và $88,25 \pm 6,76\%$. Điều này chứng tỏ cao SVN ở dải nồng độ 10÷500 µg/ml có khả năng bảo vệ tế bào cơ tim H9C2 trước tổn thương HR-CoCl₂. Kết quả này khá tương đồng với các nghiên cứu trên một số loài thuộc họ Sâm như *Korea red ginseng* [9], *Panax Japonicus* [5].... Dịch chiết của các thảo dược kể trên có tác dụng bảo vệ tế bào cơ tim thể hiện ở việc làm giảm kích thước vùng nhồi máu, cải thiện chức năng tim nhờ khả năng chống oxy hóa, chống viêm [5, 9]. Vì vậy, khả năng bảo vệ tế bào H9C2 của cao SVN có thể được giải thích

là do trong dịch chiết chứa một số hợp chất chống oxy hóa, chống viêm [2].... Tuy nhiên, các nghiên cứu về SVN và saponin của thảo dược này trên bệnh lý HR tại Việt Nam cũng như thế giới còn chưa nhiều. Do đó, các nghiên cứu sâu hơn là cần thiết nhằm tìm ra các tác dụng của SVN trong bệnh lý tim mạch.

Mặt khác, dữ liệu thu được cũng cho thấy tỷ lệ sống của tế bào H9C2 trong mô hình HR-CoCl₂ có bổ sung cao SVN ở các nồng độ 31,25, 62,5, 125 và 250 µg/ml không có sự khác biệt đáng kể ($p > 0,05$). Đây là gợi ý cho việc lựa chọn cao SVN ở nồng độ 31,25 µg/ml cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm tối ưu hiệu quả sử dụng.

3.3. Cao SVN bảo vệ ty thể của tế bào H9C2 trong mô hình HR-CoCl₂

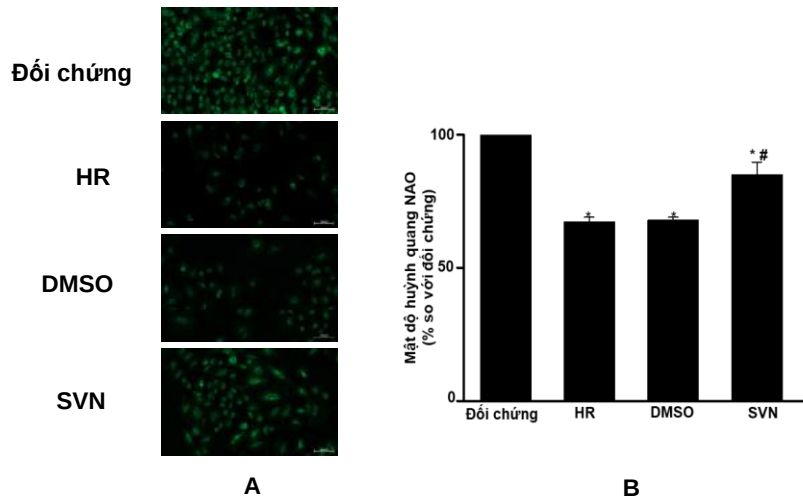
Ty thể là bào quan đóng vai trò quan trọng trong cơ chế phát sinh của bệnh lý HR [10]. Do vậy, để tìm hiểu cơ chế bảo vệ của cao SVN đối với tế bào cơ tim trong mô hình HR-CoCl₂, nhóm nghiên cứu tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của thảo dược này lên cấu trúc và chức năng ty thể của tế bào H9C2 thông qua hai chỉ số: hàm lượng cardiolipin và điện thế màng trong ty thể.

*** Cao SVN bảo vệ cấu trúc màng trong ty thể trong tổn thương HR**

Cardiolipin là phospholipid đặc trưng của màng trong ty thể có vai trò thiết yếu đối với nhiều chức năng ty thể [3]. Trong sinh lý bệnh HR, sự sản sinh quá mức gốc các gốc oxy tự do dẫn đến sự oxy hóa cardiolipin. Điều này ảnh hưởng tới hoạt động của chuỗi vận chuyển điện tử I, III, IV và qua đó làm rối loạn hoạt động chức năng ty thể và có thể gây chết tế bào [3]. Do vậy, việc duy trì ổn định cấu trúc và hàm lượng cardiolipin có vai trò quan trọng nhằm hạn chế những tổn thương ty thể và tế bào gây nên bởi điều kiện HR.

Tác dụng của cao SVN lên cấu trúc ty thể tế bào H9C2 được đánh giá thông qua sự biến đổi hàm lượng cardiolipin màng

trong ty thể. Sự thay đổi hàm lượng lipid này được xác định bằng việc đo mức độ thay đổi mật độ huỳnh quang NAO (Hình 3).



Hình 3. Mật độ cardiolipin của ty thể tế bào H9C2 trong các điều kiện khác nhau

A) Hình ảnh huỳnh quang NAO; B) Phẩm trăm mật độ huỳnh quang NAO. Màu xanh: màu huỳnh quang NAO chỉ thị cho cardiolipin màng trong ty thể; Vật kính 20X; Thước đo 100 μ m; Đối chứng: nhóm tế bào được nuôi trong điều kiện thường; HR, DMSO, SVN: các nhóm tế bào được nuôi trong điều kiện HR- CoCl_2 và được bổ sung DMEM, DMSO 0,1% hoặc SVN 31,25 μ g/ml tại thời điểm tái cung cấp oxy. *: sự khác biệt so với đối chứng; #: sự khác biệt so với HR ($p < 0,05$).

Hình 3A cho thấy các nhóm tế bào HR và DMSO có sự suy giảm đáng kể tín hiệu huỳnh quang NAO so với nhóm đối chứng, thể hiện ở màu xanh mờ dần, số lượng tế bào mang màu xanh ít hơn so với đối chứng. Bổ sung cao SVN nồng độ 31,25 μ g/ml tại thời điểm tái cung cấp oxy làm tăng tín hiệu NAO (màu xanh đậm hơn, số lượng tế bào mang màu xanh nhiều hơn) so với nhóm HR và DMSO. Tương ứng với hình ảnh huỳnh quang, sự giảm mật độ huỳnh quang NAO được thể hiện rõ trên Hình 3B. Trong đó, điều kiện HR làm giảm mật độ huỳnh quang NAO của tế bào H9C2 xuống còn 67,40 $\pm$ 1,54% (nhóm HR) và 67,93 $\pm$ 1,01% (nhóm DMSO) so với

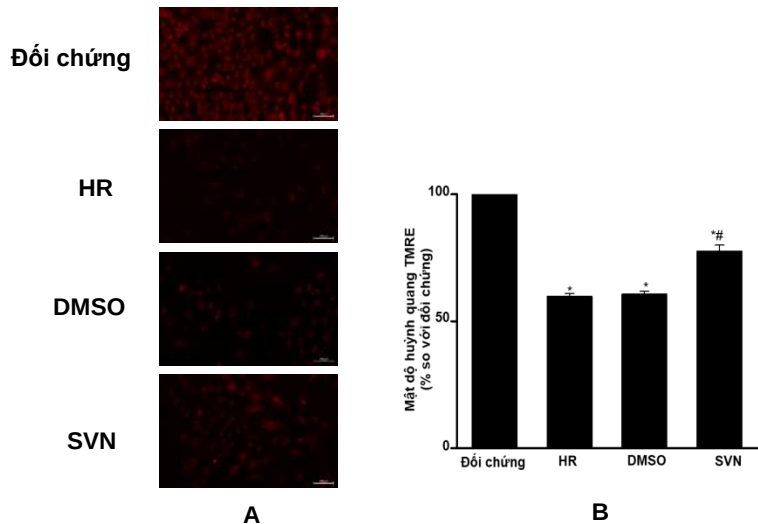
100% đối chứng. Tuy nhiên, khi bổ sung cao SVN 31,25 μ g/ml tại thời điểm tái cung cấp oxy, mật độ huỳnh quang NAO của nhóm tế bào SVN tăng lên 84,52 $\pm$ 4,14%. Điều này thể hiện cao SVN ở nồng độ 31,25 μ g/ml có khả năng bảo tồn cardiolipin màng ty thể trong tổn thương gây ra do HR, qua đó làm tăng khả năng chống stress oxy hóa và hiệu quả hoạt động của chuỗi vận chuyển điện tử [10]. Tác dụng bảo vệ cardiolipin của SVN có thể do thảo dược này chứa một số saponin có hoạt tính chống oxy hóa như Majonoside R2, Vina-ginsenoside R2 [2]. Mặc dù vậy, cơ chế tác động chính xác của cao SVN tới cardiolipin vẫn chưa

được làm sáng tỏ.

*** Cao SVN làm tăng cường chức năng ty thể trong tổn thương HR**

Điện thế màng ty thể là tham số quan trọng để đánh giá chức năng của ty thể. Sự sụt giảm điện thế màng do nhiều

nguyên nhân, có thể gây tổn thương ty thể và gây chết tế bào [13]. Trong nghiên cứu này, sự biến đổi điện thế màng ty thể tế bào H9C2 được thể hiện qua tín hiệu (màu đỏ) và mật độ huỳnh quang của TMRE (Hình 4).



Hình 4. Điện thế màng ty thể tế bào H9C2 trong các điều kiện khác nhau

A) Hình ảnh huỳnh quang TMRE. B) Phần trăm mật độ huỳnh quang TMRE. Màu đỏ: màu của TMRE, vật kính 20X, thước đo 100 μ m; ĐỐI CHỨNG: nhóm tế bào được nuôi trong điều kiện thường; HR, DMSO, SVN: các nhóm tế bào được nuôi trong điều kiện HR- CoCl_2 và được bổ sung DMEM, DMSO 0,1% hoặc SVN 31,25 μ g/ml tại thời điểm tái cung cấp oxy. *: sự khác biệt so với đối chứng; #: sự khác biệt so với HR ($p < 0,05$).

Hình ảnh huỳnh quang trên Hình 4A thể hiện sự giảm mạnh tín hiệu của TMRE (màu đỏ) ở nhóm tế bào HR và DMSO, đồng thời số lượng tế bào có màu đỏ ít hơn so với nhóm đối chứng. So với đối chứng (100%), mật độ huỳnh quang TMRE ở nhóm HR và DMSO lần lượt là $59,78 \pm 1,15\%$ và $61,16 \pm 0,56\%$ (Hình 4B). Sự sụt giảm điện thế màng có thể giải thích do trong giai đoạn tái cung cấp oxy, pH nội bào tăng trở lại kích thích mở lỗ màng trong ty thể, làm các ion ồ ạt đi vào chất nền dẫn đến sự khử cực màng [10].

Kết quả ghi nhận trong nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với các nghiên cứu sử dụng CoCl_2 gây mô hình HR đã được công bố trước đây [15].

Bên cạnh đó, kết quả được thể hiện ở Hình 4 cũng cho thấy nhóm tế bào bị gây mô hình HR được bổ sung SVN ở nồng độ 31,25 μ g/ml có tín hiệu màu đỏ cũng như mật độ huỳnh quang TMRE tăng đáng kể ($77,67 \pm 2,29\%$) so với nhóm HR- CoCl_2 ($p < 0,05$). Điều đó cho thấy, cao SVN có khả năng bảo tồn điện thế màng ty thể tế bào H9C2 chống lại tổn thương do HR.

Điện thế màng ty thể được giữ ổn định sẽ làm giảm sự rối loạn chức năng ty thể và tăng khả năng sống của tế bào [13]. Sự biến đổi điện thế màng ty thể tế bào H9C2 dưới tác dụng của SVN tương đối phù hợp với kết quả về tỷ lệ sống của tế bào và thành phần cardiolipin màng ty thể đã nêu ở trên. Tác dụng bảo toàn chức năng ty thể của cao SVN cũng khá tương đồng với tác dụng của một số tinh chất như ginsenoside Rg1 [8] và polysaccharid [14] tách từ *Panax ginseng*. Đây cũng là gợi ý cho các nghiên cứu tiếp theo về tác dụng bảo vệ ty thể tế bào cơ tim trong bệnh lý HR của SVN đặc biệt là đối với các saponin có trong loại cây này.

Như vậy, các dữ liệu thu được chứng tỏ rằng SVN với độc tính thấp, có khả năng bảo vệ tế bào cơ tim chuột H9C2 trước tổn thương HR gây bởi CoCl_2 theo con đường ty thể. Mặc dù kết quả nghiên cứu cho thấy cao SVN có tiềm năng trong việc chống lại tổn thương do HR nhưng con đường tác động cũng như thành phần tác động chính của thảo dược này vẫn cần tiếp tục được triển khai. Vì vậy, các nghiên cứu sâu hơn là cần thiết.

4. KẾT LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên cung cấp số liệu về ảnh hưởng của cao SVN lên khả năng sống, cũng như cấu trúc và chức năng ty thể của tế bào cơ tim chuột H9C2 trong mô hình HR- CoCl_2 . Kết quả cho thấy tác dụng bảo vệ của cao SVN ở dải nồng độ 10-500 $\mu\text{g/ml}$ đối với tế bào cơ tim trong mô hình bệnh lý nghiên cứu. Đặc biệt, ở nồng độ 31,25 $\mu\text{g/ml}$, cao SVN thể hiện hiệu quả bảo vệ tốt nhất đối với tế bào H9C2 trong tổn thương gây bởi CoCl_2 thông qua con đường ty thể. Kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm ra con đường tác động lên tế

bào của cao SVN cũng như tác dụng của các tinh chất được tách chiết từ loại thảo dược này.

Lời cảm ơn

Chúng tôi cảm ơn đề tài cơ sở mã số **C.2020.07** đã hỗ trợ kinh phí; Trung tâm Khoa học sự sống, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG Hà Nội đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu; chân thành cảm ơn các giáo sư Han Jin và Kim Hyoung Kyu (CMDM, Inje, Hàn Quốc) đã tặng nhóm nghiên cứu mẫu tế bào H9C2; cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Hữu Tùng, Trường Đại học Phenikaa, Việt Nam đã cung cấp nguyên liệu cao sâm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ngô Thị Hải Yến, Đoàn Thị Dịu, Phạm Thị Bích, Vũ Thị Thu (2019)**, Thiết kế và đánh giá hiệu quả buồng thiếu oxi (buồng hypoxia) ứng dụng trong mô hình bệnh thiếu máu cục bộ - tái tưới máu cơ tim in vitro, Tạp chí Sinh lý học Việt Nam, 23(3):1-8.
2. **Jeong JJ, Van Le TH, Lee SY, Eun SH, Nguyen MD, Park JH and Kim DH (2015)**, Anti-inflammatory effects of vicia-ginsenoside R2 and majonoside R2 isolated from *Panax vietnamensis* and their metabolites in lipopolysaccharide- stimulated macrophages, Int Immunopharmacol, 28(1):700-6.
3. **Dudek J (2017)**, Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways, Frontiers in Cell and Developmental Biology, 5:90.
4. **Federico F (2010)**, Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor, Proc Natl Acad Sci USA, 107(28):12722-7.

5. **He H, Xu J, Xu Y, Zhang C, Wang H, He Y, Wang T, Yuan D (2012)**, Cardioprotective effects of saponins from *Panax japonicus* on acute myocardial ischemia against oxidative stress-triggered damage and cardiac cell death in rats, *J Ethnopharmacol*, 140(1):73-82.
6. **Kalogeris T, Baines Christopher P, Krenz Maike, Korthuis Ronald J (2016)**, Ischemia/Reperfusion, *Comprehensive Physiology*, 7(1):113-170.
7. **Lan A, Liao X, Mo L, Yang C, Yang Z, Wang X, Hu F, Chen P, Feng J, Zheng D et al (2011)**, Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells, *PLoS One*, 6(10):e25921.
8. **Li Q, Xiang Y, Chen Y, Tang Y, Zhang Y (2017)**, Ginsenoside Rg1 Protects Cardiomyocytes Against Hypoxia/ Reoxygenation Injury via Activation of Nrf2/HO-1 Signaling and Inhibition of JNK, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(1):21-37.
9. **Lim KH, Ko D, Kim JH (2013)**, Cardioprotective potential of Korean Red Ginseng extract on isoproterenol-induced cardiac injury in rats, *J Ginseng Res*, 37(3): 273-82.
10. **Ramachandra CJA, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, Lin Ying-His, Hausenloy Derek J (2020)**, Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection, *EBioMedicine*, 57:102884.
11. **Thu VT, Kim HK, Long LT, Nyamaa B, In-Sung Song, To Thanh Thuy, Nguyen Quang Huy, Jubert Marquez, Soon Ha Kim et al (2016)**, NecroX-5 protects mitochondrial oxidative phosphorylation capacity and preserves PGC1alpha expression levels during hypoxia/ reoxygenation injury, *Korean J Physiol Pharmacol*, 20(2):201-11.
12. **Yamasaki K (2000)**, Bioactive saponins in vietnamese ginseng, *panax vietnamensis*, *Pharm Biol*, 38(1):16-24.
13. **Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, Babenko VA, Zorov SD, Balakireva AV, Juhaszova M et al (2018)**, Mitochondrial membrane potential, *Analytical biochemistry*, 552:50-59.
14. **Zuo YH, Han QB, Dong GT, Yue RQ, Ren XC, Liu JX, Liu L, Luo P, Zhou H (2018)**, *Panax ginseng* Polysaccharide Protected H9c2 Cardiomyocyte From Hypoxia/Reoxygenation Injury Through Regulating Mitochondrial Metabolism and RISK Pathway, *Front Physiol*, 9:699.
15. **Niu N, Li Z, Zhu M, Sun H, Yang J, Xu S, Zhao W, Song R (2019)**, Effects of nuclear respiratory factor-1 on apoptosis and mitochondrial dysfunction induced by cobalt chloride in H9C2 cells, *Mol Med Rep*, 19(3): 2153-2163.

SUMMARY**STUDYING THE PROTECTIVE EFFECTS OF VIETNAMESE GINSENG EXTRACT ON H9C2 CARDIOMYOCYTES IN HYPOXIA-REOXYGENATION MODEL *IN VITRO***Vu Thi Thu^{1*}, Ngo Thi Hai Yen¹, Pham Thi Bich¹¹ *VNU University of Science*

Objective: Vietnamese Ginseng (*Panax vietnamensis*, SVN) or Sam Ngoc Linh is a potential herbal drug and is widely used in Viet Nam. However, the effects of SVN on cardiomyocytes in hypoxia-reperfusion injury have not been elucidated yet. This study aimed to evaluate the protective effects of SVN extract on H9C2 cardiomyocytes in CoCl₂-induced hypoxia-reperfusion model *in vitro*. **Methods:** H9C2 cells were cultured under normal (control) and subjected to HR conditions. The cell viability, the cardiolipin contents and the mitochondrial membrane potential were analyzed. **Results:** The results showed that, SVN extract at doses of 10÷500 µg/ml significantly increased the survival rate of H9C2 cells against HR. Especially at the dose of 31.25 µg/ml, SVN extract strongly preserved the cardiolipin contents and the mitochondrial membrane potential of H9C2 cells under HR condition. **Conclusion:** These obtained results demonstrated that SVN extract effectively protected cardiomyocytes against HR injury targeting mitochondria.

Keywords: H9C2, Vietnamese Ginseng, cardiolipin, mitochondria, CoCl₂.