

EXPERIMENTAL ANTI-INFLAMMATORY ACTION OF AT-04 PREPARATION IN WHITE RATS

Nguyen Van Nguyen, Vu Ha, Hoang Van Luong

Academy of Military Medicine

Pham Thi Tran Chau

Center of biotechnology - Vietnam National University, Hanoi

INTRODUCTION

Antilysin (AT) is a small protein inhibitor of several proteinase such as trypsin, kallikrein and chymotrypsin. It has been used as a drug in clinical supplementary treatment. It diminishes inflammatory processes. In this paper, a modified purification procedure of AT from bovine lungs (designated as AT-04) has been presented. It is a product of the research project KC-08-04. It has been experimentally studied in an acute inflammation model, chronic one and pancreatitis in rats.

1. Material and methods

1.1. Animals

200 male Wistar rats (120 ÷ 150g, body wt)

1.2. Methods

* The experimental acute inflammatory model was induced by kaolin (paw edema induced by kaolin). The method of Picini et al (1961) was applied: 0,1 ml of 5% aqueous kaolin suspension was injected into plantar surface of paw

* The experimental chronic inflammatory model was induced by cotton pellets (cotton pellet granuloma test). The method of Winter and Porter was applied: two cotton pellets (30 mg) were inserted in each animal (one on each side of abdomen).

AT-04 was used for treatment with different doses.

* The experimental acute pancreatitis was induced by Taurocholate sodium. The method of Mark et al (1984): Taurocholate sodium 5% was injected into the common bile duct, temporary obstructed proximally with a vascular clip

After that, rats were distributed into 6 groups:

Group 1 : Treatment with saline, as no treatment (control)

Group 2 : Treatment with AT - 04, dose : 0.8 UI/kg/day

Group 3 : Treatment with kontrykal, dose : 1000 UI/kg/day

Group 4 : Treatment with somastatin, dose : 0.01 mg/kg/day

Group 5 : Treatment with AT - 04, dose 0.6 UI/kg/day and somastatin dose 0.01 mg/kg/day.

Group 6 : Treatment with kontrykal, dose 800 UI/kg/day and somastatin dose 0.01 mg/kg/day.

Results

2.1. Effect of AT-04 on experimental acute inflammatory model

Drugs	Dose (UI/kg/day)	% inhibition of edema	P
AT - 04 (n = 15)	0,4	25,2	P > 0,05
AT - 04 (n = 14)	0,6	32,3	
AT - 04 (n = 14)	0,8	34,2*	
Kontrykal (n = 15)	600	29,5	
Kontrykal (n = 15)	1000	40,2*	

Table 1. Effect of AT - 04 on the paw edema induced by kaolin.

Table 1 showed that: AT-04 had a beneficial effect on this model. In fact, AT-04 (dose : 0,8 UI/kg) had an effect similar kontrykal (reference drug). P < 0,05

2.2. Effect of AT - 04 on chronic inflammation model

Drugs	Dose (UI/kg/day)	% Inhibition of inflammation	P
AT - 04 (n = 14)	0,4	14,6	P > 0,05
AT - 04 (n = 15)	0,6	18,9	
AT - 04 (n = 14)	0,8	21,3*	
Kontrykal (n = 14)	600	17,8	
Kontrykal (n = 15)	1000	26,2 *	

Table 2. Effect of AT - 04 on the cotton pellet granuloma test.

2.3. Effect of AT - 04 on experimental acute pancreatitis

Groups	Amylase in serum (UI/l)	Pancreatic weight (%/total body wt)	Pancreatic inflammation	Survival rate (after 84h) %
(n = 15)	6140,3 ± 306,8	0,92	++++	0
(n = 15)	5063,2 ± 403,2	0,84	+++	20
(n = 15)	4854,3 ± 380,4	0,82	+++	30,8
(n = 14)	4514,4 ± 280,7	0,80	+++	35,7
(n = 16)	3064,5 ± 219,7	0,72	+	75
(n = 12)	2963,5 ± 271,8	0,70	+	75

Table 3. Effects of AT - 04 on acute pancreatitis in comparison with kontrykal, somastatin

In general, the single use of either AT-04, kontrykal or somastatin for acute pancreatitis showed no effect. But in group 5 (with a combination of AT-04 and somastatin) and group 6 (with a combination kontrykal and somastatin), a beneficial effect was seen in treatment of this disease.

3. Discussion

Inflammation is a protective response of tissue to an infection irritation or foreign substance. But when the response becomes too great, it may be fatal. That's why, there are a lot of anti-inflammatory agents. AT - 04 is a protein proteinase inhibitor (PPI). The anti-inflammatory effect of PPI was demonstrated obviously by authors.

In this study, the results showed that AT - 04 had potent anti-inflammatory effect in the acute inflammatory model and chronic one. In acute pancreatitis, the single use of AT-04 had no beneficial effect. Serum amylase, pancreatic weight and pancreatic inflammatory response had not decreased and a survival rate of rats had not increased. But a combination of AT - 04 and somastatin has good effects. Trypsin plays a key role in further development of acute pancreatitis. AT - 04 inhibited trypsin and somastatin reduces the release of trypsin. Therefore, when we use both of them, there are beneficial effects.

REFERENCES

1. Pham Thi Tran Chau. Purification, characterization of antilysin from bovine lung and preliminary study regarding the determination of its practical uses, *Journal of Biology*, **15**(1993), p 8 - 10.
2. V. Gross, HG. Leser and A. Heinisch. Inflammatory mediators and cytokines.. new aspects of the pathophysiology and assessment of acute pancreatitis, *Hepato gastroenterology*, **6**(1993), pp 517 - 21.
3. PG. Lankisch. Acute and chronic pancreatitis, an update on management, *Drugs* **28**(1984), pp 554 - 64.
4. M. Murmutu, Fujii. Inhibitory effect of guanidine acid esters on trypsin, plasmin, plasma kallikrein and thrombin, *Biochim. Biophys. Acta*, **268**(1972), pp 221 - 4.
5. R. Soeparwate, GB. Stefano. Aprotinin diminishes inflammatory processes, *Cardiovasc - surge*, **4** (1996), pp 515 - 9.

TAP CHÍ KHOA HỌC ĐHQGHN, KHTN, t.XVI, n⁰1 - 2000

TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM THỰC NGHIỆM CỦA CHẾ PHẨM AT-04 TRÊN CHUỘT CỔNG TRẮNG

Nguyễn Văn Nguyên, Vũ Hà, Hoàng Văn Lương

Học viện Quân y

Phạm Thị Trân Châu

Trung tâm Công nghệ Sinh học - ĐHQG Hà Nội

Chúng tôi đã nghiên cứu hiệu quả của chế phẩm AT-04 trong điều trị trên 3 mô hình thực nghiệm: Mô hình viêm cấp, mô hình viêm mãn và mô hình viêm tụy cấp.

Từ những kết quả nghiên cứu chúng tôi rút ra một số kết luận:

- AT-04 có hiệu quả chống viêm rất đáng kể trên mô hình viêm cấp và mô hình viêm mãn.

- Sự kết hợp giữa AT-04 và somastatin có hiệu quả rất tốt trên viêm tụy cấp thực nghiệm.

SỬ DỤNG *AGROBACTERIUM RHIZOGENES* ĐỂ CHUYỂN GEN CÂY ĐẬU *VIGNA UNGUICULATA*

Võ Thị Thương Lan

Đại học Tổng hợp Geneve, Thụy Sĩ

I. MỞ ĐẦU

Agrobacterium rhizogenes gây bệnh mọc nhiều lông rễ ở thực vật hai lá mầm. Cơ chế của quá trình tương tác đã được các nhà nghiên cứu làm sáng tỏ: T-DNA của vi khuẩn nằm trên plasmid Ri được chuyển vào nhân và ghép vào genome của tế bào thực vật [5,6]. Đoạn T-DNA có chứa các gen chỉ hoạt động trong tế bào thực vật (eukariot). Sản phẩm của các gen này tham gia quá trình tổng hợp opine - hợp chất mà vi khuẩn sử dụng như nguồn cacbon. Ngoài ra T-DNA còn chứa các gen liên quan đến tổng hợp auxin và cytokinin, vì vậy hoạt động của các gen này gây rối loạn phát triển của tế bào khiến gen dẫn đến hình thành rất nhiều rễ mọc ra từ nơi nhiễm *A. rhizogenes*.

Do tính chất đặc biệt của T-DNA, công nghệ gen và ADN tái tổ hợp đã sử dụng T-DNA như vector chuyên chở các gen lạ để gắn chúng vào genome tế bào thực vật. Để làm sáng tỏ hoạt động và chức năng của các gen thực vật đóng vai trò quan trọng trong mối trình cố định đạm giữa các cây họ đậu và vi khuẩn *Rhizobia*, bước đầu chúng tôi sử dụng T-DNA của *A. rhizogenes* trong các thí nghiệm chuyển gen đối với genome cây đậu *Vigna unguiculata*. Các kết quả thu được sẽ mở ra khả năng đưa các gen liên quan đến mối trình cộng sinh vào genome cây đậu.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

Thân cây đậu bò *Vigna unguiculata* 3 ngày tuổi được nhiễm *A. rhizogenes* loài Jps196. T-DNA nằm trong plasmid Ri của loài vi khuẩn này có chứa các gen liên quan đến tổng hợp nopaline (một loại opine).

2. Phương pháp

1. Vi khuẩn *A. rhizogenes* được nuôi cấy trong môi trường TY ở 27⁰C qua đêm theo phương pháp được mô tả bởi Sambrook và cs. (1989). Dung dịch vi khuẩn gây nhiễm được chuẩn bị theo Krause và cs. (1994).

2. Thân cây đậu bò *V. unguiculata* 3 ngày tuổi được cắt thành các đoạn khoảng 5 cm và được đặt vào trong dung dịch chứa *A. rhizogenes* từ 1 đến 2 phút. Sau đó các đoạn thân được làm khô trên giấy thấm khử trùng và được đặt trên môi trường MS agar trong hai ngày. Tiếp theo, chúng được chuyển sang môi trường MS có chứa Cefammicine

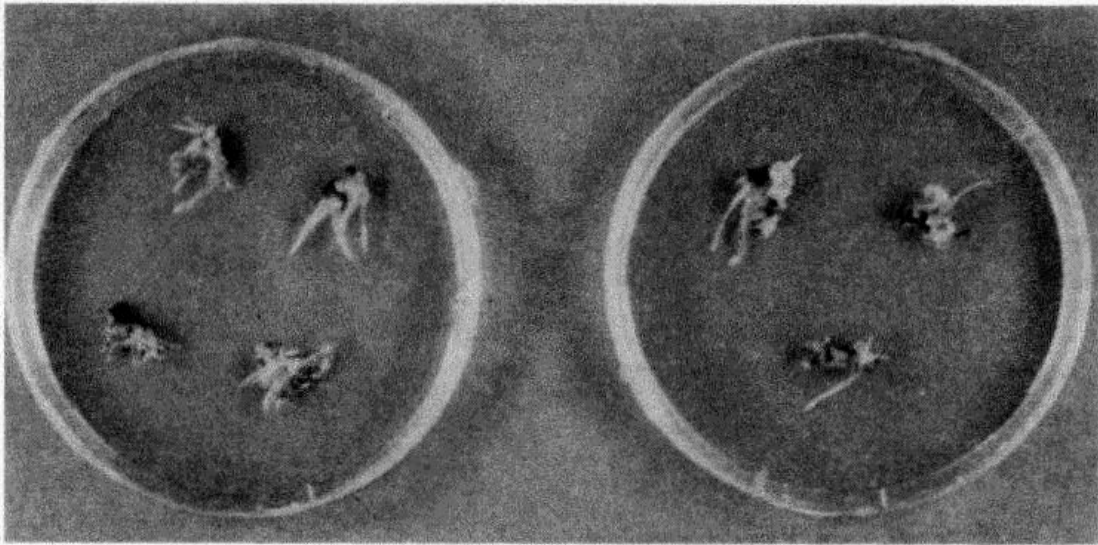
100mg/lit nhằm loại bỏ hết các vi khuẩn nhiễm ở ngoài. Sau 5 ngày các đoạn thân lại được chuyển sang môi trường MS không có kháng sinh. Rễ xuất hiện tại hai đầu đoạn thân được cắt thành đoạn dài khoảng 3 cm (có phần ngọn rễ) để nuôi cấy tiếp. Sau đó các callus hình thành từ rễ được tiếp tục nuôi cấy trong các môi trường MS khác nhau có bổ sung auxin và cytokinin để nhằm tạo ngọn và cây hoàn chỉnh.

3. Protein tổng số được tách chiết theo phương pháp nêu trong (2) và được chạy sắc ký trên giấy. Sự có mặt của nopaline được kiểm tra bằng anti-nopaline gắn C^{14} .

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

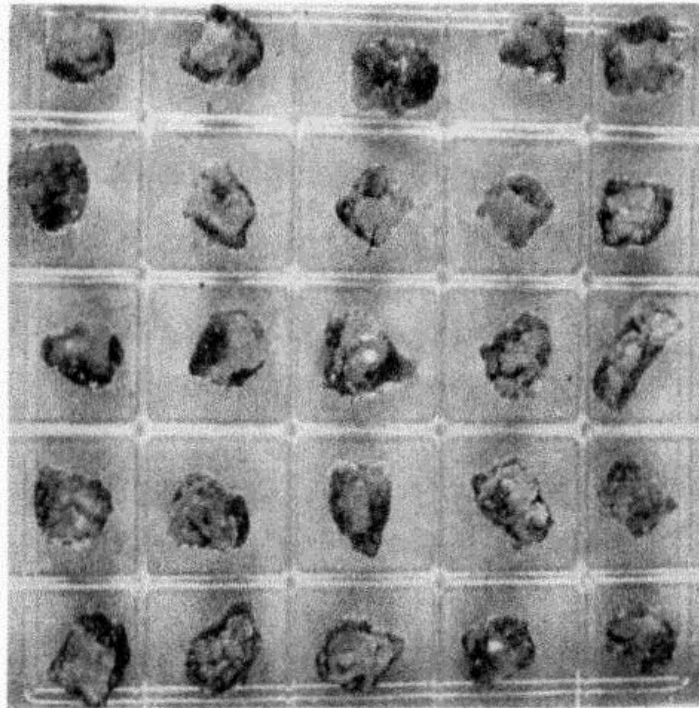
1. Nuôi cấy các đoạn thân cây đậu bò *V. unguiculata* bị nhiễm *A. rhizogenes* để thu được rễ, callus và ngọn

Sau khoảng 4 đến 7 ngày nuôi cấy, từ hai đầu của đoạn thân xuất hiện nhiều rễ (Hình 1). Các đoạn rễ có phần ngọn dài khoảng 3 cm được cắt ra và nuôi cấy tiếp trong 3- 4 tuần để thu được callus (Hình 2). Callus được chuyển sang môi trường MS bổ sung thêm auxin và cytokinin ở các nồng độ khác nhau (10^{-9} M - 10^{-6} M). Sau khoảng 8 tuần ngọn xuất hiện từ callus (Hình 3). Tỷ lệ callus tạo ngọn thấp (1/43) và các ngọn này không phát triển thành cây được mặc dù được nuôi cấy trong môi trường đủ dinh dưỡng và có bổ sung các hormon sinh trưởng.

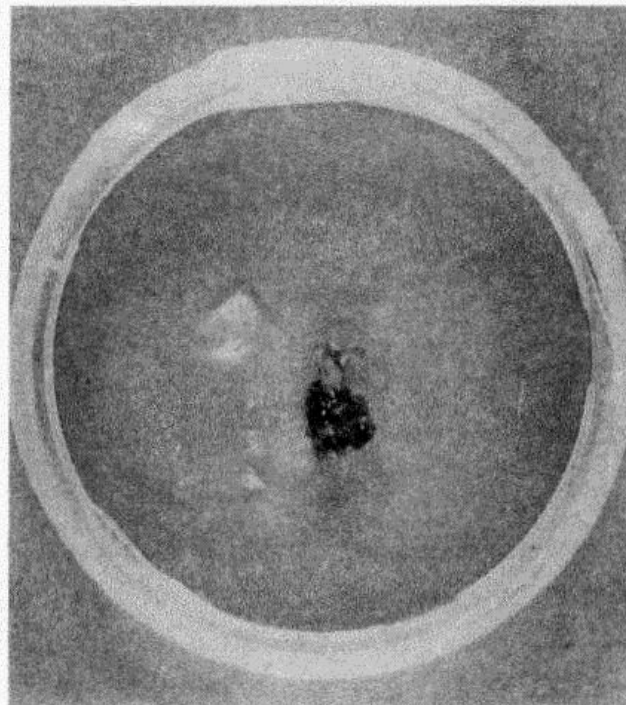


Hình 1. Rễ xuất hiện tại vết cắt sau 7 ngày nhiễm *A. rhizogenes* loài Rp8196

Như vậy là chúng tôi đã thành công trong việc nuôi cấy, tái tạo từ rễ cây đậu b thành callus và ngọn. Vì các rễ này xuất phát từ vị trí nhiễm *A. rhizogenes* (hai đầu đoạn thân) nên chúng bao gồm các rễ bình thường và rễ chứa các tế bào có genome biến đổi. Nhờ nuôi cấy các rễ riêng biệt, chúng tôi đã thu được callus và ngọn cây chuyển gen. Tuy nhiên chúng tôi không thu được cây hoàn chỉnh. Điều này có thể do chúng tôi chưa tìm ra được điều kiện môi trường nuôi cấy tối ưu hoặc chưa điều chỉnh đúng nồng độ các hormon sinh trưởng thích hợp cần bổ sung. Theo các tài liệu nghiên cứu về nuôi cấy mô, tái tạo cây hoàn chỉnh từ các bộ phận khác nhau của *Vigna* là một vấn đề hết sức khó khăn [1:3:5].



Hình 2. Callus hình thành từ rễ khi nuôi cấy riêng biệt các rễ cắt ra từ vị trí nhiễm *A. rhizogenes* Rp8196.

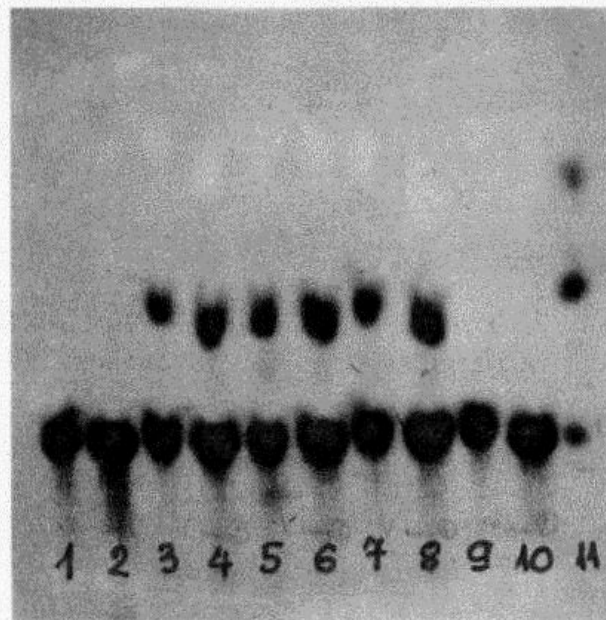


Hình 3. Ngọn chuyển gen được hình thành từ nuôi cấy callus chuyển gen.

Xác định sự ghép T-DNA vào genome tế bào cây đậu bò *V. unguiculata*

Để biết được T-DNA có ghép vào tế bào thực vật, chúng tôi xác định sự có mặt của nopaline- sản phẩm của gen nằm trên T-DNA từ các tổ chức rễ, callus và ngọn tái sinh [9]. Protein tổng số được tách chiết từ rễ, callus và ngọn. 5 μ l và 10 μ l của mỗi

mẫu tách chiết được dùng để chạy sắc ký. Sự có mặt của nopaline được phát hiện nhờ tương tác đặc hiệu với anti-nopaline. Kết quả trình bày trên hình 4 cho thấy trong các rễ xuất phát từ vết nhiễm có các rễ chuyển gen (cột 2,3). Callus sinh ra từ rễ chuyển gen nên cũng chứa các tế bào chuyển gen (cột 4,5) và ngọn tạo ra từ các callus này gồm các tế bào có hệ gen biến đổi (cột 6,7). Như vậy, bằng nuôi cấy các rễ riêng biệt mọc ra từ vết cắt bị nhiễm *A. rhizogenes*, chúng tôi có thể thu được riêng biệt các callus chuyển gen và cả ngọn chuyển gen do T-DNA ghép vào.



Hình 4. Sự có mặt của nopaline trong rễ, callus và ngọn chứng tỏ hệ gen của các tổ chức mô này được ghép thêm T-ADN có chứa gen mã cho nopaline. Cột 1,2,9,10- mẫu đối chứng (rễ cây không chuyển gen) tương ứng với 5 ul và 10 ul dịch chiết tổng số; cột 3,4-rễ nuôi cấy sau khi nhiễm Rp8196; cột 5,6-callus hình thành từ rễ chuyển gen; cột 7,8- ngọn hình thành từ callus chuyển gen. Cột 11- Các marker opine.

Bằng phương pháp gây nhiễm đơn giản với *A. rhizogenes*, chúng tôi đã thu được các tổ chức tế bào thực vật có genome bị biến đổi. Đoạn T-DNA được ghép vào genome cây chủ và các gen tổng hợp nopaline nằm trên đoạn đó được hoạt hoá bởi các protein thực vật. Tế bào thực vật nói riêng và hệ gen tế bào eucariot nói chung không có gen tổng hợp và đồng hoá nopaline. Vì vậy ngoài khả năng gây biến đổi genome, T-DNA còn mang gen marker giúp cho xác định dễ dàng quá trình chuyển gen xảy ra thành công hay không. Cùng với kết quả thu được của nhiều tác giả khác [3,4,10] kết quả của chúng tôi góp phần nêu bật tầm quan trọng của T-DNA trong kỹ thuật chuyển gen và nghiên cứu chức năng của chúng. Các kết quả bước đầu cho phép chúng tôi sử dụng T-DNA mang các gen thực vật qui định tính đặc hiệu cho quá trình cố định đạm ghép vào genome cá đậu với hy vọng làm thay đổi tính tương tác đặc hiệu đó.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. DeBlock, L. Herrera-Estrella, M. van Montagu, J. Schell, P. Jambryski, . *EMBO J.*, **3**(1984), p. 1681-1689.
2. J. Diaper, R. Scott, P. Armitage, R. Walden. *A Laboratory manual*. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1988.
3. K.A. Feldmann. *Plant J.*, **1**(1991), p. 71-82.
4. C. Koncz, N. Martini, R. Mayerhofer, Zs. Koncz-Kalman, H. Korber, G.P. Redei, J. Schell. *EMBO J.*, **9**(1990), p. 1337-1346.
5. W. Ream. *Ann.Rev. Phytopathol.*, **217**(1990), p. 583-618.
6. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* Cold Spring Harbor, New York. 1989.
7. J. Schell. *Science*, **237**(1987), p. 1176-1183.
8. R. Walden, H. Hayashi, J. Schell. *Plant J.*, **1**(1991), p. 281-288.
9. N.S.Yadav, J. Vanderleyden, D.R. Bennett, W. Barnes, M.D Chilton. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **79**(1982), p. 6322-6326.
10. P. Zambryski, J. Tempe, J. Schell. *Cell*, **56**(1989), p. 193-201.

VND JOURNAL OF SCIENCE, Nat. Sci., t.XVI, n^o1 - 2000

TRANSFORMATION OF *VIGNA UNGUICULATA* BY *A. RHIZOGENES*

Vo Thi Thuong Lan

Universite de Geneve, Suisse.

Transgenic callus and shoots of *V. unguiculata* were regenerated from cultured stem segments using T-DNA of *A. rhizogenes* as a transfer vector. Nopaline which is product of bacterial genes inserted in host plant genome was found in transformed plant tissues.