

## Khảo sát khả năng của phycocyanin trong bảo vệ da *in vitro* và *in vivo* Determining the ability of phycocyanin to protect skin *in vitro* and *in vivo*

Tô Minh Quân<sup>1,4\*</sup>, Trang Hoàng Ngọc Ngân<sup>1,4</sup>, Lê Thị Thu Uyên<sup>1,4</sup>  
 Đặng Hồng Loan<sup>2</sup>, Lại Đình Biên<sup>2</sup>, Lê Thành Long<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn Lâm Khoa học Việt Nam, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>4</sup>Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ, Email: tomquan@hcmus.edu.vn

### THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.  
 tech.vi.18.1.2355.2023

Ngày nhận: 20/06/2022

Ngày nhận lại: 24/08/2022

Duyệt đăng: 30/08/2022

#### Từ khóa:

chống lão hóa da; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;  
 nguyên bào sợi; phycocyanin;  
 tảo spirulina; tia UV

#### Keywords:

anti-aging; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; fibroblast;  
 phycocyanin; spirulina algae;  
 UV radiation

### TÓM TẮT

Phycocyanin (PC) là một protein màu xanh lam có hoạt tính chống oxi hóa. PC chiếm khoảng 10% khối lượng khô tảo *Arthrospira platensis*. Hiện nay, chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá hiệu quả sử dụng PC trong lĩnh vực mỹ phẩm. Trong nghiên cứu này, PC được khảo sát khả năng bảo vệ tế bào da trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Đối với thử nghiệm *in vitro*, tế bào nguyên bào sợi người (hF) được nuôi trong môi trường DMEM/F12 chứa PC (0.1 -10 µg/ml) 24 giờ trước khi xử lý với 150µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trong 90 phút. Sau 04 ngày, tiến hành khảo sát hình dạng tế bào và xác định marker đặc trưng cho quá trình lão hóa senescence-associated β-galactosidase (SA-gal). Đối với thử nghiệm trên chuột, chuột *Mus musculus* var. albino được cạo sạch da lưng, bôi PC 50 µg/ml 03 giờ trước mỗi lần chiếu UV. Thí nghiệm được tiến hành trong 08 tuần, mỗi tuần xử lý PC và chiếu UV 06 ngày. Sau 08 tuần, đánh giá tính chất bề mặt da và nhuộm mô học vùng da xử lý. Kết quả cho thấy PC nồng độ 10 µg/ml đã làm giảm tác hại của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đối với tế bào: tế bào vẫn duy trì dạng thon dài, tỉ lệ diện tích nhân/tế bào tương tự như tế bào ban đầu (0.16 ± 0.06), tỉ lệ tế bào biểu hiện SA-gal thấp (27.1 ± 6.1%). Sau 08 tuần xử lý, da chuột được bôi với PC 50 µg/ml trước khi chiếu UV có tính chất: mịn, ít nếp nhăn, cấu trúc mô học da tương tự như da tự nhiên. Kết luận: phycocyanin các tác dụng bảo vệ nguyên bào sợi da *in vitro* khỏi tác nhân hydrogen peroxide ở nồng độ 10 µg/ml và *in vivo* khỏi tác hại của tia UV ở nồng độ 50 µg/ml.

### ABSTRACT

Phycocyanin (PC) is an antioxidative protein with blue color. PC occupies 10% of the biomass of *Arthrospira platensis*. In this study, we aimed to investigate the ability of PC to protect skin from harmful agents. Human fibroblasts (hF) were incubated in the culture medium containing PC (0.1 - 10 µg/ml) one day before treating with 150µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 90 minutes. Four days after treatment, cell shape and expression of a biomarker of senescence, senescence-associated β-galactosidase (SA-gal), were determined. *Mus musculus* var. albino was used in *in vivo* experiment. Shaved

dorsal skin was topically applied with PC 50  $\mu\text{g/ml}$  03 hours prior to UV irradiation. The treatment was performed 06 times per week for 08 weeks. After that, skin texture and histology were determined. The results showed that 10  $\mu\text{g/ml}$  PC relieved the harmful effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on hF. In this group, the hF remained elongated shape similar to in the control group and the expression of SA-gal in cells was lower than in the  $\text{H}_2\text{O}_2$  group ( $27.1 \pm 6.1\%$ ). After 08 weeks, dorsal skin treated with PC prior to UV treatment was still smooth with fewer wrinkles, and the skin's structure was similar to the control. Conclusion: phycocyanin can protect skin from environmental factors in vitro and in vivo.

## 1. Đặt vấn đề

Phycocyanin là protein sắc tố xuất hiện ở vi khuẩn lam, một số loài tảo đỏ, tảo glaucophyte (de Morais, da Fontoura Prates, Moreira, Duarte, & Costa, 2018; Kumar, Dhar, Pabbi, Kumar, & Walia, 2014; Safaei & ctg., 2019). Trong đó, tảo xoắn spirulina (tên khoa học *Arthopida platensis*) thường được sử dụng làm nguồn PC trong tự nhiên. Phycocyanin thu nhận năng lượng từ ánh sáng và vận chuyển vào trung tâm quang hợp. Đặc tính của PC là khả năng chống oxi hóa, chống viêm (Chopra & Bishnoi, 2007). Hiện nay, PC thường được sử dụng trong lĩnh vực thực phẩm chức năng hoặc chất tạo màu trong thực phẩm và mỹ phẩm (Liu, Huang, Zhang, Cai, & Cai, 2016). Những nghiên cứu chuyên sâu về tiềm năng ứng dụng PC trong lĩnh vực thẩm mỹ chưa được tiến hành. Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào tiến hành đánh giá tác động chống oxi hóa của PC trên tế bào và trên cơ thể động vật.

Da là rào chắn bên ngoài để bảo vệ cơ thể khỏi tác các nhân từ môi trường ngoài (Chen & Wong, 2008). Da dễ bị tổn thương và bị lão hóa da là điều không tránh khỏi. Trong những tác nhân từ môi trường, tia cực tím (ultraviolet radiation, UV) là nguyên nhân chính dẫn đến những tổn thương da như viêm da cháy nắng, sạm đỏ, gây lão hóa da và ức chế miễn dịch toàn thân, ... Tia UV tạo thành sự hình thành gốc oxi hóa trong da. Tia UV và gốc oxi hóa này có khả năng trực tiếp phá hủy những protein cấu trúc như collagen và elastin hoặc gây tổn thương DNA, màng tế bào, màng ti thể, màng nhân, ... của nguyên bào sợi hoặc tế bào sừng. Ngoài ra, gốc oxi hóa kích thích sự hình thành những enzyme phá hủy protein chính của da như MMP1, MMP3, MMP9 (Suganuma, Nakajima, Ohtsuki, & Imokawa, 2010). Do đó, tiếp xúc với tia UV thời gian dài sẽ dẫn tới da sẽ xuất hiện các nếp nhăn, trở nên lỏng lẻo, sạm màu (Fisher & ctg., 1997; Roupe, 2001). Đồng thời, sản xuất gốc oxi hóa gia tăng theo tuổi tác nên da người lớn tuổi dễ bị lão hóa, xuất hiện đồi mồi, nhão (Ahsanuddin, Lam, & Baron, 2016). Một trong những giải pháp hiện nay chống lão hóa da là sử dụng các chất chống oxi hóa. Các chất này sẽ bắt hoặc trung hòa các gốc tự do hình thành do tia UV hoặc hình thành trong các quá trình hoạt động sinh lý như hô hấp. PC có tính chất chống oxi hóa tốt và kích thích nguyên bào sợi tăng sinh (Canan & ctg., 2013; Chen & Wong, 2008; Wu, Wang, Xiang, Li, & He, 2016). Do đó PC là chất chống lão hóa da tiềm năng để kích thích tăng sinh và bảo vệ nguyên bào sợi khỏi các tác nhân có hại.

Hiện nay trên thế giới chưa có nghiên cứu nào tiến hành đánh giá khả năng của PC trong việc bảo vệ nguyên bào sợi và da khỏi tác nhân gây hại như gốc oxi hóa và tia UV. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng của PC trong việc bảo vệ tế bào nguyên bào sợi khỏi tác nhân gây oxi hóa mạnh  $\text{H}_2\text{O}_2$  và bảo vệ da khỏi tác hại của tia UV. Kết quả nghiên cứu sẽ là bước đệm để phát triển sản phẩm từ tảo trong lĩnh vực thẩm mỹ.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nồng độ dịch chiết C-PC

Tảo xoắn spirulina được nuôi trong phòng thí nghiệm: môi trường Zarrouk, nhiệt độ 27-30°C, cường độ ánh sáng 3,000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ mỗi ngày. Sinh khối tảo được thu nhận bằng cách lọc qua màng lọc và sấy khô ở 50°C. Bột sấy khô được nghiền mịn, rây qua lưới inox 304 kích thước 400 mesh, hút chân không và bảo quản ở nhiệt độ phòng (Madkour, Kamil, & Nasr, 2012).

Phá vách tế bào bằng phương pháp đông lạnh - rã đông: cân 0.1g bột tảo cho vào 30ml dung dịch CaCl<sub>2</sub> 0.9mM, sau đó đông lạnh ở -20°C 12 giờ, sau đó rã đông ở 4°C 12 giờ, lặp lại tất cả các bước vừa nêu 03 lần, giữa mỗi chu kỳ ly tâm 6,000rpm trong 20 phút để thu dịch PC. Bổ sung than hoạt tính (AC) vào dịch chiết (80g than/L dịch chiết), để lắng 10 phút, sau đó ly tâm 4,000rpm, trong 10 phút, bước ly tâm được lặp lại ba lần để loại hoàn toàn than hoạt tính. Tiếp theo, PC được tinh sạch bằng muối ammonium sulfate. Muối AS được bổ sung vào nồng độ 300 g/L, ủ 4°C để qua đêm, sau đó ly tâm hỗn hợp vận tốc 4,000rpm trong 15 phút để thu cặn. Cặn được hòa trong dung dịch đệm phosphate Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và thẩm tích bằng màng 14,000 Dalton, tiến hành đông khô. Công thức tính nồng độ PC và độ tinh sạch như sau (Antelo, Costa, & Kalil, 2015):

$$\text{Nồng độ PC} = (\text{OD}_{615} - 0.474 \times \text{OD}_{652}) / 5.34 \quad (1)$$

$$\text{Độ tinh sạch EP} = \text{OD}_{620} / \text{OD}_{280} \quad (2)$$

### 2.2. Thí nghiệm gây độc trên tế bào

#### 2.2.1. Đánh giá khả năng bảo vệ tế nguyên bào sợi của C-PC thô khỏi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro

Nguyên bào sợi người (hF) P6 được cấy vào đĩa 24 giếng với mật độ 4x10<sup>4</sup> tế bào/giếng và nuôi trong môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 24 giờ. Sau 24 giờ, thay môi trường nuôi bằng môi trường mới chứa PC các nồng độ 0 (nhóm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 0.1 (nhóm PC0.1), 1 (nhóm PC1.0) hoặc 10 µg/ml (nhóm PC10.0). Sau 24 giờ, thay môi trường cũ bằng môi trường mới chứa 150µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nuôi trong 90 phút. Sau đó thay môi trường bằng môi trường nuôi bình thường. Sau 04 ngày, tiến hành đánh giá sự biểu hiện marker đặc trưng của lão hóa senescence - associated β-galactosidase bằng kit nhuộm đặc trưng (Senescence cells Histochemical staining kit, CS0030, Sigma) và đánh giá hình dạng tế bào bằng kit nhuộm Giemsa.

#### 2.2.2. Thí nghiệm tạo mô hình chiếu UV

Quy trình gây lão hóa da chuột bằng tia UV được tiến hành dựa theo tác giả Agrawal và Kaur (2010) và có biến đổi. Đèn sử dụng là đèn UV chuyên dụng với cường độ ánh sáng đèn như sau UVA = 360 mJ/cm<sup>2</sup>, UVB = 60 mJ/cm<sup>2</sup>, khoảng cách từ đèn tới lưng chuột là 20cm. Chuột được chiếu UV liên tục 06 ngày 01 tuần và trong 08 tuần với thời gian chiếu 45 phút/ngày. Đối với nhóm thí nghiệm, chuột được bôi với PC nồng độ 50 µg/ml trước khi chiếu UV 3h. Trong thời gian thí nghiệm, quan sát sự hình thành nếp nhăn trên da chuột và nhuộm mô học da chuột vào tuần thứ 08. Mức độ nhăn da chuột được đánh giá theo bảng sau:

**Bảng 1**

Tiêu chí đánh giá soi da theo Agrawal và Kaur (2010)

Cấp	Tiêu chí đánh giá
0	Không có nếp nhăn
1	Xuất hiện nếp nhăn mịn
2	Nếp nhăn mịn biến mất

Cấp	Tiêu chí đánh giá
3	Nếp nhăn nông xuất hiện
4	Nếp nhăn trở nên sâu hơn và da trở nên lỏng lẻo
5	Nếp nhăn sâu xuất hiện nhiều
6	Xuất hiện tổn thương da nghiêm trọng, thậm chí hình thành khối u

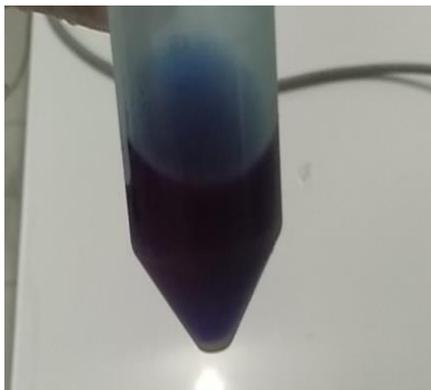
### 2.3. Phương pháp thống kê

Các thống kê trong nghiên cứu được xử lý bằng phương pháp One way ANNOVA trong phần mềm Sigma Plot.

## 3. Kết quả và biện luận

### 3.1. Kết quả tách chiết phycocyanin

Sau quá trình đông lạnh - giải đông, tế bào tảo bị vỡ, PC được giải phóng vào dung dịch đệm cho nên dịch chiết PC có màu xanh dương đậm. PC được tinh sạch bằng phương pháp đơn giản như than hoạt tính, ammonium sulfate. Sau mỗi bước tinh sạch, dung dịch trở nên trong hơn sau những lần tinh sạch. Kết quả đo OD cho thấy chỉ số tinh sạch PI tăng dần và đạt mức tối đa  $2.482 \pm 0.011$  sau quá trình thẩm tách. Đồng thời nồng độ PC cũng tăng dần và đạt nồng độ tối đa  $4.452 \pm 0.011$  mg/ml. Tuy nhiên, sau khi thẩm tách thì nồng độ giảm đi so với trước thẩm tách  $3.076 \pm 0.521$  mg/ml. Hiện tượng này có thể giải thích dựa trên cơ chế quá trình thẩm tách. Trong quá trình thẩm tách, dung dịch đệm di chuyển vào dịch PC trong màng và những thành phần muối hoặc phân tử nhỏ (amino acid hoặc peptide kích thước nhỏ hơn 14000 Da) di chuyển ra ngoài dung dịch nên nồng độ PC giảm đi nhưng chỉ số PI vẫn tăng lên (Hình 1).



**Hình 1.** Dung dịch phycocyanin từ tảo xoắn spirulina

### Bảng 2

Kết quả nồng độ và độ tinh sạch của dịch chiết C-PC

Dung môi	Nồng độ (mg/mL) (n = 3)	Chỉ số tinh sạch (PI) (n = 3)
Sau khi đông lạnh-rã đông	$1.802 \pm 0.066^d$	$0.639 \pm 0.006^d$
Ủ với than hoạt tính	$1.907 \pm 0.609^c$	$1.102 \pm 0.008^c$
Tủa bằng muối ammonium sulfate	$4.452 \pm 0.011^a$	$1.977 \pm 0.009^b$
Thẩm tách	$3.076 \pm 0.521^b$	$2.482 \pm 0.011^a$

Ghi chú: a, b, c, d: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% trong cùng 1 cột

Kết quả tinh sạch bước cuối đạt được dung dịch có PI là  $2.482 \pm 0.011$ . PI của PC được tính bằng tỉ lệ OD620/OD280. Chỉ số PI dùng trong thực phẩm, thẩm mỹ, phân tích lần lượt là từ 0.7 tới dưới 1.5, từ 1.5 tới 4.0 và từ 4.0 trở lên (Amarante, Júnior, Sala, & Kalil, 2020). Để tinh sạch được PC, nhiều phương pháp được thử nghiệm như sử dụng sóng siêu âm, chitosan, cột trao đổi ion, cột phân tách khối lượng, ... (Safaei & ctg., 2019). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến tới sử dụng những phương pháp đơn giản và có thể áp dụng ở quy mô công nghiệp như đông lạnh rồi đông, than hoạt tính và ammonium sulfate. Phương pháp đông lạnh - rã đông là phương pháp thường được sử dụng trong chiết xuất hoạt chất, các tinh thể băng được hình thành trong quá trình này sẽ phá vỡ màng tế bào giải phóng PC. Than hoạt tính có cấu trúc vi lỗ, có thể hấp thu những thành phần tạp trong tảo. AS là chất thường được sử dụng công nghiệp để tủa protein (Safaei & ctg., 2019). Kết quả cho thấy quy trình chiết xuất tạo được PC có PI nằm trong khoảng sử dụng trong thẩm mỹ. Kết quả này tương tự như Farzaneh Fekrat khi tách chiết PC bằng AS ( $1.88 \pm 0.09$ ) (Fekrat, Nami, Ghanavati, Ghaffari, & Shahbazi, 2018).

### 3.2. Kết quả đánh giá khả năng bảo vệ tế bào hF của PC khỏi tác nhân gây oxy hóa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

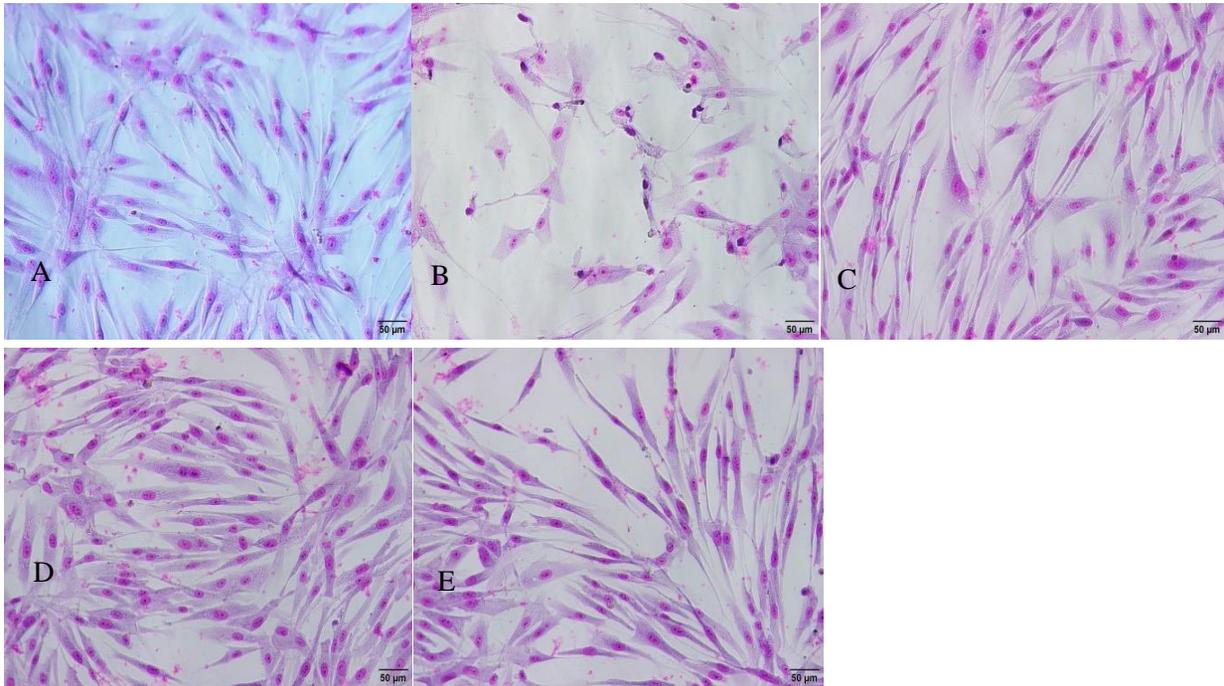
**Bảng 3**

Kết quả đánh giá diện tích tế bào và sự biểu hiện SA-gal trong thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào hF của PC

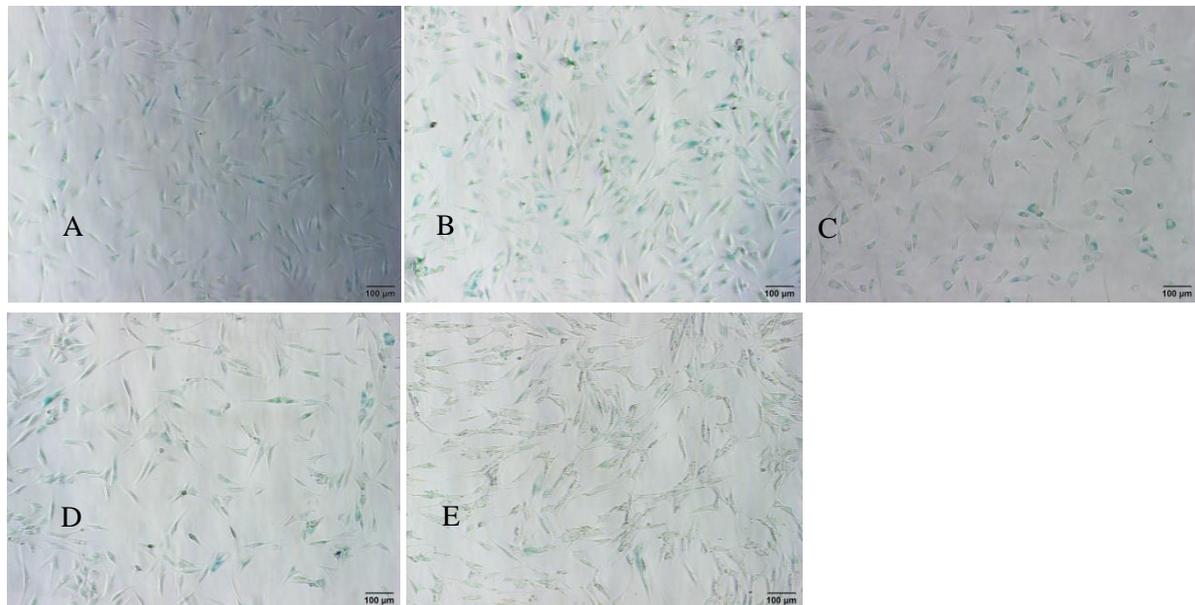
		Tế bào ( $\mu\text{m}^2$ )	Tỉ lệ N/TB	Tỉ lệ tb dương tính với SA-gal (%)
Đối chứng	$176.1 \pm 20.3^a$	<b>Nhóm</b>	<b>Nhân (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	$5.4 \pm 2.1^c$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$235.9 \pm 90.0^a$	$3018.5 \pm 917.3^a$	$0.08 \pm 0.02^b$	$79.5 \pm 5.6^a$
PC0.1	$228.5 \pm 72.7^a$	$2422.0 \pm 500.7^{ab}$	$0.10 \pm 0.02^b$	$66.9 \pm 5.0^b$
PC1.0	$224.3 \pm 50.7^a$	$2305.3 \pm 885.5^b$	$0.12 \pm 0.06^b$	$39.1 \pm 5.4^c$
PC10.0	$212.2 \pm 105.2^a$	$1371.9 \pm 653.3^c$	$0.16 \pm 0.06^a$	$27.1 \pm 6.1^d$

Ghi chú: a, b, c, d: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% trong cùng 1 cột

Kết quả nhuộm Giemsa cho thấy  $150\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đã có tác động lên hình dạng tế bào. Sau khi xử lý với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nhiều tế bào trở nên co tròn và bong ra khỏi bề mặt nuôi cấy. Sau 04 ngày, phần lớn tế bào còn bám trên bề mặt đều có dạng đa giác với diện tích nhân và tế bào tăng lên, tỉ lệ diện tích nhân/tế bào giảm từ  $0.17 \pm 0.06$  tới  $0.08 \pm 0.02$  (Hình 2) ( $\alpha < 0.05$ ). Điều này cho thấy sự gia tăng diện tích tế bào lớn hơn so với gia tăng diện tích nhân. Đồng thời, kết quả nhuộm SA-gal, marker đặc trưng cho sự lão hóa tế bào cho thấy tỉ lệ lớn tế bào trong giai đoạn này biểu hiện marker SA-gal (tế bào dương tính có màu xanh khi nhuộm) (Hình 3). Điều này cho thấy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đã gây chết và lão hóa tế bào. Quan sát sự tăng sinh tế bào cho thấy những tế bào phình về mặt diện tích không có sự tăng sinh ở những ngày nuôi tiếp theo (không thống kê số liệu). Hydroxy peroxide là một gốc oxi tự do có hoạt tính mạnh (ROS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tạo thành gốc hydroxyl ( $\cdot\text{OH}$ ), các ROS này tác động lên màng tế bào, màng ti thể, màng nhân và các thành phần cấu trúc trong khung xương tế bào (Chen, Liu, & Merrett, 2000; Du, Chen, Wu, Ruan, & Wu, 2019). Do đó, khi tiếp xúc với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tế bào bị tổn thương, tùy theo mức độ tổn thương mà tế bào sẽ phục hồi như ban đầu hoặc vào trạng thái lão hóa tế bào hoặc gây chết tế bào. Những dấu hiệu nhận diện tế bào lão hóa là tế bào không tăng sinh, không thực hiện chức năng, gia tăng diện tích tế bào và nhân, sự hình thành marker đặc trưng cho lão hóa SA-gal. Do đó, trong thí nghiệm này  $150\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gây chết tế bào và cảm ứng phần lớn tế bào còn lại đi vào trạng thái lão hóa.



**Hình 2.** Tế bào hF nhuộm với thuốc nhuộm Giemsa (x100).  
A: đối chứng, B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, C: PC0.1, D: PC1.0, E: PC10.0



**Hình 3.** Tế bào hF nhuộm với thuốc nhuộm phát hiện SA-gal (x100).  
A: đối chứng, B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, C: PC0.1, D: PC1.0, E: PC10.0

Đối với nhóm xử lý PC 24 giờ trước khi xử lý với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cho thấy tỉ lệ tế bào co tròn ít, tỉ lệ tế bào tăng diện tích ít, phần lớn tế bào vẫn duy trì dạng thon dài. Tuy nhiên, tốc độ tăng sinh tế bào bị giảm đi (quan sát bằng mắt). Trong các nhóm thí nghiệm PC0.1, PC1.0 cho thấy sự cải thiện về tỉ lệ nhân/tế bào lần lượt là  $0.10 \pm 0.02$ ,  $0.12 \pm 0.06$  và tỉ lệ tế bào dương tính với SA-gal  $66.9 \pm 5.0\%$ ,  $39.1 \pm 5.4\%$  thấp hơn so với tế bào trong nhóm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa mặt thống kê nên sự chênh lệch chưa rõ ràng. Đối với tế bào nhóm PC10.0, sự khác biệt so với nhóm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trở nên rõ ràng, tỉ lệ nhân/tế bào và dương tính SA-gal lần lượt là  $0.16 \pm 0.06$  (gần bằng nhóm đối chứng) và  $27.1 \pm 6.1$ . Kết quả này cho thấy PC 10 µg/ml có khả năng

giảm tác hại của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đối với tế bào hF. Chức năng này có thể là do PC có hoạt tính chống oxi hóa. Khi ủ với tế bào hF 24 giờ, tế bào hF hấp thụ các phân tử PC và những phân tử này trung hòa hoặc bắt các ROS hình thành sau đó. Từ đó, PC có khả năng bảo vệ tế bào khỏi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tuy nhiên, các nồng độ 0.1 và 1.0 µg/ml, nồng độ PC chưa đạt tới ngưỡng có khả năng bảo vệ tế bào, nồng độ 10.0 µg/ml cho hiệu quả rõ ràng hơn so với 02 nồng độ trên.

### 3.3. Kết quả thử nghiệm trên chuột

**Bảng 4**

Kết quả đánh giá hiệu quả bảo vệ da chuột của PC

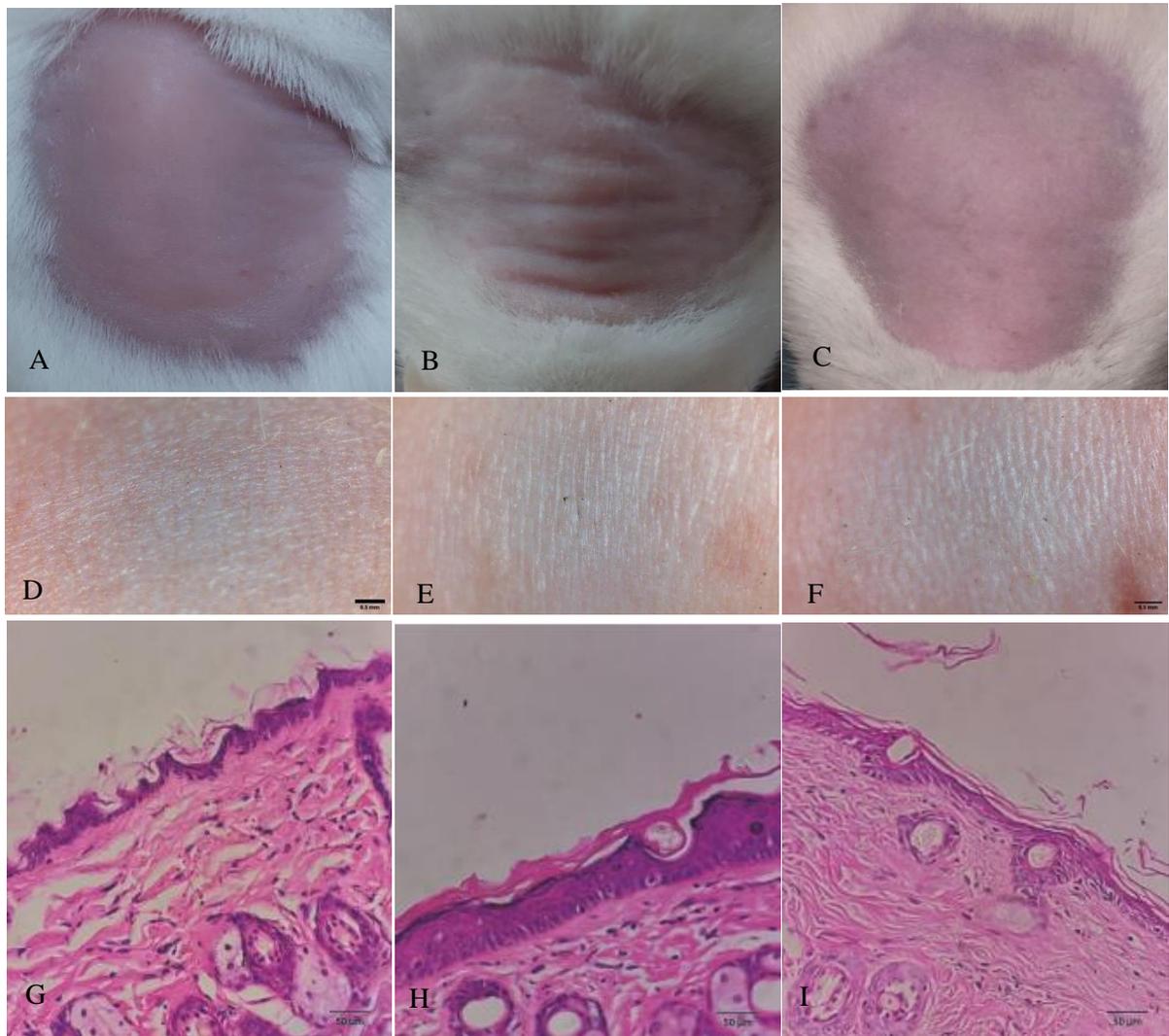
Lô	Độ dày biểu bì (µm)	Mức độ lão hóa
Đối chứng	18.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.5 <sup>a</sup>
UV	39.7 ± 2.3 <sup>b</sup>	3.7 ± 0.5 <sup>b</sup>
U <sub>50</sub>	18.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.5 <sup>c</sup>

Ghi chú: a, b, c: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% trong cùng 1 cột

Trong thử nghiệm này, chuột được gây lão hóa da bằng đèn có tia UV theo phương pháp của Agrawal và Kaur (2010). Đối với nhóm thí nghiệm, chuột được bôi PC 50 µg/ml 03 giờ trước khi chiếu UV.

Kết quả quan sát sau 08 tuần cho thấy đối với chuột nhóm UV có sự hình thành nếp nhăn sâu nằm ngang lưng chuột. Nếp nhăn này xuất hiện khi chuột giữ nguyên vị trí và sâu hơn khi chuột di chuyển. Đồng thời, bề mặt da chuột thô ráp, có nhiều nếp sùng và nhạt màu. Ở tuần cuối cùng, da có hiện nhão, ít đàn hồi. So với thang điểm, điểm trung bình của nhóm này là 3.7 ± 0.5. Kết quả nhuộm mô học cho thấy có sự dày lên lớp biểu bì và lớp trung bì (Hình 4). Kết quả này cho thấy tia UV đã gây tác động lên da chuột. Những dấu hiệu như hình thành nếp nhăn, da lỏng lẻo, độ dày biểu bì tăng là những dấu hiệu lão hóa da do tia UV. Bức xạ tia UV có khả năng phá hủy các sợi protein trung bì da như collagen, elastin, quá trình này lặp lại trong thời gian dài dẫn đến hình thành nếp nhăn sâu. Đồng thời tia UV gây lão hóa tế bào da như nguyên bào sợi, tế bào biểu bì, dẫn tới giảm sự tăng sinh tế bào và giảm lượng tổng hợp collagen nên da trở nên lỏng lẻo hơn (Agrawal & Kaur, 2010; Bissett, Hannon, & Orr, 1987; Kim & Park, 2016).

Đối với nhóm bôi PC nồng độ 50 µg/ml, chuột được bôi với PC 50 µg/ml 03 giờ trước khi chiếu tia UV. Kết quả cho thấy bề mặt da vẫn duy trì láng mịn, da có màu hồng tự nhiên, chỉ xuất hiện một ít vết nhăn nông trong quá trình di chuyển. Điểm trung bình theo tiêu chuẩn 2.3 ± 0.5, thấp hơn so với nhóm chiếu UV ( $\alpha < 0.05$ ). Kết quả nhuộm mô học cho thấy độ dày lớp biểu bì và trung bì tương tự như cấu trúc da tự nhiên ( $\alpha > 0.05$ ). Cấu trúc mô học cho thấy các sợi liên kết sắp xếp chặt chẽ với nhau, các nếp gấp hầu như không hình thành trên tầng biểu bì so với lô chiếu UV. Kết quả này cho thấy PC 50 đã bảo vệ được da chuột khỏi tác động của tia UV. Điều này có thể giải thích PC có 02 tính chất quan trọng trong chống lão hóa: khả năng kích thích tế bào da tăng trưởng và khả năng chống oxi hóa. Trong quá trình chiếu UV, một trong cơ chế chính tạo thành tổn thương đối với tế bào và protein trong da là sự hình thành các gốc ROS do quá trình chiếu UV (Davalli, Mitic, Caporali, Lauriola, & D'Arca, 2016; Masaki, 2010). PC có khả năng chống oxi hóa tốt nên có thể hạn chế tác động của UV lên da.



**Hình 4.** Kết quả da chuột sau 08 tuần thử nghiệm chiếu tia UV.

A, D, G: đối chứng, B, E, H: UV, C, F, I: PC50. A, B, C: chụp tổng thể, D, E, F: soi da bằng kính soi ngược, G, H, I: mô học (x100)

#### 4. Kết luận

Tổng hợp các kết quả thu nhận được cho thấy PC có tác dụng làm giảm tác hại của  $H_2O_2$  đối với tế bào. Trong những nồng độ khảo sát, nồng độ 10  $\mu\text{g/ml}$  cho hiệu quả bảo vệ tế bào khỏi  $H_2O_2$  tốt nhất: nguyên bào sợi vẫn duy trì dạng thon dài, diện tích nhân/tế bào ( $0.16 \pm 0.06$ ) và giảm tỉ lệ tế bào biểu hiện SA-gal thấp ( $27.1 \pm 6.1\%$ ). Sau 08 tuần chiếu UV, da chuột được bôi với PC 50  $\mu\text{g/ml}$  trước mỗi lần chiếu UV có màu sắc, cấu trúc bề mặt và mô học tương tự như da tự nhiên. Kết luận: Phycocyanin nồng độ 10  $\mu\text{g/ml}$  đã có tác dụng bảo vệ nguyên bào sợi khỏi tác nhân  $H_2O_2$  và nồng độ 50  $\mu\text{g/ml}$  bảo vệ da khỏi tác hại của tia UV.

#### Tài liệu tham khảo

- Agrawal, R., & Kaur, I. P. (2010). Inhibitory effect of encapsulated curcumin on ultraviolet-induced photoaging in mice. *Rejuvenation Research*, 13(4), 397-410. doi:10.1089/rej.2009.0906
- Ahsanuddin, S., Lam, M., & Baron, E. D. (2016). Skin aging and oxidative stress. *AIMS Molecular Science*, 3(2), 187-195. doi:10.3934/molsci.2016.2.187

- Amarante, M. C. A. d., Júnior, L. C. S. C., Sala, L., & Kalil, S. J. (2020). Analytical grade C-phycocyanin obtained by a single-step purification process. *Process Biochemistry*, 90, 215-222. doi:10.1016/j.procbio.2019.11.020
- Antelo, F. S., Costa, J. A. V., & Kalil, S. J. (2015). Purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in aqueous two-phase systems using an experimental design. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(1), 1-11. doi:10.1590/s1516-8913201502621
- Bissett, D. L., Hannon, D. P., & Orr, T. V. (1987). An animal model of solar-aged skin: Histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol*, 46(3), 367-378. doi:10.1111/j.1751-1097.1987.tb04783.x
- Canan, S. G., Deniz, K. E., Ilyas, O., Pergin, A., Nur, C., & Ismet, D. G. (2013). In vitro and in vivo investigations of the wound healing effect of crude *Spirulina* extract and C-phycocyanin. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(8), 425-433.
- Chen, Q. M., Liu, J., & Merrett, J. B. (2000). Apoptosis or senescence-like growth arrest: Influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of normal human fibroblasts. *Biochemical Journal*, 347(2), 543-551.
- Chen, T., & Wong, Y.-S. (2008). In vitro antioxidant and antiproliferative activities of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(12), 4352-4358. doi:10.1021/jf073399k
- Chopra, K., & Bishnoi, M. (2007). Antioxidant profile of *Spirulina*: A blue-green microalga *Spirulina*. In *Human nutrition and health* (pp. 115-132). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxidative Medicine and Cell Longevity*, 2016, 1-18. doi:10.1155/2016/3565127
- de Moraes, M. G., da Fontoura Prates, D., Moreira, J. B., Duarte, J. H., & Costa, J. A. V. (2018). Phycocyanin from microalgae: Properties, extraction and purification, with some recent applications. *Industrial Biotechnology*, 14(1), 30-37.
- Du, L., Chen, E., Wu, T., Ruan, Y., & Wu, S. (2019). Resveratrol attenuates hydrogen peroxide-induced aging through upregulation of autophagy in human umbilical vein endothelial cells. *Drug Design Development and Therapy*, 13, 747-755. doi:10.2147/DDDT.S179894
- Fekrat, F., Nami, B., Ghanavati, H., Ghaffari, A., & Shahbazi, M. (2018). Optimization of chitosan/activated charcoal-based purification of *Arthrospira platensis* phycocyanin using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1095-1105. doi:10.1007/s10811-018-1626-8
- Fisher, G. J., Wang, Z., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S., & Voorhees, J. J. (1997). Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *The New England Journal of Medicine*, 337(20), 1419-1429. doi:10.1056/nejm199711133372003
- Kim, M., & Park, H. J. (2016). Molecular mechanisms of skin aging and rejuvenation. In *Molecular mechanisms of the aging process and rejuvenation*. doi:10.5772/62983
- Kumar, D., Dhar, D. W., Pabbi, S., Kumar, N., & Walia, S. (2014). Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(2), 184-188.

- Liu, Q., Huang, Y., Zhang, R., Cai, T., & Cai, Y. (2016). Medical application of *Spirulina platensis* derived C-Phycocyanin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1-14. doi:10.1155/2016/7803846
- Madkour, F. F., Kamil, A. E.-W., & Nasr, H. S. (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 38(1), 51-57. doi:10.1016/j.ejar.2012.09.003
- Masaki, H. (2010). Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *Journal of Dermatology Science*, 58(2), 85-90. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.03.003
- Roupe, G. (2001). Skin of the aging human being. *Lakartidningen*, 98(10), 1091-1095.
- Safaei, M., Maleki, H., Soleimanpour, H., Norouzy, A., Zahiri, H. S., Vali, H., & Noghabi, K. A. (2019). Development of a novel method for the purification of C-phycocyanin pigment from a local cyanobacterial strain *Limnothrix* sp. NS01 and evaluation of its anticancer properties. *Scientific Reports*, 9(1), 1-16.
- Suganuma, K., Nakajima, H., Ohtsuki, M., & Imokawa, G. (2010). Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatology Science*, 58(2), 136-142. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.02.009
- Wu, H.-L., Wang, G.-H., Xiang, W.-Z., Li, T., & He, H. (2016). Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Properties*, 19(10), 2349-2362.

