

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỐNG ER-STRESS CỦA CAO CHIẾT LÁ MÓP GAI (*LASIA SPINOSA*) TRÊN DÒNG TẾ BÀO TUYẾN TUY MIN6

● NGUYỄN QUỐC CHÂU THANH - PHẠM DUY TOÀN - PHẠM QUỐC NHIÊN
- NGUYỄN TRỌNG TUÂN - VÕ THÀNH KHANG - NGUYỄN HỮU KHIÊM

TÓM TẮT:

Móp gai (*Lasia spinosa*) là một loại dược liệu dân gian được sử dụng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường tuýp 2. Tuy nhiên, các nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của nó đến nguyên nhân gây đái tháo đường vẫn còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, tác động của cao chiết lá Móp gai đến stress lưới nội chất sử dụng mô hình tế bào tuyến tụy (MIN6) kích thích bởi Tunicamycin (Tm) được khảo sát. Điều trị với cao chiết ngăn cản quá trình tự chết của tế bào và làm giảm đáng kể các gốc tự do ngoại sinh, nội sinh gây stress. Hơn thế nữa, cao chiết lá Móp gai ức chế biểu hiện của C/EBP-homologous protein (CHOP) góp phần bảo vệ tế chống lại ER-stress do Tm gây ra. Vì vậy, nghiên cứu đề xuất sử dụng lá Móp gai như một loại dược liệu tiềm năng hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến stress oxy hóa, đặc biệt là bệnh đái tháo đường tuýp 2.

Từ khóa: cao chiết, móp gai, tế bào, stress lưới nội chất, stress oxy hóa.

1. Đặt vấn đề

Stress lưới nội chất (Endoplasmic Reticulum stress, ER-stress) là một trong những hiện tượng đóng vai trò trung tâm trong cơ chế bệnh sinh của nhiều bệnh khác nhau như đái tháo đường tuýp 2, ung thư và các bệnh lý nghiêm trọng liên quan đến thoái hóa thần kinh [1]. Bên cạnh đó, ER-stress cũng liên quan đến stress oxy hóa gây ra quá trình chết của tế bào và suy giảm tiết insulin [2]. Do đó, chống ER-stress là một phần rất quan trọng trong việc kiểm soát sự tiến triển của các bệnh lý như vậy. Đáng chú ý, đái tháo đường tuýp 2 được đặc trưng bởi tình trạng kháng

insulin và rối loạn chức năng tiết insulin do tế bào trong tuyến tụy giữ vai trò chính. Một số nghiên cứu đã chỉ ra kháng insulin ngoại vi làm tăng đường huyết và cuối cùng dẫn đến bệnh đái tháo đường tuýp 2. Cụ thể, insulin được tiết ra để duy trì mức đường huyết ở trạng thái bình thường, nhưng kháng insulin do tế bào tuyến tụy sản xuất một lượng quá mức được gây ra bởi ER-stress [3]. Các liệu pháp can thiệp liên quan đến ER-stress và điều hòa đường huyết đang là phương pháp điều trị hứa hẹn cho các bệnh nhân đái tháo đường tuýp 2 [1]. Hơn thế nữa, với nguồn dược liệu phong phú ở nước ta, các phương pháp và bài

thuốc điều trị có nguồn gốc từ tự nhiên ngày càng được chú ý và trở thành xu hướng chung của thế giới, vì ít độc hại, ít tác dụng phụ hơn khi so sánh với các sản phẩm tân dược có trên thị trường.

Móp gai, tên khoa học *Lasia spinosa* (L.), là loại dược liệu được tìm thấy ở vùng Bảy Núi, An Giang. Các bài thuốc Đông y thường dùng vị thuốc trên để trị suy gan, vàng da do viêm gan, đặc biệt là hỗ trợ điều trị các dạng bệnh lý liên quan đến đường huyết, đái tháo đường tuýp 2. Tuy nhiên, các nghiên cứu chuyên sâu mang tính khoa học thực tiễn về các dược tính chỉ mới được công bố gần đây [4]. Vì vậy, giá trị dược liệu của Móp gai cần được khai thác triệt để với những bằng chứng khoa học cụ thể, nhằm khoa học hóa các bài thuốc vẫn thường được sử dụng trong dân gian. Trong nghiên cứu này, khảo nghiệm đánh giá hiệu quả của lá Móp gai trong việc chống ER-stress trên dòng tế bào tuyến tụy (MIN6) góp phần làm rõ cơ chế tác động của dược liệu đối với việc hỗ trợ điều trị đái tháo đường tuýp 2. Qua đó, nghiên cứu đề xuất sử dụng lá Móp gai như một loại dược liệu tiềm năng để phát triển các sản phẩm, thực phẩm hỗ trợ sức khỏe, hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Lá Móp gai (MG) được thu hái tại tỉnh An Giang và được định danh, lưu trữ tại bộ môn Hóa học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ, với mã số MG01.2022-CT31. Mẫu lá được tiến hành xử lý sơ bộ, phơi khô tự nhiên và xay thành bột. Mẫu bột khô được ngâm chiết nhiều lần với cồn 96°C ở nhiệt độ phòng, sau đó dịch chiết được cô quay và đông cô dưới áp suất thấp để thu được cao chiết. Cao chiết lá Móp gai được trữ ở nhiệt độ 4°C cho đến khi sử dụng trong các thí nghiệm.

2.2. Đánh giá khả năng kháng oxy hóa

Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết ethanol từ lá Móp gai được xác định theo phương pháp của Singleton và các cộng sự có điều chỉnh bổ sung [5]. Cụ thể, 100 μ L DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma Aldrich, Mỹ) và 100 μ L cao chiết ethanol của lá Móp gai (ở nồng độ cao chiết

từ 0 - 30 μ g/mL). Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối với thời gian 60 phút ở nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ quang phổ của DPPH ở bước sóng 517 nm. Vitamin C (FUJIFILM-Wako, Nhật Bản) được sử dụng như chất đối chứng dương.

2.3. Khảo sát độc tính tế bào và khả năng chống ER-stress

Tế bào MIN6 được cung cấp bởi Viện Kỹ thuật công nghệ Kyoto, Nhật Bản. Tế bào MIN6 được nuôi trong môi trường Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM; FUJIFILM-Wako, Nhật Bản) có bổ sung 10% huyết thai bò (FBS) và 1% penicillin-streptomycin (PS) trong tủ ủ tại nhiệt độ 37°C, độ ẩm 5% CO₂. Cao chiết được hòa tan trong 5% (v/v) Dimethyl sulfoxide (DMSO) và được pha loãng với DMEM theo nồng độ khảo sát (0 - 400 μ g/mL). Tế bào được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với mật độ 2x10⁶ tế bào/giếng, ủ 24 giờ trong cùng điều kiện thí nghiệm. Sau đó, tế bào được rửa với dung dịch đệm phosphate (PBS) và ủ với cao chiết có hoặc không có kích thích bằng 1 μ M Tunicamycin (Tm; Sigma Aldrich, Mỹ) trong 16 giờ. Độc tính tế bào được đánh giá bằng Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Molecular Technologies Inc., Mỹ). Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 450 nm.

Sản phẩm ROS sinh ra được đo bằng Cellular ROS assay Kit (Abcam, Nhật Bản). Sau khi kích thích, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, rửa với đệm PBS và nhuộm với 10 μ M 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH₂ - DA) trong 45 phút ở nhiệt độ 37°C theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Độ hấp thụ huỳnh quang được đo ở bước sóng 488/535 nm.

2.4. Khảo sát khả năng ức chế cytokine bằng qRT-PCR

Tế bào được tiến hành nuôi cấy tương tự với mật độ 2 x 10⁶ tế bào/giếng dưới sự hiện diện của cao chiết ở các nồng độ khác nhau trong đĩa 24 giếng, ủ 24 giờ, sau đó rửa với PBS và kích thích với 1 μ M Tm trong 16 giờ. Sau đó, tế bào được rửa với PBS, thêm vào 1 mL Trizol (Invitrogen; Mỹ) và được giữ -80°C cho đến khi phân tích. Tổng lượng RNA được ly trích và tinh sạch sử dụng Qiagen RNeasy Kit (Qiagen; Đức). Sau đó, DNA

bổ sung (cDNA) được tổng hợp bằng cách sử dụng Transcriptor Universal cDNA Master Mix (Roche, Đức) và SimpliAmp-Thermal Cycler (Life Technologies, Singapore) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Định lượng phản ứng PCR sử dụng FastStart Essential DNA Green Master Mix (Roche, Mannheim, Đức) và Light-Cycler 96 (Roche, Đức). Đoạn mỗi được thiết kế như sau: (CHOP) 5'- GCGACAGAGCCAGAATAACA-3', 5'- GATGCACTTCCTTCTGGAACA-3'; (β -actin) 5'- CCTGAGCGCAAGTACTCTGTGT-3', 5'- GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3'.

2.5. Thống kê

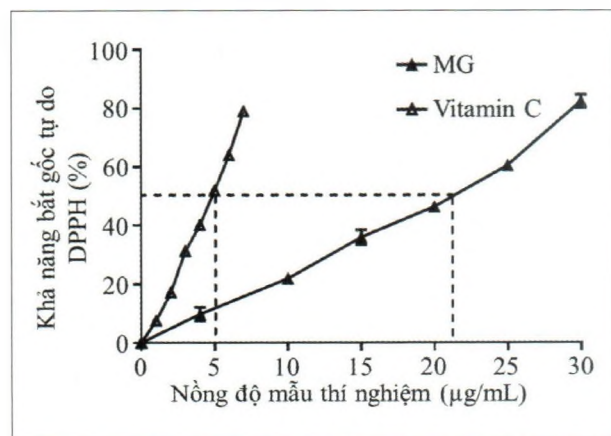
Kết quả phân tích được xử lý bằng Prism 8.0 (Graphpad, Mỹ). Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Nghiệm cứu sử dụng hàm thống kê one-way ANOVA. Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết

Stress oxy hóa xảy ra với nhiều hình thức khác nhau, nhưng chủ yếu là do sự mất cân bằng giữa gốc tự do và các chất chống oxy hóa tự sinh trong cơ thể. Các gốc tự do này có thể được tạo ra từ nguồn ngoại sinh hay nội sinh [6]. Vì vậy, một thử nghiệm kháng oxy hóa ngoại sinh là một bước khảo sát cần thiết cho bước đầu đánh giá hiệu quả chống stress oxy hóa. Tiềm năng kháng oxy hóa của cao chiết lá Móp gai được đánh giá qua khả năng bắt gốc tự do DPPH, được trình bày trong Hình 1.

Hình 1: Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết lá Móp gai



Nguồn: nhóm tác giả thực hiện

Kết quả cho thấy, hiệu quả bắt gốc tự do của cao chiết tăng theo nồng độ khảo sát và đạt giá trị $IC_{50} = 21,14 \mu\text{g/mL}$ tương đương với $5,38 \mu\text{g/mL}$ Vitamin C với cùng điều kiện khảo sát. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu trước đó với giá trị $IC_{50} = 17,25 \mu\text{g/mL}$ [7]. Hiệu quả kháng oxy hóa của cao chiết đã được báo cáo trong nghiên cứu trước đó là do sự hiện diện của các nhóm hợp chất polyphenol và flavonoid. Vì vậy, khảo nghiệm đã chứng minh tiềm năng kháng gốc oxy hóa ngoại sinh của cao chiết lá Móp gai.

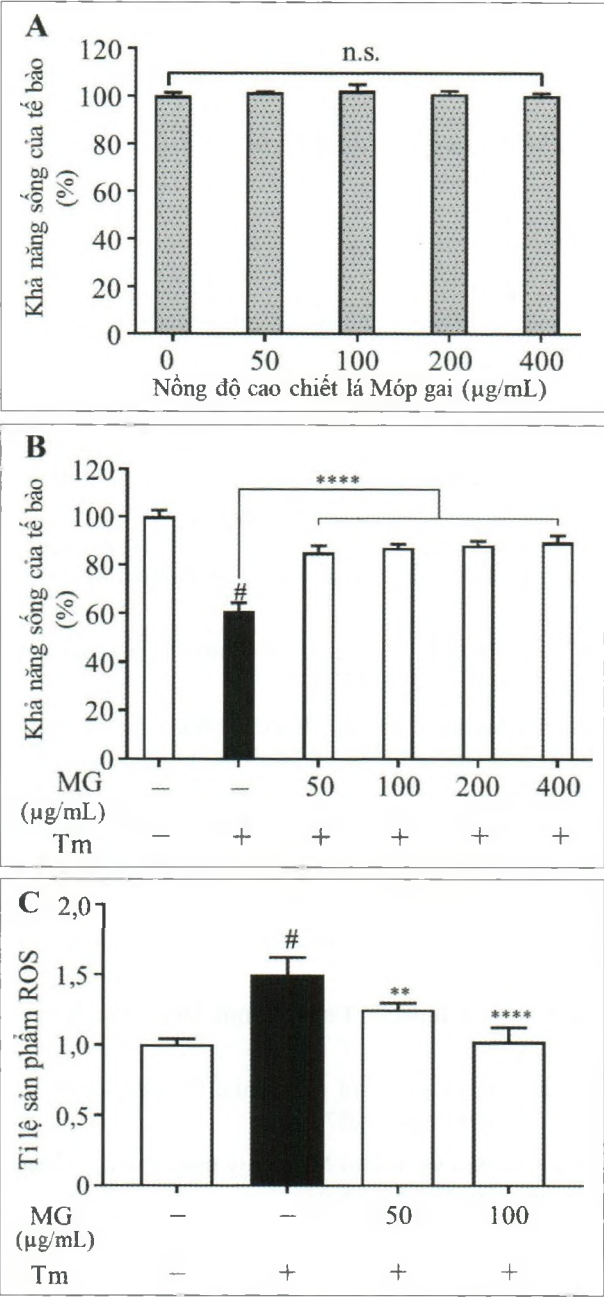
3.2. Đánh giá độc tính tế bào và chống ER-stress

Độc tính của cao chiết đối với tế bào được khảo sát ở các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy các nồng độ cao chiết (0 - 400 $\mu\text{g/mL}$) không gây độc trong điều kiện khảo sát (Hình 2A). Bên cạnh đó, khả năng gây độc đối với tế bào được ghi nhận khi tế bào bị kích thích với Tm. Tm gây nên ER-stress do sự ức chế quá trình glycosyl hóa protein liên kết với Nitơ dẫn đến rối loạn chức năng ty thể [8]. Chính vì thế, sự rối loạn trong chuỗi dẫn truyền điện tử qua màng ty thể gây mất cân bằng nội môi làm tăng cường tạo ra các gốc tự do (ROS; Reactive oxygen species) và thúc đẩy quá trình tự chết của tế bào [9]. Do đó, khả năng sống của tế bào bị giảm đáng kể so với mẫu đối chứng và được cải thiện khi được điều trị với các nồng độ của cao chiết lá Móp gai (Hình 2B). Đáng chú ý, tại nồng độ khảo sát 50 $\mu\text{g/mL}$ của cao chiết lá Móp gai làm tăng khả năng sống của tế bào trước tác nhân gây ER-stress. Kết quả này cho hiệu quả cao hơn so với các nghiên cứu trước đó đối với dịch chiết lá Xoài non (500 $\mu\text{g/mL}$) và cỏ Sỏi lá lớn hay Sỏi Đầu (0,1 mg/mL) [10,11]. Điều này cho thấy, hiệu quả đáng kể của cao chiết lá Móp gai góp phần bảo vệ tế bào β trước sự kích thích của Tm gây ra ER-stress.

Ngoài ra, sự hình thành sản phẩm ROS tăng lên khác biệt có ý nghĩa thống kê khi tế bào được kích thích với Tm. Kết quả cũng chỉ ra, điều trị với nồng độ cao chiết được chọn (50, 100 $\mu\text{g/mL}$) ức chế quá trình tạo thành các sản phẩm ROS (Hình 2C). Vì vậy, cao chiết lá Móp gai cũng góp phần bảo vệ tế bào trước sự hình thành các sản phẩm ROS liên quan đến quá trình stress oxy hóa nội sinh [12].

Hình 2: Ảnh hưởng của cao chiết lá Móp gai đến khả năng sống của tế bào và chống ER- stress.

A. Khả năng sống tế bào điều trị với cao chiết; B. Khả năng sống tế bào điều trị với cao chiết và kích thích với Tm; C. Khả năng ức chế sự hình thành các gốc tự do nội sinh.

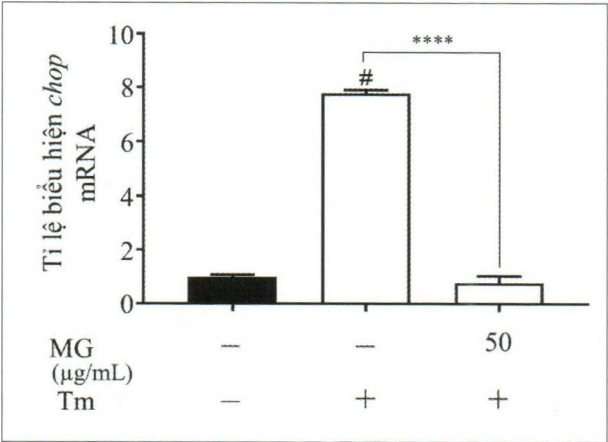


Ghi chú: Ghi chú: $p < 0,05$ (so với tế bào được nuôi trong điều kiện bình thường); **, $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$ (so với tế bào được kích thích với LPS); n. s.: không khác biệt.
Nguồn: nhóm tác giả thực hiện

3.3. Đánh giá khả năng ức chế ER-stress của cao chiết lá Móp gai

Biểu hiện của C/EBP-homologous protein (CHOP) là một trong những yếu tố quan trọng khi xảy ra ER-stress [13]. CHOP thay đổi trạng thái tích trữ các điện tử oxy hóa - khử dẫn đến thúc đẩy quá trình tự chết của các tế bào khi xảy ra căng thẳng mạng lưới nội chất [9]. Do đó, khảo sát biểu hiện của CHOP trong quá trình phiên mã là một trong những yếu tố đánh giá khả năng bảo vệ đối với tế bào β trước các tác nhân gây ER-stress.

Hình 3: Ảnh hưởng của cao chiết lá Móp gai đến biểu hiện của chop



Nguồn: nhóm tác giả thực hiện

Kết quả qRT-PCR cho thấy sự biểu hiện của CHOP tăng lên đáng kể so với mẫu đối chứng khi được kích thích với Tm nhưng giảm rõ rệt khi được điều trị với cao chiết ở nồng độ 50 µg/mL. Đáng chú ý, quá trình tự chết của tế bào do biểu hiện của CHOP khi xảy ra ER-stress cũng có liên quan đến quá trình thoái hóa thần kinh, hình thành các khối u hay thiếu máu cục bộ [14]. Vì vậy, kết quả đánh giá đã cho thấy tiềm năng của lá Móp gai thông qua ức chế biểu hiện của CHOP khi xảy ra ER-stress.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã chứng minh khả năng chống ER-stress của lá Móp gai thông qua khảo nghiệm trên mô hình tế bào MIN6 được kích thích bởi Tm. Kết quả đã làm rõ vai trò bảo vệ của cao chiết trước tác nhân gây ER-stress thúc đẩy quá trình tự chết của

tế bào. Bên cạnh đó, ảnh hưởng của cao chiết trong việc trung hòa các gốc tự do nội sinh và ngoại sinh đã góp phần đánh giá hiệu quả chống stress oxy hóa của cao chiết. Ngoài ra, khả năng ức chế biểu hiện CHOP đã làm sáng tỏ tác động được lý của lá Móp gai trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh liên

quan đến đái tháo đường type 2. Vì vậy, kết quả nghiên cứu làm cơ sở giải thích ở góc độ khoa học cho việc sử dụng lá Móp gai như một loại thảo dược dân gian hay phát triển một loại thực phẩm, sản phẩm hỗ trợ điều trị các loại bệnh liên quan an toàn và không gây tác dụng phụ ■

Lời cảm ơn:

Nghiên cứu được tài trợ từ đề tài Khoa học Công nghệ cấp cơ sở của Đại học Cần Thơ (mã số: T2022-31).

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. A.H. Schöenthal (2012). Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica*, 857516.
2. K.Z., R.J. Kaufman (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454, 455-462.
3. S.H. Back, R.J. Kaufman (2012). Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes, *Annual Review of Biochemistry*, 81, 767-793.
4. Tài, T.L., Linh, T.C., Linh, P.N., Trang, Đ.T.X (2021). Ảnh hưởng của cao chiết từ thân cây Móp gai (*Lasia spinosa*) đến hoạt tính của enzyme glucose-6-phosphatase ở gan và thận của chuột bị bệnh đái tháo đường. *TNU Journal of Science and Technology*, 226, 47-54.
5. Vernon L. Singleton, Rudolf Orthofer (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
6. G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto (2017). *Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity.
7. Thanh Q. C. Nguyen, Y.D.H.N. Tran Duy Binh, Tuan L. A. Pham, K.K., K.K. Dai Thi Xuan Trang, Trong Tuan Nguyen (2020). Anti-Inflammatory Effects of *Lasia spinosa* Leaf Extract in Lipopolysaccharide-Induced RAW 264.7 Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1-18.
8. L. Jackisch, A.M. Murphy, S. Kumar, H. Randeva, G. Tripathi, P.G. McTernan (2020). Tunicamycin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Mediates Mitochondrial Dysfunction in Human Adipocytes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105, 2905-2918.
9. Q. Chen, J. Thompson, Y. Hu, E.J. Lesnefsky (2022). Tunicamycin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Damages Complex I in Cardiac Mitochondria. *Life*, 12.
10. Bach, L.T., Dung, L.T., Tuan, N.T., Phuong, N.T. (2018). Protective effect of pancreatic β - cells MIN6 by some medicinal plants in the Mekong Delta. *Vietnam Journal of Chemistry*, 56(5), 637-641.
11. Lan, N.T.A, Trang, Đ.T.X. (2018). Khả năng kháng oxy hóa và bảo vệ tế bào MIN6 tùy tạng của dịch trích methanol lá xoài non (*Mangifera indica* L.). *Tạp chí Trường Đại học Cần Thơ*, 54, 85-93.
12. M. Schieber, N.S. Chandel (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24, 453-462.
13. H. Nishitoh (2012). CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *Journal of Biochemistry*, 151, 217-219.
14. Y. Li, Y. Guo, J. Tang, J. Jiang, Z. Chen (2014). New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 46, 629-640.

Ngày nhận bài: 24/12/2022

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 19/1/2023

Ngày chấp nhận đăng bài: 12/2/2023

Thông tin tác giả:

1. NGUYỄN QUỐC CHÂU THANH^{1*}

2. PHẠM DUY TOÀN¹

3. PHẠM QUỐC NHIÊN¹

4. NGUYỄN TRỌNG TUÂN¹

5. VÕ THÀNH KHANG¹

6. NGUYỄN HỮU KHIÊM¹

¹ Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ: nqcthanh@ctu.edu.vn

EVALUATING THE ANTI-ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS FROM *LASIA SPINOSA* LEAF EXTRACT USING PANCREATIC BETA β -CELL LINE

● NGUYEN QUOC CHAU THANH¹

● PHAM DUY TOAN¹

● PHAM QUOC NHIEN¹

● NGUYEN TRONG TUAN¹

● VO THANH KHANG¹

● NGUYEN HUU KHIEM¹

¹ College of Natural Sciences, Can Tho University

ABSTRACT:

Lasia spinosa, which is a widely used medicinal herb, is used to support the treatment of type 2 diabetes. However, studies about its influence on the cause of diabetes are still limited. This study aims to explore the effects of *Lasia spinosa* leaf extract on endoplasmic reticulum stress using a pancreatic β -cell line (MIN6) by Tunicamycin-stimulated. Pre-treatment with the extract inhibits cell apoptosis and significantly reduces exogenous and endogenous free radicals leading to stress. Moreover, the leaf extract suppresses the C/EBP-homologous protein (CHOP) expression, which contributes to cytoprotective activity against tunicamycin-induced ER stress. Therefore, the study proposes the use of *Lasia spinosa* leaf as a potential medicinal herb to support the treatment of diseases related to oxidative stress, especially type 2 diabetes.

Keywords: β -cell, er-stress, extract, *Lasia spinosa*, oxidative stress.