



Original Article

The Protective Effect of Ethyl Acetate Fraction and Bioactive Compounds of *Mimosa pudica* L. Leaves in Methylglyoxal-induced Glucotoxicity

Pham Thi Lan^{1,2}, Pham Thi Nguyet Hang², Bui Thanh Tung^{3,*}

¹Hanoi University of Business and Technology, 29A Vinh Tuy, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam

²National Institute of Medicinal Materials, 3B Quang Trung, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

³VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 06 September 2023

Revised 11 November 2023; Accepted 24 December 2023

Abstract: *Mimosa pudica* L. has been used as a traditional medicine to treat leprosy, dysentery, burning sensation, asthma, inflammation, fatigue, and blood diseases. This study aimed to evaluate the ethyl acetate (EtOAc) fraction and protocatechuic acid and syringic acid of *Mimosa pudica* L. leaves against methylglyoxal (MGO)- induced glucotoxicity. The inhibitory effects of EtOAc fraction and two compounds of *Mimosa pudica* L. on glucotoxicity in Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and inhibit Advanced glycation end products (AGEs) formation and also breaking effects on MGO-AGEs were measured. Our results demonstrated that EtOAc fraction and protocatechuic acid and syringic acid of *Mimosa pudica* L. leaves inhibit MGO-induced AGEs formation and break down MGO-AGEs, thus reducing glucotoxicity. EtOAc fraction and two bioactive compounds protocatechuic acid and syringic acid are promised to be effective in preventing or treating MGO-induced endothelial dysfunction.

Keywords: Advanced glycation end products (AGEs); Methylglyoxal (MGO); Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs); *Mimosa pudica* L.; ethyl acetate fraction; protocatechuic acid; syringic acid.

* Corresponding author.

E-mail address: tungbt.ump@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4576>

Tác dụng bảo vệ của phân đoạn etyl axetat và hợp chất của lá cây Xấu hổ trong nhiễm độc glucose do methylglyoxal gây ra

Phạm Thị Lan^{2,3}, Phạm Thị Nguyệt Hằng³, Bùi Thanh Tùng^{1,*}

¹Trường Đại học Kinh doanh và Công nghệ Hà Nội, 29A Vĩnh Tuy, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Dược liệu, 3B Quang Trung, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 06 tháng 9 năm 2023

Chỉnh sửa ngày 11 tháng 11 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 24 tháng 12 năm 2023

Tóm tắt: Cây Xấu hổ được dùng trong y học cổ truyền để hỗ trợ chữa các bệnh phong, kiết lý, cảm giác nóng rát, hen suyễn, viêm nhiễm, mệt mỏi và các bệnh về máu. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá phân đoạn etyl axetat (EtOAc) và hợp chất acid protocatechuic và acid syringic của lá cây Xấu hổ chống lại độc tính glucose do methylglyoxal (MGO) gây ra. Tác dụng ức chế của phân đoạn EtOAc và hợp chất của lá cây Xấu hổ đối với độc tính glucose trong tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người (HUVEC) và ức chế sự hình thành các sản phẩm cuối cùng của quá trình glycation (AGEs) cũng như tác dụng phá vỡ liên kết MGO-AGEs đã được thực hiện. Kết quả của chúng tôi cho thấy phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid protocatechuic và acid syringic của lá cây Xấu hổ có tác dụng ức chế sự hình thành AGEs do MGO gây ra và phá vỡ các liên kết MGO với các AGEs; do đó giảm độc tính với glucose. Phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid protocatechuic và acid syringic của lá cây Xấu hổ được chứng minh là có hiệu quả trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn chức năng nội mô do MGO gây ra.

Từ khóa: Các sản phẩm cuối cùng của quá trình glycation (AGEs); Methylglyoxal (MGO); Tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người (HUVECs); Cây Xấu hổ; phân đoạn etyl axetat; acid protocatechuic; acid syringic.

1. Mở đầu

Bệnh đái tháo đường là bệnh rối loạn chuyển hoá không đồng nhất, có đặc điểm tăng đường huyết do khiếm khuyết về tiết insulin, về tác động của insulin, hoặc cả hai. Tăng glucose mạn tính trong thời gian dài gây nên những rối loạn chuyển hoá carbohydrat, protein, lipid, gây tổn thương ở nhiều cơ quan khác nhau, đặc biệt ở tim và mạch máu, thận, mắt, thần kinh [1].

Các sản phẩm cuối cùng của quá trình glycation (Advanced glycation end products,

AGEs) là tên gọi chung của nhiều sản phẩm hình thành từ các hợp chất Amadori thông qua các phản ứng tách nước, chuyển vị, ngưng tụ và oxy-hoá [2-4]. AGEs cũng gây ra tổn thương tại các mô liên quan trực tiếp tới các biến chứng mạn tính của đái tháo đường. Một số nghiên cứu khác cho thấy các AGEs có thể làm giảm đáp ứng với insulin ở ngoại vi, tham gia việc phá huỷ các tế bào beta, kích thích sản sinh quá mức các tế bào miễn dịch và gây độc cho tế bào [5]. Những độc tính này do AGEs gây ra cũng được tìm thấy trên các loại tế bào khác như tế bào beta tuyến tụy, tế

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: tungbt.ump@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4576>

bào nội mô và tế bào gian mao mạch tại cầu thận (mesangial cells),... [3, 4].

Methyl glyoxal (MGO), một chất chuyển hoá hoạt động mạnh (highly reactive metabolite), là một tác nhân chính trong việc hình thành các AGEs. Sự hình thành MGO là kết quả của sự duy trì nồng độ glucose cao trong máu và các nghiên cứu đã chỉ ra rằng ở cả đái tháo đường típ 1 và típ 2 đều biểu hiện nồng độ cao của MGO và AGEs hình thành từ MGO. Nhiều nghiên cứu tiếp theo nhấn mạnh tầm quan trọng của MGO trong đái tháo đường và các biến chứng liên quan [6]. MGO được chuyển hoá chủ yếu từ quá trình thoái hoá phi enzym của triose phosphat, glyceraldehyd-3-phosphat và dihydroxyaceton-phosphat. Ngoài ra, MGO cũng được hình thành từ sự oxy hoá của aceton, quá trình dị hoá của threonin và sự thoái hoá của protein. Các phân tử này hoạt động rất mạnh và phần lớn phản ứng với arginin trên phân tử protein tạo thành argpyrimidin, hydroimidazon và tetrahydropyrimidin.

Một nghiên cứu trên các bệnh nhân mắc đái tháo đường có biến chứng thận chỉ ra mối tương quan thuận của nồng độ MGO trong huyết tương và tỉ lệ albumin/creatinin trong khi những biến đổi về mức lọc cầu thận lại tương quan nghịch đảo với nồng độ MGO trong suốt quá trình theo dõi. Nồng độ MGO cũng ảnh hưởng tới độ dày của màng trong mạch máu và sự tăng lên của áp lực máu trong mạch cho thấy mối liên hệ giữa MGO và các bệnh mạch máu lớn ở đái tháo đường. Mối liên hệ giữa các AGEs và các bệnh về tim mạch cũng được chỉ ra dựa trên những bằng chứng nghiên cứu về sự mất chức năng của thận, tình trạng viêm mức độ nhẹ, thay đổi cấu trúc và chức năng màng trong mạch và tính đàn hồi của mạch máu [7].

Cây Xấu hổ có tên khoa học: *Mimosa pudica* L. Cây mọc hoang ở nhiều nơi, thường trên phần đất khô cằn do có khả năng cố định đạm, xa khu dân cư đông đúc. Cây được tìm thấy ở các ven đường cái, bờ đê, bãi hoang ở nhiều nơi ở nước ta và một số nước ở khu vực nhiệt đới của Châu Mỹ, Châu Phi và Châu Á. Bộ phận dùng là toàn cây hoặc lá, rễ, có thể thu hái quanh năm, rửa sạch đất cát, thái mỏng, phơi hay sấy khô [8].

Nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy, cây Xấu hổ có chứa các hợp chất như phytosterol, acid amin, alkaloid, tanin, glycosid, acid béo [9]. Cao chiết của cây Xấu hổ cũng được chứng minh là hỗ trợ điều trị đái tháo đường, có hiệu quả giảm đường huyết và trọng lượng trên chuột béo phì bị đái tháo đường. Hơn nữa, nghiên cứu cũng chỉ ra tác dụng ức chế enzym α -glucosidase [10]. Nghiên cứu khác của Sutar và các cộng sự trên mô hình chuột bị đái tháo đường do alloxan đã chỉ ra hiệu quả làm giảm đáng kể nồng độ glucose trong máu sau khi sử dụng cao chiết cây Xấu hổ khi so với chất chuẩn là metformin [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu về khả năng ức chế độc tính glucose trên dòng tế bào HUVECs, ức chế sự hình thành AGEs do MGO gây ra và tác dụng đối với thử nghiệm MGO-AGEs breaker (phá vỡ MGO-AGEs) của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất được chiết xuất từ cao toàn phần của lá cây Xấu hổ, từ đó nghiên cứu về cơ chế hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường của cây Xấu hổ.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu là phân đoạn EtOAc được chiết từ cao toàn phần của lá cây Xấu hổ được thu hái tại Nam Định, Việt Nam vào tháng 12/2019 và hai hợp chất Acid protocatechuic và Acid syringic được phân lập từ phân đoạn EtOAc trong nghiên cứu trước đây của nhóm nghiên cứu.

Địa điểm thực hiện nghiên cứu tại Phòng thí nghiệm của giáo sư Sun Yeou Kim; Khoa Dược, Đại học Gachon (College of Pharmacy, Gachon University).

2.2. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với độc tính glucose trên dòng tế bào HUVECs

Thử nghiệm HUVECs-glucotoxicity do MGO (phép thử độc tính đường huyết của HUVECs thông qua MGO) là một phương pháp được sử dụng để đánh giá tác động độc hại của

methylglyoxal (MGO) lên tế bào HUVECs trong điều kiện đường huyết tăng cao. Trong phép thử này, tế bào HUVECs được đặt trong môi trường có nồng độ đường huyết tăng cao và sau đó tiếp xúc với MGO. MGO là một hợp chất có khả năng gây độc và có thể tác động tiêu cực lên tế bào, đặc biệt là tác động đến việc hoạt động của tế bào và sự sống còn của chúng. Bằng cách thực hiện phép thử này, có thể đo lường sự ảnh hưởng của MGO lên khả năng sống và chức năng của tế bào HUVECs, từ đó đánh giá tác động của đường huyết tăng cao và quá trình hình thành sản phẩm cuối của quá trình glycation (AGEs) đối với các tế bào này.

Nguyên lý

Phương pháp MTT được dựa trên nguyên tắc là MTT [3- (4,5- dimethylthiazol - 2- yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromid] tham gia phản ứng oxy hoá khử với ty thể của tế bào và tạo thành các formazan dạng tinh thể. Sau đó dùng một số dung dịch khác nhau để phá huỷ màng tế bào đồng thời hoà tan các tinh thể formazan và đo độ hấp thụ quang học của các dung dịch này [12].

Cách tiến hành

Thí nghiệm được thực hiện dựa trên những thông số về nồng độ của AG (aminoguanidin) và MGO (mô tả trong công bố của của Sin Hee Park và cộng sự một số thay đổi nhỏ [13], cụ thể như sau:

+ Các dòng tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng có mật độ $1,0 \times 10^4$ tế bào/giếng, với môi trường nuôi cấy là EGM-2, 4% FBS (môi trường tăng trưởng tế bào nội mô, chứa 4% huyết thanh bào thai bò), ủ ở nhiệt độ 37 °C, 5% CO₂.

+ Sau 24 giờ nuôi cấy, các tế bào sẽ được xử lý trước với AG (1 mM) và mẫu thử ở các nồng độ 25, 50 µg/mL trong 1 giờ.

+ Các tế bào tiếp tục được xử lý với MGO (400 µM) trong 24 giờ.

+ Dung dịch MTT được bổ sung vào các giếng với nồng độ 0,1 mg/mL và tiếp tục ủ trong 2 giờ.

+ DMSO được thêm vào các giếng với nồng độ 100 µL/giếng và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 570 nm trên thiết bị Microplate Reader.

Cách đánh giá kết quả

Tác dụng bảo vệ tế bào được đánh giá thông qua thành phần phần trăm của tế bào sống sót được xác định bằng cách so độ hấp thụ ở giếng thử nghiệm với độ hấp thụ của giếng đối chứng. Mỗi thử nghiệm có độ lặp lại 3 lần.

$$\% \text{ tế bào sống sót} = (A_i/A_c) \times 100$$

Trong đó: A_i: độ hấp thụ của mẫu thử;

A_c: độ hấp thụ của mẫu trắng (chỉ có tế bào trong môi trường nuôi cấy).

Tác dụng bảo vệ tế bào của dịch chiết được so sánh với chất chuẩn dương AG (1 mM).

2.3. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế sự hình thành AGEs do MGO gây ra

Thử nghiệm hình thành Advanced Glycation End Products (AGEs) do MGO gây ra (MGO-induced AGEs formation assay) là một phương pháp được sử dụng để đo lường quá trình hình thành Advanced Glycation End Products (AGEs) do tác động của methylglyoxal (MGO). MGO, một hợp chất có khả năng gây độc, được sử dụng để tác động lên các protein, như Bovine Serum Albumin (BSA), trong điều kiện được tạo ra để tương tác không enzym hóa giữa đường và protein. Quá trình này dẫn đến hình thành AGEs, các sản phẩm cuối của quá trình glycation. Thử nghiệm hình thành AGEs do MGO gây ra sử dụng để đo lường mức độ hình thành AGEs dưới tác động của MGO, và thông qua việc xem xét sự thay đổi trong các đặc điểm của protein, chẳng hạn như cấu trúc, hoạt tính, và tính chất sinh hóa. Kết quả của phép thử này có thể cung cấp thông tin về khả năng của mẫu thử trong việc ức chế hoặc giảm thiểu sự hình thành AGEs gây hại.

Thí nghiệm đánh giá tác dụng ức chế sự hình thành AGEs của phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất được thực hiện như sau:

Cách tiến hành

Hoạt tính ức chế sự hình thành AGEs được đánh giá theo phương pháp của Sin Hee Park và cộng sự [13] bao gồm các bước:

+ MGO (2 mM) được thêm vào các ống chứa BSA (5 mg/ml) trong dung dịch đệm PBS, pH 7,4 chứa 0,02% sodium azid.

+ Thêm vào mỗi ống mẫu thử với các nồng độ là 25 và 50 µg/mL và ủ trong 7 ngày ở 37 °C và tránh ánh sáng.

+ Sự hình thành AGEs được xác định bằng phân tích huỳnh quang ở bước sóng kích thích/phát ra là 370 nm/440 nm trên máy Multilabel Plate Reader.

Cách đánh giá kết quả

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả biểu thị thông qua phần trăm ức chế được tính bằng công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = (A_c - A_t) / A_c \times 100$$

Trong đó: A_t : kết quả đo của mẫu thử;

A_c : kết quả đo của mẫu đối chứng âm (chỉ chứa MGO).

Khả năng ức chế của mẫu thử được đối chứng với aminoguanidin (AG) ở nồng độ 1 mM.

2.4. Phương pháp đánh giá tác dụng của phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất đối với thí nghiệm MGO-AGEs breaker (phá vỡ MGO-AGEs)

Thử nghiệm MGO-AGEs breaker (phá vỡ MGO-AGEs) là một phương pháp được sử dụng để đánh giá khả năng của mẫu thử trong việc phá vỡ liên kết giữa Advanced Glycation End Products (AGEs) được hình thành từ methylglyoxal (MGO) và các phân tử protein. AGEs là các sản phẩm cuối của quá trình glycation không enzym hóa, trong đó các phân tử đường và protein tương tác trong điều kiện đường huyết cao. MGO, một hợp chất gây độc, thường là một tác nhân chính góp phần vào quá trình hình thành AGEs. Việc ngăn chặn hoặc phá vỡ liên kết giữa MGO và protein có thể có tác dụng giảm thiểu sự hình thành AGEs và ngăn chặn tác động xấu của chúng đối với cơ thể. Phép thử MGO-AGEs breaker là một cách để đánh giá khả năng của các mẫu thử trong việc giảm thiểu hoặc loại bỏ các liên kết MGO-AGEs đã hình thành. Điều này có thể thể hiện khả năng ức chế hoặc đảo ngược tình trạng tương tác không mong muốn giữa MGO và protein, từ đó có thể giúp

bảo vệ các cơ quan và mô từ tác động tiêu cực của AGEs.

Tác dụng phá vỡ sự liên kết MGO-AGEs của phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp trinitrobenzen sulfonat acid (TNBSA) theo quy trình được sửa đổi một chút so với phương pháp của Sin Hee Park và cộng sự [13]. Dung dịch MGO-BSA (1 mg/mL) được trộn với mẫu thử (25 và 50 µg/ml), AG (1,0 mM), sau đó ủ trong vòng 24 giờ, tại 37 °C. Sau khi ủ xong, thêm 4% NaHCO₃ (pH 8,5) và 0,1% TNBSA và ủ tiếp 2 giờ tại 37 °C. Sau đó, thêm 10% sodium dodecyl sulfat (SDS) và 1 N HCl. Tiếp theo, khả năng phá vỡ liên kết MGO-AGE của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic được đo trên máy đọc đĩa tại bước sóng 340 nm (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tác dụng của mẫu thử được so sánh với chất chuẩn dương AG (1mM).

2.5. Xử lý số liệu

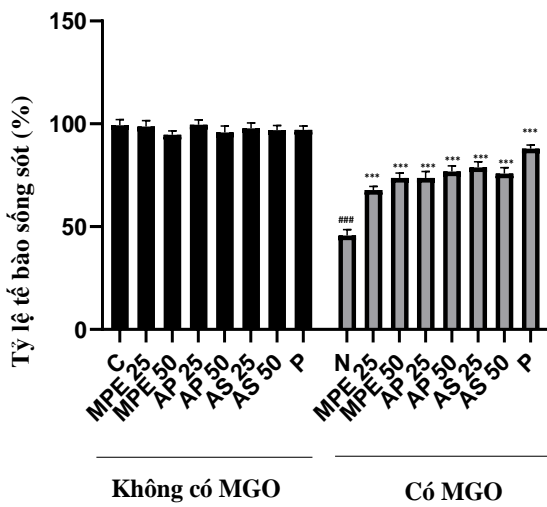
Số liệu được xử lý và thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0. Đối với các số liệu thuộc phân phối chuẩn, kết quả được biểu diễn dưới dạng $X \pm SD$ (X: giá trị trung bình, SD: độ lệch chuẩn). Dùng T-test để so sánh kết quả giữa các lô thử và lô chứng. Phân tích kết quả bằng phần mềm SPSS 20.0, sự khác biệt giữa các nhóm được cho là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Kết quả đánh giá tác dụng bảo vệ của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với độc tính methylglyoxal (MGO)

Để nghiên cứu tác dụng bảo vệ của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic đối với nhiễm độc glucose do MGO gây ra, thí nghiệm MTT đã được thực hiện để đánh giá về kết quả về khả năng sống của tế bào. Như được trình bày trong Hình 1, các tế bào HUVEC thể hiện bị ức chế đáng kể về khả năng

sống của tế bào sau khi xử lý MGO (400 μ M). Trong khi đó, sự ức chế tác dụng gây độc tế bào của MGO đã được quan sát thấy trong các tế bào khi được điều trị trước bằng phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic thông qua tỷ lệ tăng số lượng tế bào sống sót. Tuy nhiên, tác dụng ức chế của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic thấp hơn so với nhóm đối chứng dương được điều trị bằng AG với liều lượng 1 mM.



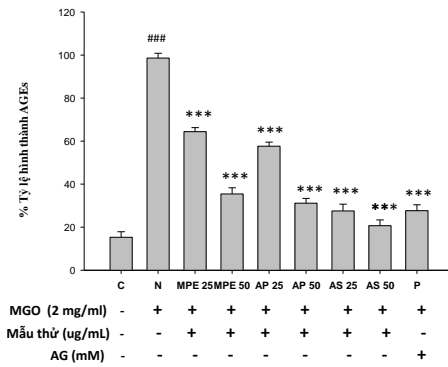
Hình 1. Tỷ lệ sống sót của tế bào HUVECs sau khi được điều trị với phân đoạn EtOAc và hai hợp chất và aminoguanidin trong hai trường hợp có và không có MGO.

Ghi chú: (C) Đối chứng sinh lý; (MPE 25) Phân đoạn EtOAc (25 μ g/mL); (MPE 50) Phân đoạn EtOAc (50 μ g/mL); (AP 25) Hợp chất acid protocatechuic (25 μ g/mL); (AP 50) Hợp chất acid protocatechuic (50 μ g/mL); (AS 25) Hợp chất acid syringic (25 μ g/mL); (AS 50) Hợp chất acid syringic (50 μ g/mL); (P) Aminoguanidin (1 mM); (N) MGO (400 μ M); Kết quả tỷ lệ phần trăm sống sót của tế bào được trình bày dưới dạng trung bình \pm SD của ba thí nghiệm độc lập. (### p < .001 so với nhóm C, *** p < .001 so với nhóm N).

3.2. Tác dụng ức chế của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với sự hình thành AGEs

Các cao chiết từ dược liệu và các hợp chất tự nhiên thường được coi là có tác dụng tốt đối với

bệnh đái tháo đường và AGEs. Chúng tôi giả thiết rằng phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic có khả năng ức chế hình thành AGEs và thử nghiệm giả thiết này bằng cách thực hiện phép thử hình thành AGE. BSA được ủ với MGO trong sự có mặt hoặc không có phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic và aminoguanidin (AG) là chứng dương. Như trình bày trong Hình 2, sự hình thành AGEs do MGO đã giảm đáng kể do tác dụng của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất mẫu thử theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Hợp chất acid syringic thể hiện tác dụng ức chế hình thành AGEs tương đương với chứng dương AG.



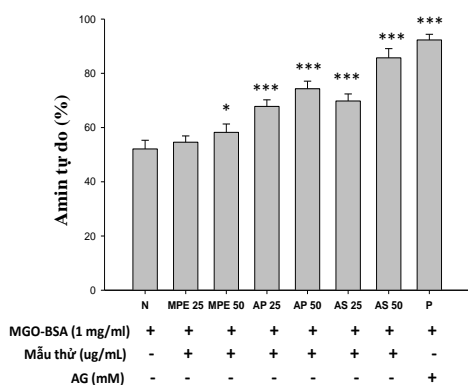
Hình 2. Khả năng ức chế hình thành AGEs do MGO gây ra sau khi điều trị bằng của các mẫu thử.

Ghi chú: (C) control; (N) MGO (2 mM); (MPE 25) Phân đoạn EtOAc (25 μ g/mL); (MPE 50) Phân đoạn EtOAc (50 μ g/mL); (AP 25) Hợp chất acid protocatechuic (25 μ g/mL); (AP 50) Hợp chất acid protocatechuic (50 μ g/mL); (AS 25) Hợp chất acid syringic (25 μ g/mL); (AS 50) Hợp chất acid syringic (50 μ g/mL); (P) Aminoguanidin (1 mM). Giá trị được trình bày dưới dạng trung bình \pm SD của ba thử nghiệm độc lập. (***) p < 0,001 so với nhóm N chỉ có MGO và ### p < 0,001 so với nhóm chứng sinh lý C).

3.3. Kết quả tác dụng của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với thử nghiệm MGO-AGEs breaker (phá vỡ MGO-AGEs)

Trong bệnh đái tháo đường và các biến chứng, sự ly giải của AGEs có vai trò quan trọng trong quá trình điều trị. Phép thử TNBSA được sử dụng để kiểm tra khả năng phá vỡ liên kết của

phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic đối với các AGEs đã hình thành thông qua việc đo lường lượng glycation còn lại. Mẫu thử hoặc chứng dương được trộn với AG dung dịch MGO-BSA (1 mg/mL) và ủ trong 24 giờ. Sự giảm đáng kể của amin tự do đã được quan sát sau quá trình ủ MGO và BSA (Hình 3). Tuy nhiên, việc điều trị với phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic ở liều 25 và 50 µg/mL đã dẫn đến sự gia tăng tỷ lệ amin tự do và khôi phục lại mức amin của MGO-BSA sau 24 giờ, gây ra sự phá vỡ của các AGEs. Ngoài ra, hợp chất acid syringic ở nồng độ 50 µg/mL đã gây ra hiệu ứng phá vỡ mạnh gần tương đương đối với AGE so với đối chứng dương AG.



Hình 2. Khả năng phá vỡ AGEs của các mẫu thử được nghiên cứu thông qua số lượng amin tự do sinh ra sau phản ứng MGO-BSA.

Ghi chú: (N) MGO-BSA (1 mg/ml); (MPE 25) Phân đoạn EtOAc (25 µg/mL); (MPE 50) Phân đoạn EtOAc (50 µg/mL); (AP 25) Hợp chất acid protocatechuic (25 µg/mL); (AP 50) Hợp chất acid protocatechuic (50 µg/mL); (AS 25) Hợp chất acid syringic (25 µg/mL); (AS 50) Hợp chất acid syringic (50 µg/mL); (P) Aminoguanidin (1 mM). Giá trị được trình bày dưới dạng trung bình ± SD của ba thử nghiệm độc lập. (***) p < 0,001 so với nhóm N và ** p < 0,05 so với nhóm N).

4. Bàn luận

Nghiên cứu của Hiệp hội đái tháo đường thế giới (IDF) dự đoán số người mắc bệnh đái tháo

đường típ 2 sẽ tăng lên 1,31 tỷ người vào năm 2050 [14]. Bệnh đái tháo đường có thể sẽ là gánh nặng bệnh tật toàn cầu, và không quốc gia nào thoát khỏi đại dịch này. Theo ước tính, Việt Nam có khoảng 57.200 tử vong/1 năm liên quan tới đái tháo đường hoặc 1.100 tử vong do đái tháo đường/1 tuần. Tăng glucose máu mạn tính trong thời gian dài ở bệnh nhân đái tháo đường típ 2 gây nên những rối loạn chuyển hóa carbohydrat, protein, lipid, gây tổn thương ở nhiều cơ quan khác nhau, đặc biệt ở tim và mạch máu, thận, mắt, thần kinh và biến chứng suy thận. Vì vậy, việc nghiên cứu và tìm ra những thuốc, dược liệu có tác dụng điều trị và ngăn ngừa các biến chứng ở bệnh nhân đái tháo đường típ 2 đặc biệt rất quan trọng và có ý nghĩa thực tiễn.

Tình trạng tăng đường huyết mạn tính trong đái tháo đường gây ra những độc tính nghiêm trọng trên tế bào, kích hoạt sự chết theo chu trình của tế bào và là nguyên nhân dẫn đến những biến chứng nguy hiểm của căn bệnh này. Kiểu hình biệt hóa của tế bào β được duy trì nhờ sự kích thích sinh lý ổn định của glucose, và độc tính với glucose (glucotoxicity) được định nghĩa là tác động độc hại lên kiểu hình của tế bào β khi tiếp xúc kéo dài hoặc liên tục với nồng độ glucose cao trong các nghiên cứu *in vitro* cũng như *in vivo*. Mức tăng đường huyết ở bệnh đái tháo đường típ 2 dẫn đến nhiễm độc đường [15]. Thông qua phương pháp MTT, việc sử dụng phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic ở các nồng độ khác nhau cho thấy những hiệu quả đáng kể trong cải thiện tình trạng gây độc cho tế bào của MGO, tác nhân chính xuất hiện ở các quá trình sản sinh AGEs khi đường huyết tăng trong một thời gian dài.

Tiến trình sản xuất và tích lũy AGEs được quan sát thấy trong quá trình lão hóa cũng như bệnh đái tháo đường với tốc độ nhanh. Các nghiên cứu cho thấy sự tương tác giữa AGEs và thụ thể AGEs (RAGE) đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của các biến chứng mạch máu ở bệnh đái tháo đường do quá trình tạo stress oxy hóa trong các loại tế bào khác nhau liên quan đến kích thích viêm mạch máu, huyết khối và kích hoạt tiểu cầu [2-4]. Ngoài ra, AGEs có thể chịu trách nhiệm đến sự ổn định fibrin và

kết tập tiểu cầu, dẫn đến khuynh hướng hình thành huyết khối và do đó thúc đẩy bệnh võng mạc ở bệnh đái tháo đường. Hơn nữa, sự tích tụ AGEs như pentosidin, malonyldialdehyd, lysin và carboxymethyl lysin (CML) trong màng đáy cầu thận dày lên, chất nền trung mô mở rộng và tổn thương dạng nốt của bệnh tiến triển dẫn đến tác dụng đáng chú ý của AGEs đối với bệnh thận đái tháo đường [16]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, việc điều trị bằng phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đã ức chế sự hình thành cũng như thể hiện khả năng phá vỡ AGE-MGO. Glycation gây ra bởi MGO dẫn đến giảm các amin tự do, nhưng phân đoạn EtOAc và hai hợp chất có thể phá vỡ AGEs và do đó, làm sự gia tăng đáng kể của các amin tự do [17]. Tác dụng của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với AGEs góp phần giải thích cơ chế phân tử của đặc tính chống đái tháo đường của loài thực vật này. Trong nghiên cứu sàng lọc các hợp chất tự nhiên của cây Xấu hổ, chúng tôi nhận thấy có nhiều hoạt chất tự nhiên flavonoid như acid ferulic acid, apigenin, catechin, caffeic acid, naringenin, và quercetin. Các hợp chất này có thể là các hoạt chất mang lại tác dụng chống độc glucose và hình thành và tích lũy AGE của cây Xấu hổ [18]. Catechin, apigenin và quercetin xuất hiện trong cao chiết cây Xấu hổ đều được chứng minh là có khả năng bắt giữ các MGO để tạo thành phức hợp với MGO. Acid ferulic, một dẫn xuất của acid cinnamic, nổi tiếng với tác dụng chống viêm và khả năng hoạt động như chất ức chế AGEs. Acid ferulic làm giảm AGEs và làm giảm hàm lượng protein carbonyl, cấu trúc β amyloid (amyloid cross β -structure,) và fructosamin. Do đó, acid ferulic được coi là một tác nhân hiệu quả chống lại stress oxy hóa và glycation protein liên quan đến việc ngăn ngừa các bệnh lý qua trung gian AGEs trong các biến chứng đái tháo đường [19, 20]. Người ta phát hiện ra rằng apigenin có khả năng ức chế hình thành AGEs bằng cách bắt giữ trực tiếp MGO và tạo ra phức hợp apigenin-MGO. Apigenin ức chế sự hình thành các loại gốc oxy hóa phản ứng và đẩy lùi sự biểu hiện của các phân tử bám dính và các cytokin tiền viêm, ngăn ngừa viêm và stress oxy

hóa do AGEs gây ra trên tế bào HUVEC. Cơ chế bảo vệ của apigenin có thể dựa trên ức chế đường truyền tín hiệu ERK (extracellular-signal-regulated kinase) 1/2/đường truyền yếu tố phiên mã NF- κ B, mà được kích hoạt bởi tương tác AGEs-RAGE, cũng như kích thích đường truyền ERK/chuyển đổi tác nhân (erythroid-derived 2)-like 2, dẫn đến điều chỉnh tăng biểu hiện các phân tử bảo vệ chống oxy hóa [21]. Các kết quả từ nghiên cứu của Zhu và các cộng sự cho thấy việc điều trị bằng catechin giúp cải thiện đáng kể tình trạng rối loạn chức năng thận ở mô hình chuột mắc bệnh đái tháo đường típ 2 thông qua việc giảm sự hình thành AGEs và các cytokin tiền viêm do trung hòa các MGO. Hơn nữa, các tế bào nội mô trong điều kiện đường huyết cao được điều trị bằng catechin đã thể hiện sự ức chế tín hiệu tế bào và khả năng trung hòa MGO [22]. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã được chứng minh rằng việc điều trị bằng acid caffeic và naringenin kết hợp với các thành phần khác đã ức chế đáng kể quá trình hình thành Advanced Glycation End Products (AGEs) [17, 23]. Thêm vào đó, quercetin cũng có khả năng ức chế quá trình hình thành AGEs) thông qua việc đồng thời tạo phức với MGO. Vùng 6 và 8 của vòng A của polyphenol được cho là đảm nhiệm việc trung hòa MGO và phá vỡ các liên kết của AGEs [17, 24]. Hơn thế nữa, quercetin thể hiện khả năng ức chế hình thành AGEs trong phản ứng BSA-MGO, khi MGO gây ra quá trình glycation albumin [24].

5. Kết luận

Phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất acid protocatechuic và acid syringic có thể làm giảm độc tính glucose và rối loạn chức năng chuyển hóa do MGO gây ra liên quan đến các đích AGEs trên dòng tế bào HUVEC. Đây có thể là cơ chế tác dụng về khả năng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường của cây Xấu hổ. Các nghiên cứu sâu hơn cần được thực hiện để làm rõ các cơ chế tác dụng khác của cây Xấu hổ.

Tài liệu tham khảo

- [1] Ministry of Health, Guidelines for Diagnosis and Treatment of Type 2 Diabetes, Decision, No. 5481, 2020 (in Vietnamese).
- [2] K. Nowotny, Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus, *Biomolecules*, Vol. 5, No. 1, 2015, pp. 194-222, <https://doi.org/10.3390/biom5010194>.
- [3] M. Yamamoto, T. Sugimoto, Advanced Glycation End Products, Diabetes, and Bone Strength, *Current Osteoporosis Reports*, Vol. 14, No. 6, 2016, pp. 320-326, <https://doi.org/10.1007/s11914-016-0332-1>.
- [4] S. I. Yamagishi, Role of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Receptor for AGEs (RAGE) in Vascular Damage in Diabetes, *Experimental Gerontology*, Vol. 46, No. 4, 2011, pp. 217-224, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.11.007>.
- [5] H. Vlassara, J. Uribarri, Advanced Glycation end Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both, *Current Diabetes Reports*, Vol. 14, No. 1, 2014, pp. 1-10.
- [6] C. G. Schalkwijk, C. D. A. Stehouwer, Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarbonyl Compound, in Diabetes, Its Vascular Complications, and Other Age-related Diseases, *Physiological Reviews*, Vol. 100, No. 1, 2020, pp. 407-461, <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2019>.
- [7] S. Brings, T. Fleming, M. Freichel, M. U. Muckenthaler, S. Herzig, P. P. Nawroth, Dicarbonyls and Advanced Glycation End-Products in the Development of Diabetic Complications and Targets for Intervention, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 185, 2017, pp. 984, <https://doi.org/10.3390/ijms18050984>.
- [8] D. T. Loi, Vietnamese Medicinal Plants and Herbs, Place, Published 2004 (in Vietnamese).
- [9] H. Ahmad, S. Sehgal, A. Mishra, R. Gupta, *Mimosa Pudica* L.(Laajvanti): An Overview, *Pharmacognosy Reviews*, Vol. 612, 2012, pp. 115, <https://doi.org/10.4103/0973-7847.99945>.
- [10] S. T. Tasnuva et al., α -glucosidase Inhibitors Isolated From *Mimosa Pudica* L., *Natural Product Research*, Vol. 3310, 2019, pp. 1495-1499, <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1419224>.
- [11] N. G. Sutar, U. N. Sutar, B. C. Behera, Antidiabetic Activity of the Leaves of *Mimosa Pudica* Linn. in Albino Rats, *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, Vol. 3, No. 1, 2009, pp. 123-126.
- [12] T. V. Hien, C. Q. Truong, T. T. Loan, N. D. Dung, Applying MTT Technique to Evaluate the Protective Effect of Rat Spleen Cells Subjected to Oxidative Stress of Polygonum and Chrysanthemum Extracts, *Journal of Medicinal Materials*, Vol. 51, 2005, pp. 23-25 (in Vietnamese).
- [13] S. H. Park, M. H. Do, J. H. Lee, M. Jeong, O. K. Lim, S. Y. Kim, Inhibitory Effect of *Arachis hypogaea* (Peanut) and Its Phenolics Against Methylglyoxal-derived Advanced Glycation End Product Toxicity, *Nutrients*, Vol. 911, 2017, pp. 1214, <https://doi.org/10.3390/nu9111214>.
- [14] I. D. Atlas, IDF Atlas 10th Edition, International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas, 2021.
- [15] M. Bensellam, D. R. Laybutt, J. C. Jonas, The Molecular Mechanisms of Pancreatic β -cell Glucotoxicity: Recent Findings and Future Research Directions, *Mol Cell Endocrinol*, Vol. 3641, No. 2, 2012, pp. 1-27, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.08.003>.
- [16] S. I. Yamagishi, Role of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Receptor for AGEs (RAGE) in Vascular Damage in Diabetes, *Exp Gerontol*, Vol. 464, 2011, pp. 217-224.
- [17] M. H. Do et al., Lespedeza Bicolor Ameliorates Endothelial Dysfunction Induced by Methylglyoxal Glucotoxicity, *Phytomedicine*, Vol. 36, 2017, pp. 26-36, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.005>.
- [18] P. T. Lan, N. T. N. Huyen, S. Y. Kim, P. T. N. Hang, B. T. Tung, Phytochemical Analysis and Protective Effect of Ethanolic Extract of *Mimosa Pudica* Linn, on Methylglyoxal-induced glucotoxicity, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol. 119, 2021, pp. 93-101, <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.110911>.
- [19] B. Dariya, G. P. Nagaraju, Advanced Glycation End Products in Diabetes, Cancer and Phytochemical Therapy, *Drug Discov Today*, Vol. 259, 2020, pp. 1614-1623, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.07.003>.
- [20] W. Sompong, A. Meeprom, H. Cheng, S. Adisakwattana, A Comparative Study of Ferulic Acid on Different Monosaccharide-mediated Protein Glycation and Oxidative Damage in Bovine Serum Albumin, *Molecules*, Vol. 1811, 2013, pp. 13886-13903, <https://doi.org/10.3390/molecules181113886>.
- [21] Q. Zhou, K. W. Cheng, J. Gong, E. T. Li, M. Wang, Apigenin and Its Methylglyoxal-adduct Inhibit Advanced Glycation End Products-induced Oxidative Stress and Inflammation in Endothelial Cells, *Biochem Pharmacol*, Vol. 166, 2019,

- pp. 231-241,
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.05.027>.
- [22] D. Zhu et al., (+)-Catechin Ameliorates Diabetic Nephropathy by Trapping Methylglyoxal in Type 2 Diabetic Mice, *Mol Nutr Food Res*, Vol. 5812, 2014, pp. 2249-2260,
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201400533>.
- [23] A. Gugliucci, D. H. M. Bastos, J. Schulze, M. F. F. Souza, Caffeic and Chlorogenic Acids in *Ilex Paraguariensis* Extracts Are the Main Inhibitors of AGE Generation by Methylglyoxal in Model Proteins, *Fitoterapia*, Vol. 806, 2009, pp. 339-344,
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.04.007>.
- [24] X. Li, T. Zheng, S. Sang, L. Lv, Quercetin Inhibits Advanced Glycation End Product Formation by Trapping Methylglyoxal and Glyoxal, *J Agric Food Chem*, Vol. 6250, 2014, pp. 12152-12158,
<https://doi.org/10.1021/jf504132x>.