

Bước đầu nghiên cứu đáp ứng của thụ thể Constitutive Androstane với dịch chiết Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*)

Hoàng Thị Trang¹, Hoàng Thị Phương¹, Phạm Thị Thu Hương²,
Mai Châu Phương³, Đầu Bảo Ngọc³, Trần Tiến Thịnh³, Phạm Thị Dậu^{1,*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

²Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein,

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Trung học Phổ thông Chuyên Lam Sơn, 88 Hàn Thuyên, Thanh Hóa

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Đái tháo đường/tiểu đường là nhóm bệnh rối loạn chuyển hóa với những biến chứng nguy hiểm, đang là mối lo của toàn xã hội. Bên cạnh các phương pháp điều trị bằng insulin, dược lý và liệu pháp ăn kiêng, dân gian từ lâu đã biết sử dụng một số loài cây để hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường. Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) được biết đến như một cây thuốc quý trong hỗ trợ điều trị tiểu đường, điều hòa huyết áp và giảm mỡ máu, được sử dụng dưới dạng trà hoặc viên nén. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy thụ thể tế bào Constitutive Androstane (CAR) có khả năng đáp ứng với nhiều phân tử ngoại lai, có vai trò quan trọng trong việc cải thiện bệnh tiểu đường và béo phì. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu đáp ứng của CAR với dịch chiết giảo cổ lam làm cơ sở để nghiên cứu vai trò của CAR trong cải thiện bệnh tiểu đường bằng dịch chiết này. Kết quả ban đầu cho thấy, sự biểu hiện của CAR và gen đích của nó là CYP2B6 trong tế bào HepG2 đã được tăng cường lần lượt khoảng 9,8 và 3,8 lần khi xử lý với dịch chiết giảo cổ lam (1µg/ml).

Từ khóa: Đái tháo đường/tiểu đường, Giảo cổ lam, thụ thể Constitutive Androstane (CAR).

1. Giới thiệu

Đái tháo đường/tiểu đường là nhóm bệnh rối loạn chuyển hóa với những biến chứng nguy hiểm như: bệnh tim mạch, tai biến mạch máu não, mù mắt, suy thận,... là nguyên nhân chính gây tử vong ở người bệnh [1]. Những năm gần đây, số người mắc bệnh tiểu đường đang gia

tăng với tốc độ ngày càng cao, do đó nó đang thực sự trở thành mối đe dọa với sức khỏe cộng đồng. Hiện nay, bên cạnh các phương pháp điều trị tiểu đường như: điều trị bằng insulin, dược lý và liệu pháp ăn kiêng, việc sử dụng cây thuốc như giảo cổ lam trong hỗ trợ điều trị tiểu đường cũng được quan tâm. Hiệu quả can thiệp của giảo cổ lam trong điều trị tiểu đường đã được chứng minh thông qua việc làm giảm lượng đường trong máu trên các bệnh nhân và chuột bị tiểu đường [2]. Tuy nhiên, tác dụng của dược liệu này đối với bệnh tiểu đường ở mức độ phân

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-904237881.

Email: phamthidau1204@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4591>

tử chưa được quan tâm. Thụ thể Constitutive Androstane (CAR) là một thành viên trong liên họ thụ thể nhân tế bào (CAR, NR1I3), là một trong các yếu tố phiên mã chính của quá trình chuyển hóa các chất ngoại lai (xenobiotics) và cả các phân tử nội sinh trong tế bào (endogenous). Một số nghiên cứu gần đây cho thấy CAR có vai trò quan trọng trong việc cải thiện bệnh tiểu đường và béo phì ở chuột [3]. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu đáp ứng của CAR trong tế bào người với dịch chiết giao cổ lam làm tiền đề nghiên cứu vai trò của CAR trong cải thiện bệnh tiểu đường ở người bằng dịch chiết này.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Giào cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) thu tại huyện Tân Lạc, tỉnh Hòa Bình được chiết tổng số trong methanol 80%. Dịch chiết tổng số giao cổ lam (GCL) được loại bỏ methanol và hòa tan lại trong DMSO để thử nghiệm độc tính trên tế bào ung thư gan HepG2 và tế bào phôi thận lạnh tính HEK293 có nguồn gốc từ người (ATCC, Manassas, Mỹ). Chất kiểm chứng dương, chất hoạt hóa CAR ở người (hCAR) [4] là 6-(4-chlorophenyl) imidazo [2,1-b] [1, 3] thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl) oxime (CITCO) và chất kiểm chứng âm, chất ức chế hCAR [5] là isoquinoline carboxamide (PK1119) (Sigma Aldrich, Mỹ) được sử dụng lần lượt ở nồng độ 1 μ M và 2,5 μ M.

2.2. MTS assay

Tế bào HepG2 và HEK293 được nuôi trong đĩa 96 giếng qua đêm sau đó được ủ với CITCO, PK1119 và GCL ở các nồng độ nhất định. Sau 48 giờ, độc tính của các chất này lên khả năng sinh trưởng của tế bào được đánh giá bằng kit CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Real-time PCR

RNA tổng số từ tế bào HepG2 và HEK293 đã được ủ với GCL ở các nồng độ nhất định được tách bằng dung dịch TRIzol (Life Technologies, Mỹ). Một lượng RNA (1 μ g) được chuyển hoá thành cDNA bởi enzyme phiên mã ngược MLV-Reverse transcriptase (Thermo Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Real-time PCR đã được thực hiện với 1 μ l cDNA mẫu trên máy ABI 7500 (Applied Biosystems, Mỹ) sử dụng tín hiệu SYBER Green (Thermo Scientific, Mỹ). Các cặp mồi của gen CAR, CYP2B6 và β -actin ở người [6-7] (IDT, Singapore) có trình tự như sau: hCAR-F: 5'-TGGTACTGCAAGTCATCAAGT-3' và hCAR-R: 5'-CTTCAATTGTGTAGCGAAGAG-3'; hCYP2B6-F: 5'-AGACGCCTTCAATCCTGACC-3' và hCYP2B6-R: 5'-CCTTACCAAGACAAATCCGC-3'; h β -actin-F: 5'-TGACCCAGATCATGTTTGAGA-3' và h β -actin-R: 5'-TACGGCCAGAGGCGTACAGC-3'.

2.4. Western Blotting

Các tế bào HepG2 và HEK293 (2×10^5 tế bào/ml) được nuôi trong đĩa 6 giếng qua đêm, được ủ với GCL ở nồng độ xác định. Sau 24 giờ, tế bào được thu và tách protein tổng số bằng đệm RIPA (Thermor scientific). Mẫu được xử lý với đệm Leaming 5X và điện di trên gel SDS-PAGE 10%, sau đó được chuyển lên màng Hybond-P (GE Health Sciences, Mỹ). Protein trên màng được ủ với kháng thể đặc hiệu kháng hCAR hoặc h β -actin (Cell Signaling, Mỹ). Phức hợp kháng nguyên kháng thể này được phát hiện bởi kháng thể thứ cấp tương ứng có gắn HRP (horseradish peroxidase-conjugated antibody). Băng tín hiệu sẽ được nhận diện bởi dung dịch Chemiluminescence (GE Health Sciences, Mỹ).

2.5. Phân tích số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel và GraphPrism.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Độc tính của dịch chiết giảo cổ lam

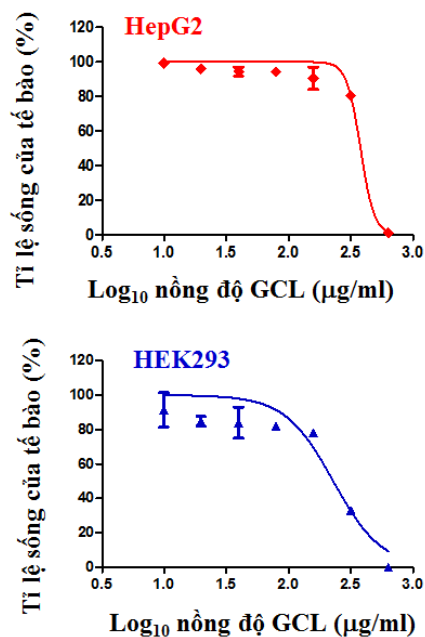
Độc tính của GCL đối với tế bào HepG2 và tế bào HEK293 sau 48 giờ được thử nghiệm bằng phương pháp MTS nhằm định hướng

nồng độ của dịch chiết GCL trong thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nó tới CAR ở các dòng tế bào này. Khả năng sống sót của tế bào và giá trị IC₅₀ của dịch chiết GCL được thể hiện tại Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Giá trị IC₅₀ của dịch chiết GCL trên dòng tế bào HepG2 và HEK293

Nồng độ GCL (µg/ml)	Khả năng sống sót của tế bào ± SEM (%)		IC ₅₀ (µg/ml)	
	HepG2	HEK293	HepG2	HEK293
640	1,15 ± 0,57	0,04 ± 0,04		
320	80,41 ± 2,02	33,00 ± 0,19		
160	90,47 ± 6,55	78,02 ± 0,41		
80	94,32 ± 2,02	81,77 ± 0,36	378,7	228,9
40	94,45 ± 2,63	84,03 ± 8,99		
20	96,09 ± 2,05	84,70 ± 2,88		
10	99,26 ± 1,61	91,38 ± 9,98		

Kết quả cho thấy, tỉ lệ sống của tế bào HepG2 không bị ảnh hưởng tại nồng độ 10µg/ml. Tỉ lệ này giảm không đáng kể (từ 5-10%) khi nồng độ GCL tăng từ 20-160µg/ml. Tỉ lệ này tiếp tục giảm tới 20% tại nồng độ 320µg/ml và giảm đột ngột tới 1,15% ở nồng độ 640µg/ml. Trong khi đó, tỉ lệ sống của tế bào HEK293 đã giảm khoảng 10% ngay khi xử lý với GCL ở nồng độ 10µg/ml. Tỉ lệ này tiếp tục giảm từ 15-20% khi xử lý với GCL ở nồng độ từ 20-160µg/ml. Tỉ lệ này giảm mạnh tới 67% ở nồng độ GCL 320µg/ml và giảm gần như hoàn toàn (0%) tại nồng độ 640µg/ml. Giá trị IC₅₀ của tế bào HEK293 (228,9 µg/ml) thấp hơn khoảng 1,6 lần so với của dòng tế bào HepG2 (378,7µg/ml) chứng tỏ tế bào HEK293 nhạy cảm với dịch chiết GCL hơn so với tế bào HepG2. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả sàng lọc độc tính của một số hợp chất trên một số dòng tế bào, thể hiện tế bào HEK293 thường nhạy cảm với các chất hơn so với tế bào HepG2 [8]. Kết quả này là cơ sở cho việc thiết kế nồng độ GCL để kích thích sự biểu hiện của CAR trong từng dòng tế bào ở trên cho các thí nghiệm tiếp theo.



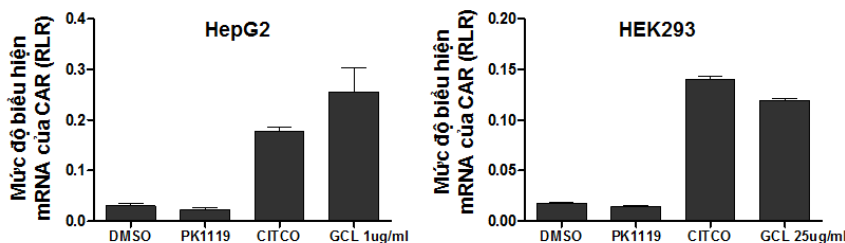
Hình 1. Đường cong đáp ứng của các tế bào với dịch chiết GCL.

3.2. Đáp ứng của gen CAR với dịch chiết giảo cổ lam

Để đánh giá khả năng đáp ứng của CAR với GCL, mức độ biểu hiện của mRNA và protein CAR sau khi ủ với GCL và các chất kiểm

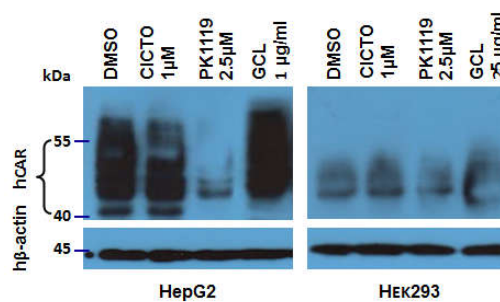
chứng trên hai dòng tế bào HepG2 và HEK293 đã được thực hiện. Trong đó, tế bào HepG2 được sử dụng như là tế bào đích với biểu hiện CAR cao và tế bào HEK293 được sử dụng như là tế bào đối chứng với biểu hiện CAR thấp. Mức độ biểu hiện mRNA của CAR được kiểm tra bằng kỹ thuật qRT-PCR (Hình 2). Như mong đợi, sự biểu hiện mRNA của CAR ở dòng tế bào HepG2 cao hơn so với dòng tế bào HEK293 trong khoảng từ 1,2-2,1 lần ($p < 0,05$). Kết quả cho thấy, mặc dù HEK293 được xử lý với nồng độ GCL cao hơn (gấp 25 lần) nhưng biểu hiện mRNA của CAR trong tế bào này vẫn thấp hơn trong tế bào HepG2. Sự biểu hiện mRNA của CAR trong 02 dòng tế bào này có

xu hướng giảm nhưng không đáng kể khi xử lý với chất ức chế PK1119. Đối với dòng tế bào HepG2, sự biểu hiện gen CAR rất cao và đã được tăng lên khoảng từ 6,2-9,8 lần ($p < 0,001$) khi được xử lý với chất hoạt hóa CITCO và dịch chiết GCL (1 μ g/ml). Trong dòng tế bào này, mức độ ảnh hưởng lên mRNA của CAR bởi GCL cao hơn CITCO khoảng 1,4 lần ($p < 0,01$). Trong khi đó đối với dòng tế bào HEK293 mức độ biểu hiện gen CAR khá thấp, mức độ biểu hiện mRNA của CAR được tăng cường cao nhất khoảng 7,8 lần khi tế bào được xử lý với CITCO sau đó đến GCL 25 μ g/ml (khoảng 6,6 lần).



Hình 2. Mức độ biểu hiện mRNA của gen CAR khi đáp ứng với dịch chiết GCL trong 02 dòng tế bào HepG2 và HEK293 bằng kỹ thuật qRT-PCR. RLR: tỉ lệ tương quan.

Mức độ biểu hiện của protein CAR được đánh giá bằng kỹ thuật Western blotting (Hình 3). Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện của protein CAR có sự khác biệt rõ ràng, biểu hiện mạnh hơn ở dòng tế bào HepG2 (trái) so với dòng tế bào HEK293 (phải). Kết quả này là phù hợp với kết quả biểu hiện mRNA ở trên. Đối với tế bào HepG2, đúng như mong đợi biểu hiện của protein CAR đã tăng lên khi xử lý tế bào với chất hoạt hóa CITCO và giảm đi khi xử lý với chất ức chế PK1119 so với đối chứng nền là dung môi DMSO. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước kia về vai trò của CITCO [4] và PK1119 [5] đối với sự biểu hiện của CAR. Đồng thời việc xử lý tế bào HepG2 với dịch GCL (1 μ g/ml) cũng làm tăng cường mức độ biểu hiện của CAR. Trong khi đó dòng tế bào HEK293 có mức độ biểu hiện protein CAR thấp, sự biểu hiện của protein CAR bị ảnh hưởng không đáng kể bởi các chất kiểm chứng và dịch chiết GCL.



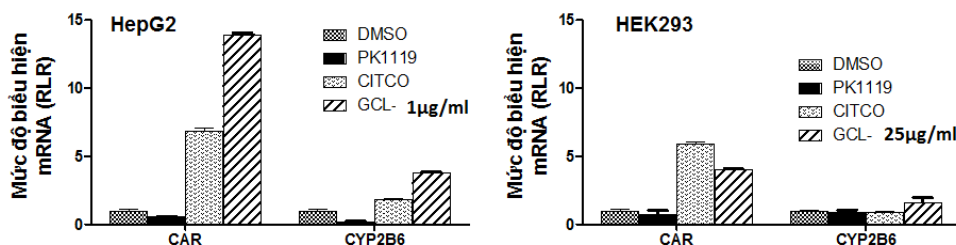
Hình 3. Mức độ biểu hiện protein CAR khi đáp ứng với dịch chiết GCL trong 02 dòng tế bào HepG2 và HEK293 bằng kỹ thuật Western Blotting.

Trong nghiên cứu này, biểu hiện của gen CYP2B6 là gen đích của CAR [4-6] đã được kiểm tra nhằm đánh giá khả năng hoạt hóa phiên mã của nó thông qua vai trò của CAR (Hình 4). Kết quả cho thấy đối với tế bào HepG2 (Hình 4-trái) sự biểu hiện mRNA của CYP2B6 tương tự với sự biểu hiện mRNA của

CAR. Khi CAR bị ức chế bởi PK1119 (khoảng 0,5 lần) thì khả năng hoạt hóa gen CYP2B6 cũng bị kìm hãm (khoảng 0,2 lần). Ngược lại, khi CAR được hoạt hóa ($p < 0,001$) bởi CITCO và GCL (1 μ g/ml) lần lượt là khoảng 6,9 và 1,8 lần thì quá trình phiên mã của CYP2B6 cũng được tăng cường tương ứng khoảng 13,9 và 3,8 lần ($p < 0,01$). Kết quả này là phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước [4-6]. Trong khi đó tế bào HEK293 với mức độ biểu hiện protein CAR thấp (Hình 4-phải), sự biểu hiện mRNA của CYP2B6 thay đổi không rõ rệt mặc dù biểu hiện mRNA của CAR đã thay đổi rõ rệt khi bị kích thích bởi các hóa chất thử nghiệm, thậm chí với nồng độ GCL cao gấp 25 lần so với

nồng độ xử lý ở tế bào HepG2. Điều đó chứng tỏ rằng khi CAR có biểu hiện nhiều hơn sẽ tác động rõ rệt lên các quá trình phiên mã phụ thuộc vào nó. Như vậy, cơ chế tác động của các chất kiểm chứng và dịch chiết GCL đối với CYP2B6 có xu hướng phụ thuộc vào sự có mặt của CAR trong tế bào.

Tuy nhiên để chứng minh rõ hơn về vai trò của CAR đối với các gen đích và gen liên quan tới quá trình tổng hợp và phân giải đường trong hỗ trợ cải thiện bệnh tiểu đường, tế bào bị triệt tiêu gen CAR sẽ được thiết kế để so sánh sự biểu hiện của chúng trong các tế bào này với tế bào có chứa CAR.



Hình 4. Mức độ biểu hiện mRNA của gen CAR và CYP2B6 khi đáp ứng với dịch chiết GCL trong 02 dòng tế bào HepG2 và HEK293 bằng kỹ thuật qRT-PCR. RLR: tỉ lệ tương quan.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy, dịch chiết GCL thể hiện độc tính đối với hai dòng tế bào HepG2 và HEK293 ở nồng độ khá cao với giá trị IC_{50} lần lượt là 378,7 và 228,9 μ g/ml. Sự biểu hiện mRNA và protein của CAR và CYP2B6 khi xử lý với các chất thử nghiệm trong các tế bào phụ thuộc vào sự có mặt của protein CAR trong tế bào.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện nhờ kinh phí của Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia cấp cho đề tài mã số 104.99-2015.87. Nghiên cứu có sự tham gia thực hiện của học sinh Ngô Ngọc Tú, Trường THPT chuyên Khoa học Tự nhiên, Trường ĐHKHTN, ĐHQGHN.

Tài liệu tham khảo

- [1] WHO, Global report on diabetes, Geneva, 2016.
- [2] Shanmugasundaram et al, Use of *Gymnema sylvestre* leaf extract in the control of blood glucose in insulin-dependent diabetes mellitus, *J Ethnopharmacol.*, 303 (1990) 281
- [3] Dong et al, Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10644 (2009) 18831.
- [4] Maglich et al., Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J Biol Chem*, 278 (2003) 17277.
- [5] Caitlin et al., Quantitative high-throughput identification of drugs as modulators of human constitutive androstane receptor, *Scientific Reports*, 2015.

- [6] Hisashi M. and Yuji H., Potential role of estradiol and progesterone in insulin resistance through constitutive androstane receptor, *Journal of Molecular Endocrinology*, 472 (2011) 229.
- [7] Daochuan et al, Genome-wide Analysis of Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Transcriptome in Wild-type and CAR-knockout HepaRG cells, *Biochem Pharmacol*, 981 (2015) 190.
- [8] Menghang et al, Compound Cytotoxicity Profiling Using Quantitative High-Throughput Screening, *Environ Health Perspect*, 1163 (2008) 284.

Primary Study on the Response of Constitutive Androstane Receptor with *Gynostemma pentaphyllum* Extract

Hoang Thi Trang¹, Hoang Thi Phuong¹, Pham Thi Thu Huong²,
Mai Chau Phuong³, Dau Bao Ngoc³, Tran Tien Thinh³, Pham Thi Dau¹

¹Faculty of Biology, VNU University of Sciences, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

²The Key Laboratory of Enzyme & Protein Technology,
VNU University of Sciences, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

³Lam Son High School, 88 Han Thuyen, Thanh Hoa

Abstract: Diabetes is a group of metabolic disorders with dangerous complications. It is a concern of the human society. In addition to diabetic therapies by insulin treatments, pharmacology and diet, many medical plants also were used in supporting for treatment. Among them, *Gynostemma pentaphyllum* is known as a valuable medicinal plant that supports the treatment of diabetes, regulates blood pressure and reduces blood fats used in the form of tea or tablets. Recent studies have shown that the Androstane Constitutive Receptor (CAR) is a xenosensor for many kinds of xenobiotics, which play an important role in improving diabetes and obesity. Therefore, this study was conducted to investigate the CAR response with *Gynostemma pentaphyllum* extract, in order to understanding on the role of CAR in diabetes improvement with this extract. The primary results showed that the expression of CAR and its target gene (CYP2B6) were enhanced about 9.8 and 3.8 fold, respectively when treated with *Gynostemma pentaphyllum* extract (1 µg/ml).

Keywords: Diabetes, *Gynostemma pentaphyllum*, Constitutive Androstane Receptor (CAR).