

# SỰ THAY ĐỔI HÀM LƯỢNG LYSYL OXIDASE TẠI TẾ BÀO NỘI MÔ MẠCH MÁU VĨNG MẠC TRONG MÔI TRƯỜNG NỒNG ĐỘ GLUCOSE CAO

Nguyễn Ngân Hà<sup>1,2,3</sup>, Trần Huy Thịnh<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Phú<sup>2</sup>,  
Nguyễn Phú Trang Hưng<sup>1</sup>, Sayon Roy<sup>3</sup>

## TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Đánh giá sự thay đổi hàm lượng Lysyl oxidase tại tế bào nội mô mạch máu võng mạc trong môi trường nồng độ glucose cao. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thử nghiệm. Tế bào nội mô mạch máu võng mạc chuột được chia thành 2 nhóm nuôi cấy trong môi trường bình thường hoặc nồng độ glucose cao. Kỹ thuật đông lạnh đông miễn dịch và western blot giúp xác định lượng LOX trong protein thu được từ 2 nhóm tế bào. **Kết quả:** Mức độ biểu hiện của LOX trong protein toàn phần và protein chất nền ngoại bào tăng, trong khi đó, mức độ biểu hiện của LOX trong tế bào giảm tại các tế bào được nuôi cấy trong môi trường nồng độ glucose cao. **Kết luận:** Nồng độ glucose cao gây tăng lượng LOX trong protein toàn phần và protein chất nền ngoại bào, đồng thời giảm lượng LOX quay trở lại tế bào.

**Từ khóa:** Lysyl oxidase, tế bào nội mô mạch máu võng mạc.

## SUMMARY

### CHANGES OF LYSYL OXIDASE EXPRESSION IN RETINAL ENDOTHELIAL CELLS UNDER HIGH GLUCOSE CONDITION

**Purpose:** Evaluate the changes of lysyl oxidase in retinal endothelial cells under high glucose condition. **Methods:** Experimental research. Rat retinal endothelial cells were grown in normal or high glucose medium. Co-immunoprecipitation and western blot were performed to determine LOX expression in 2 groups. **Results:** LOX expression in total protein and extracellular protein increased and LOX expression in cell protein decreased under high glucose condition.

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

<sup>2</sup>Bệnh viện Mắt Trung ương

<sup>3</sup>Trường Đại học Boston, Hoa Kỳ

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Ngân Hà

Email: dr.nganha@gmail.com.

Ngày nhận bài: 6.01.2020

Ngày phản biện khoa học: 28.2.2020

Ngày duyệt bài: 9.3.2020

**Conclusion:** High glucose promotes LOX overexpression in total protein and extracellular protein and reduced LOX internalization.

**Keywords:** Lysyl oxidase, retinal endothelial cells.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lysyl oxidase (LOX) là enzym liên kết chéo đóng vai trò thiết yếu trong quá trình phát triển và trưởng thành của màng đáy mạch máu võng mạc [2, 5]. LOX được tổng hợp dưới dạng tiền enzyme 50 kD không hoạt động (pro-LOX) trong tế bào sau đó được giải phóng ra môi trường ngoại bào. Tại đó tiền enzym được phân cắt thành enzym hoạt động 32 kD (LOX trưởng thành) và propeptide 18 kD (LOPP) [5]. Mặc dù LOX được coi là enzym chất nền ngoại bào, các nghiên cứu cũng chỉ ra sự tồn tại của LOX trong nhân và bào tương. LOX trưởng thành được phát hiện di chuyển từ môi trường ngoại bào vào trong bào tương và tập trung trong nhân tế bào [3].

LOX đã được xác định trong một số mô bao gồm da, động mạch chủ, tim, phổi, gan, da dày, ruột non, đại tràng, sụn, xương, thận, buồng trứng, tinh hoàn, vú, và não [5]. Tại mắt, LOX được phát hiện tại giác mạc, vùng bè, thể mi, thể thủy tinh và võng mạc. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vai trò quan trọng của liên kết chéo qua trung gian LOX đối với tính toàn vẹn và chức năng của mô, đặc biệt mô mạch máu và mô liên kết [5]. Tuy nhiên, vai trò của LOX trong tổn thương mạch máu võng mạc do tình trạng đường huyết cao còn chưa rõ ràng. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu đánh giá sự thay đổi hàm lượng LOX tại tế bào nội mô mạch máu võng mạc trong môi trường nồng độ glucose cao, từ đó đem lại những hiểu biết đầy đủ hơn về cơ chế sinh bệnh võng mạc đái tháo đường.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Nhóm nghiên cứu: Các tế bào nội mô mạch máu võng mạc chuột nuôi cấy trong môi trường glucose nồng độ cao.

- Nhóm đối chứng: Các tế bào nội mô mạch máu võng mạc chuột nuôi cấy trong môi trường nồng độ glucose bình thường.

**2.2. Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu thử nghiệm. Mỗi thử nghiệm được lặp lại 6 lần.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

**2.3.1. Nuôi cấy tế bào.** Các tế bào nội mô mạch máu võng mạc chuột được nuôi cấy trong các đĩa tế bào đường kính 60 mm ở môi trường nồng độ glucose bình thường (N, 5mM glucose) hoặc môi trường nồng độ glucose cao (HG, 30mM glucose) trong 7 ngày.

**2.3.2. Phân lập chất nền ngoại bào bằng Amonium Hydroxide (NH<sub>4</sub>OH).** Sau 7 ngày nuôi cấy trong môi trường glucose bình thường hoặc môi trường glucose nồng độ cao trong 7 ngày, mỗi đĩa tế bào được bơm 1ml NH<sub>4</sub>OH 20 mM và đặt ở nhiệt độ phòng. Sau 5 phút, tế bào tách khỏi đĩa tế bào được rửa sạch bằng dH<sub>2</sub>O. Đĩa tế bào chỉ còn chứa chất nền ngoại bào được rửa lại bằng dH<sub>2</sub>O trong 4 lần.

**2.3.3. Phân lập tế bào bằng Trypsin.** Sau 7 ngày nuôi cấy trong môi trường nồng độ glucose bình thường và nồng độ glucose cao, tế bào được tách khỏi chất nền ngoại bào bằng 1 ml Trypsin ở 37°C/3-5 phút. Sau khi ly tâm, dung dịch phía trên được lấy bỏ và cặn tế bào bên dưới được ly giải bằng dung dịch lysis buffer. Ống cặn tế bào sau đó được ly tâm với tốc độ 2000 rpm/5 phút ở phòng lạnh. Dung dịch phía trên được tách khỏi cặn tế bào và chuyển sang ống nghiệm mới có dán nhãn.

**2.3.4. Đồng lắng đọng miễn dịch.** Để xác định LOX bên trong tế bào, tế bào nội mô võng mạc chuột được nuôi cấy trong môi trường nồng độ glucose bình thường hoặc môi trường nồng độ glucose cao trong 7 ngày. Sau đó các tế bào được phân tách khỏi chất nền ngoại bào sử dụng trypsin-EDTA. Protein phân lập từ 2 nhóm tế bào được lấy một lượng tương đương (250µg) để lắng đọng miễn dịch với kháng thể kháng LOX đơn dòng loài thỏ. Sản phẩm thu được tiến hành kỹ thuật Western Blot (WB).

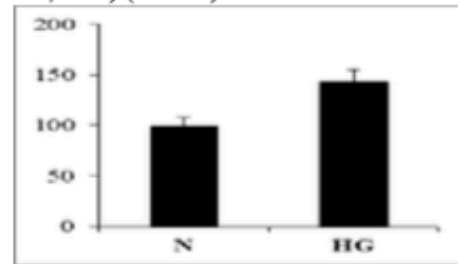
**2.3.5. Kỹ thuật Western blot.** Protein toàn phần, protein chất nền ngoại bào và protein trong tế bào thu được sau kỹ thuật lắng đọng miễn dịch được tiến hành điện di trên gel polyacrylamide và chuyển sang màng polyvinylidene difluoride. Để xác định lượng LOX ở chất nền

ngoại bào, LOX bên trong tế bào và LOX trong protein toàn phần, màng được ủ qua đêm trong kháng thể kháng LOX đơn dòng loài thỏ ở nhiệt độ 4°C sau đó ủ trong kháng thể thứ phát kháng thỏ IgG. Lượng LOX khác nhau giữa 2 nhóm được đánh giá nhờ phần mềm ImageJ (Wayne Rasband, Viện sức khỏe quốc gia, Bethesda, Hoa Kỳ).

**2.4. Xử lý số liệu.** Tất cả các số liệu được tính theo giá trị trung bình. Các giá trị của nhóm đối chứng được coi là 100% và giá trị của nhóm glucose nồng độ cao được tính theo phần trăm của nhóm đối chứng. So sánh giữa các nhóm sử dụng thuật toán 1-way ANOVA theo kiểm định Bonferroni. Mức  $p < 0.05$  được coi là có ý nghĩa thống kê.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

**3.1. Mức độ biểu hiện của LOX trong protein toàn phần.** Phân tích kết quả thu được qua kỹ thuật WB cho thấy sự tăng đáng kể lượng LOX trong protein toàn phần của các tế bào được nuôi cấy trong môi trường nồng độ glucose cao so với nhóm tế bào nuôi cấy trong môi trường bình thường ( $145 \pm 10\%$  nhóm đối chứng,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) (Hình 1).

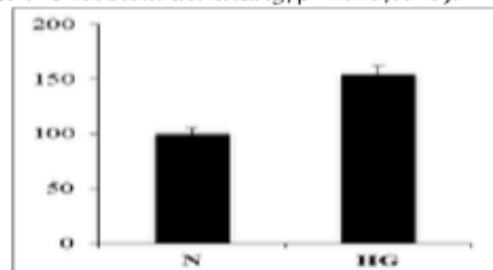


**Hình 1: Tác động của môi trường nồng độ glucose cao với LOX trong protein toàn phần.**

N: Môi trường bình thường, HG: Môi trường nồng độ glucose cao.

### 3.2. Mức độ biểu hiện của LOX tại chất nền ngoại bào

Phân tích kết quả thu được qua kỹ thuật WB cho thấy lượng LOX tại chất nền ngoại bào tăng đáng kể trong môi trường nồng độ glucose cao ( $154 \pm 9\%$  nhóm đối chứng,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ).

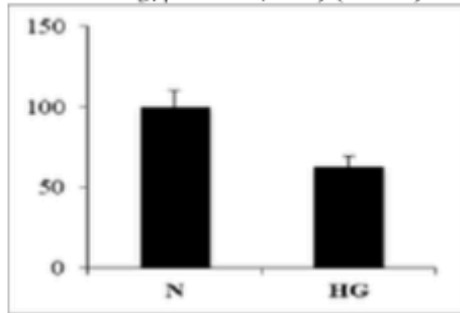


**Hình 2: Tác động của môi trường nồng độ**

**glucose cao với LOX chất nền ngoại bào.**

N: Môi trường bình thường, HG: Môi trường nồng độ glucose cao.

**3.3. Mức độ biểu hiện của LOX trong tế bào.** Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng lượng LOX quay trở lại tế bào giảm đáng kể trong các tế bào được nuôi cấy ở môi trường nồng độ glucose cao so với nhóm tế bào được nuôi cấy ở môi trường bình thường. ( $62 \pm 9\%$  nhóm đối chứng;  $p < 0.05, n=6$ ) (Hình 3).



**Hình 3: Tác động của môi trường nồng độ glucose cao với LOX trong tế bào.**

N: Môi trường bình thường, HG: Môi trường nồng độ glucose cao.

#### IV. BÀN LUẬN

Trong các bệnh lý tại dịch kính võng mạc như bệnh võng mạc đái tháo đường tăng sinh và bong võng mạc nguyên phát, có sự tái tạo chất nền ngoại bào trên diện rộng [6]. Mặc dù nhiều nghiên cứu về rò mao mạch võng mạc ở bệnh đái tháo đường đã tập trung vào các bất thường tế bào mạch máu như tế bào nội mô và sự sản xuất yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), được coi là yếu tố chính gây ra sự phát triển rối loạn chức năng mạch, chỉ một số ít đánh giá mối quan hệ giữa những thay đổi sinh hóa của sự tích lũy bất thường của chất nền ngoại bào và tăng tính thấm màng đáy [1, 7].

Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng nồng độ glucose cao ảnh hưởng đáng kể tới mức độ biểu hiện LOX. Đây là nghiên cứu đầu tiên phân tích chi tiết tác động của nồng độ glucose trong môi trường nuôi cấy tới mức độ biểu hiện của LOX ở bên trong và bên ngoài tế bào. Theo đó, lượng LOX trong protein toàn phần và lượng LOX tại chất nền ngoại bào tăng, trong khi lượng LOX quay trở lại tế bào giảm sau khi nuôi cấy tế bào trong môi trường nồng độ glucose cao.

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, các thành phần của màng tế bào như Collagen IV và Fibronectin tăng đáng kể sau khi nuôi cấy tế bào trong môi trường nồng độ glucose cao [4]. Trong

nghiên cứu này, kết quả của chúng tôi cho thấy lượng LOX tại chất nền ngoại bào tăng. Kết hợp kết quả từ các nghiên cứu trước và nghiên cứu hiện tại, chúng tôi đưa ra giả thiết rằng sự tăng tổng hợp các thành phần chất nền ngoại bào tạo ra nhiều vị trí cho LOX bám dính để thực hiện chức năng xúc tác cho việc hình thành liên kết chéo, vì vậy giảm lượng LOX quay trở lại tế bào trong môi trường nồng độ glucose cao. Sự giảm lượng LOX ngoại bào này kích thích các tín hiệu tăng sản xuất LOX. Những phát hiện này góp phần đem lại hiểu biết sâu hơn về cơ chế sinh bệnh đái tháo đường thông qua kích thích tăng mức độ biểu hiện LOX gây tổn hại chức năng màng đáy mao mạch võng mạc.

#### V. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng môi trường glucose nồng độ cao gây tăng mức độ biểu hiện của LOX trong protein toàn phần và protein chất nền ngoại bào, đồng thời giảm lượng LOX quay trở lại tế bào nội mô mạch máu võng mạc. Từ đó gợi ý cơ chế tổn thương các mạch máu võng mạc trong bệnh võng mạc đái tháo đường liên quan rối loạn mức độ biểu hiện của LOX và mở ra hướng nghiên cứu dự phòng bệnh võng mạc đái tháo đường thông qua điều chỉnh lượng LOX.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Boyd-White, J. and J.C. Williams**, Effect of cross-linking on matrix permeability: a model for AGE-modified basement membranes. *Diabetes*, 1996. **45**(3): p. 348-353.
2. **Chronopoulos, A., et al.**, High glucose increases lysyl oxidase expression and activity in retinal endothelial cells: mechanism for compromised extracellular matrix barrier function. *Diabetes*, 2010. **59**(12): p. 3159-3166.
3. **Guo, Y., et al.**, Intracellular distribution of the lysyl oxidase propeptide in osteoblastic cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007. **292**(6): p. C2095-C2102.
4. **Roy, S., et al.**, Downregulation of fibronectin overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes*, 2003. **52**(5): p. 1229-1234.
5. **Sethi, A., R.J. Wordinger, and A.F. Clark**, Focus on molecules: lysyl oxidase. *Experimental eye research*, 2012. **104**: p. 97.
6. **Sivak, J.M. and M.E. Fini**, MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Progress in retinal and eye research*, 2002. **21**(1): p. 1-14.
7. **Walton, H.A., J. Byrne, and G.B. Robinson**, Studies of the permeation properties of glomerular basement membrane: cross-linking renders glomerular basement membrane permeable to protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1992. **1138**(3): p. 173-183.