

# NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG BẢO VỆ TẾ BÀO KHỎI CÁC BỨC XẠ ION HÓA CỦA EPIGALLOCATECHIN GALLATE BẰNG PHẢN ỨNG CHUỖI POLYMERASE (PCR)

Trần Thị Nhàn và cộng sự  
Trường Đại học Điện Lực (EPU)

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của epigallocatechin gallate (EGCG) chiết xuất từ chè xanh khỏi những ảnh hưởng của bức xạ ion hóa.

Để đạt mục tiêu đề ra nghiên cứu đã tiến hành thực nghiệm như sau: Tế bào nấm men đã được nuôi cấy trong môi trường YDP lỏng chứa chiết xuất nấm men, peptone và dextrose/glucose với sự có và không có EGCG, rồi chiếu xạ bằng tia X và tia gamma với liều xạ 50 và 100 Gy. Ribonucleic acid (RNA) polymerase, enzyme xúc tác cho phản ứng tổng hợp RNA thông tin (mRNA) từ khuôn DNA, được chiết xuất từ các tế bào nấm men chiếu xạ. Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) được áp dụng để tạo ra sự khuếch đại ngẫu nhiên RNA polymerase của các mẫu chiếu xạ. Sử dụng kỹ thuật PCR, chúng tôi nhận thấy RNA thông tin cho việc tổng hợp protein từ DNA tổn thương đứt gãy sợi đơn do chiếu xạ tia X và tia gamma với liều 50 kGy đã giảm từ 1,01 và 1,17 lần xuống 0,72 lần và 0,57 lần khi bổ sung 500 $\mu$ M EGCG. Đối với các tế bào bị chiếu xạ với liều 100Gy, đại lượng này giảm từ 1,07 và 1,90 lần xuống 0,79 lần và 0,52 lần, tương ứng.

Kết quả nghiên cứu chứng tỏ rằng EGCG đã có hiệu quả trong việc bảo vệ chống lại tổn thương sợi đơn trên DNA gây bởi bức xạ ion hóa.

## 1. GIỚI THIỆU

Bức xạ ion hóa sinh ra từ quá trình phân rã của các hạt nhân không ổn định hoặc do sự khử kích thích của các nguyên tử và hạt nhân của chúng trong lò phản ứng hạt nhân, máy tia X, cyclotron và các thiết bị khác. Bức xạ ion hóa có thể gây ra những thay đổi về cấu trúc và chức năng dẫn đến tổn thương tế bào hoặc thậm chí gây chết tế bào. Bức xạ ion hóa tạo ra các gốc tự do tấn công các đại phân tử sinh học như DNA, protein, lipid và các phân tử khác trong tế bào. Các phân tử DNA là mục tiêu quan trọng của bức xạ, và việc chiếu xạ có thể gây ra những tổn thương nghiêm trọng trong các phân tử DNA, dẫn đến đột biến hoặc thậm chí là chết tế bào. Bức xạ ion hóa cũng gây ra một loạt các tổn thương trong DNA như đứt sợi đơn (SSB) trong liên kết phosphodiester, đứt sợi kép (DSB) trên các vị trí đối lập hoặc bị dịch chuyển, tổn thương cơ sở, liên kết chéo protein-

DNA và protein-protein (1,2,3). Có hai cơ chế tương tác của bức xạ ion hóa trên DNA. Một liên quan đến sự ion hóa các nguyên tử trong DNA (tác động trực tiếp), trong khi liên quan đến sự tấn công của các gốc tự do được tạo ra bởi sự phóng xạ của các phân tử nước xung quanh (tác động gián tiếp) (1).

Epigallocatechin 3-Gallate (EGCG) là một thành phần chính của trà xanh và là một este của epigallocatechin và axit gallic, thuộc nhóm polyphenol và catechin. Tác dụng có lợi của EGCG đã được báo cáo trong nhiều mô hình bệnh gan ở động vật như tổn thương do thiếu máu cục bộ / tái tưới máu, gan nhiễm mỡ, tổn thương gan do rượu và ung thư (4,5). EGCG cùng với các polyphenol trong trà xanh khác cũng thể hiện đặc tính ức chế tăng trưởng ở nhiều dòng tế bào khối u (6). Một số cơ chế đã được đề xuất nhờ đó các hợp chất này phát huy tác dụng chống khối u: chúng bao gồm

sự phong tỏa các yếu tố tăng trưởng liên kết với các thụ thể của chúng (10), quá trình phosphoryl hóa (hoạt hóa) các kinase protein được kích hoạt bởi mitogen (MAPK) (7,8) có thể dẫn đến quan sát thấy sự cảm ứng của các enzym chuyển hóa thuốc ở giai đoạn II (9,10).

Sự ra đời của phản ứng chuỗi polymerase (PCR) đã biến đổi hoàn toàn khoa học sinh học từ thời điểm được Mullis phát hiện lần đầu tiên (3). PCR là một quá trình đơn giản và được sử dụng rộng rãi trong đó một lượng nhỏ DNA có thể được khuếch đại thành nhiều bản sao. Ngoài tính nhanh chóng mà xét nghiệm này hoạt động, nó có thể chứng minh một cách định lượng mức độ hiện diện của một trình tự cụ thể (3,4). Axit ribonucleic Messenger (mRNA) là một phân tử RNA sợi đơn tương ứng với trình tự di truyền của gen và được đọc bởi một ribosome trong quá trình tổng hợp protein. Method PCR cũng được sử dụng để sàng lọc các đột biến mất đoạn trong gen *hprt* của Aghamohammadi et al (11).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nghiên cứu khả năng bảo vệ của EGCG đối với đứt gãy sợi đơn DNA trong các tế bào được chiếu xạ bằng cách sử dụng môi để khuếch đại RNA polymerase, một loại enzyme chịu trách nhiệm tổng hợp mRNA từ DNA bị hư hỏng, thông qua khả năng điều chỉnh thấp của nó.

## 2. MẪU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Mẫu nghiên cứu

Tế bào nấm men từ Công ty Takara Bio (Shinga, Nhật Bản) được nuôi cấy trong môi trường chiết xuất nấm men-peptone-dextrose (YPD) có hoặc không có EGCG (500  $\mu$ M), được thêm vào 5 ml môi trường nuôi cấy YPD để tế bào phát triển. Các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ ở 30°C và lắc. Các mẫu cấy bão hòa được sử dụng để cấy vào môi trường tươi, và các mẫu cấy mới được ủ thêm 3 giờ ở 30°C trước khi bắt đầu thí nghiệm. EGCG được mua từ Nacalai Tesque, Inc, Nhật Bản với độ tinh khiết  $\geq 99,5\%$ .

### 2.2. Chiếu xạ

Trong nghiên cứu này, hai thí nghiệm được tiến hành riêng biệt với chiếu xạ tia X và tia gamma. Bức xạ tia X được thực hiện trên máy LINAC của Viện Nghiên cứu Kỹ thuật Hạt nhân (Đại học Fukui, Nhật Bản) với các mẫu nấm men với tổng liều lượng là 0, 50 và 100 Gy và tốc độ liều là 15 kGy/h. Bức xạ tia gamma được tiến hành với cùng một liều lượng (50 và 100 Gy) nhưng ở tốc độ liều thấp hơn (5 kGy/h) của nguồn  $^{60}\text{Co}$  của Phòng thí nghiệm bức xạ của Viện Nghiên cứu Khoa học và Công nghiệp (ISIR, Đại học Osaka, Nhật Bản).

### 2.3 Biểu hiện gen

Tổng số RNA của tế bào đã được tách chiết bằng cách sử dụng RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Hai microgam RNA được phiên mã ngược bằng cách sử dụng hệ thống tổng hợp Superscript First Strand để chuyển đổi thành cDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA). Một phần mẫu từ phản ứng này được sử dụng làm khuôn mẫu để khuếch đại PCR với môi Rad4. Rad4 primer là một protein nhận dạng tổn thương DNA (đứt sợi đơn) cần thiết cho quá trình sửa chữa cắt bỏ nucleotide bộ gen toàn cầu ở *Saccharomyces cerevisiae*. Cấu trúc của đoạn môi được thể hiện trong Bảng 1.

**Bảng 1. Cấu trúc đoạn môi của Rad4<sup>[4]</sup>**

Tên gene	Trình tự môi
Đoạn môi xuôi của Rad4	CGATGCTCAGGGCTTGTAATG
Đoạn môi ngược của Rad4	TTGGTAAAATCTGGCGGTTGA

Quá trình khuếch đại PCR được thực hiện trong hỗn hợp phản ứng 50  $\mu$ L. Hỗn hợp bao gồm 25  $\mu$ L Bộ đệm phản ứng Taq tiêu chuẩn, 2  $\mu$ L môi (15 pmol), 1  $\mu$ L RNA và 22  $\mu$ L nước. Quá trình khuếch đại được thực hiện bằng cách sử dụng bộ tuần hoàn nhiệt được lập trình ở 42°C trong 30 phút, 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 50 chu kỳ ở 95°C trong 10 giây, 60°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây, cuối cùng bước kéo dài ở 72°C trong 10 giây và được bảo quản ở 10°C.

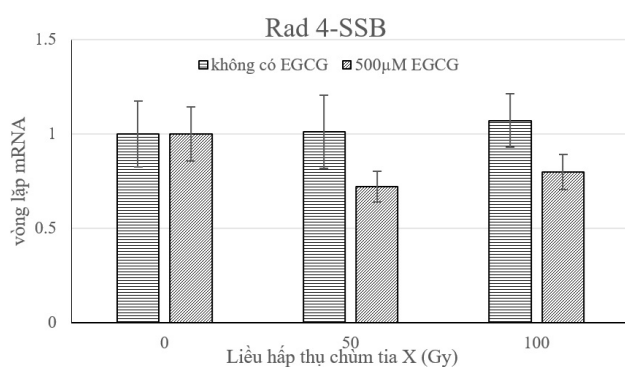
Thay đổi vòng lặp là thước đo mô tả mức độ thay

đổi của một đại lượng giữa phép đo ban đầu và phép đo tiếp theo. Axit ribonucleic Messenger (mRNA) là một phân tử RNA sợi đơn tương ứng với trình tự di truyền của gen và được đọc bởi một ribosome trong quá trình tổng hợp protein [5]. Sự thay đổi vòng lặp mRNA được xác định theo công thức dưới đây:

$$\text{Vòng lặp mRNA} = \frac{\text{Số lượng gen thí nghiệm}}{\text{Số lượng gen đối chứng}} \quad (1)$$

### 3. KẾT QUẢ

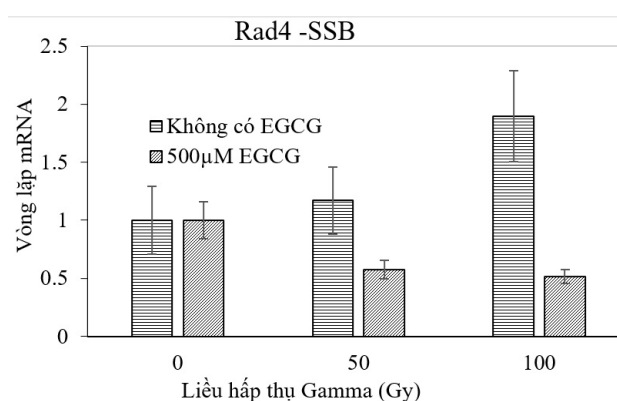
Sự thay đổi vòng lặp mRNA của DNA được chiếu xạ bởi tia X khi có và không có EGCG được trình bày trong Hình 1.



Hình 1. Sự thay đổi vòng lặp mRNA của DNA trong nấm men được chiếu xạ bằng tia X khi có và không có 500 μM EGCG

Như đã thấy trong Hình 1, EGCG có thể bảo vệ DNA khỏi bị hư hại do bức xạ ion hóa gây ra. Tổn thương DNA đã giảm rõ ràng khi có EGCG. Ở chiếu xạ tia X 50 Gy và với sự hiện diện của 500 μM EGCG, sự thay đổi vòng lặp mRNA giảm từ 1,01 lần xuống 0,72 lần. Con số này cũng giảm từ 1,07 lần xuống 0,79 lần ở bức xạ tia X 100 Gy và với sự hiện diện của 500 μM EGCG. Kết quả chứng minh rõ ràng rằng số lượng đứt gãy sợi đơn trong DNA đã giảm khi có 500 μM EGCG.

Vai trò bảo vệ của EGCG đối với DNA khỏi bức xạ ion hóa rõ ràng hơn ở LET cao hơn. Đối với chiếu xạ gamma, sự thay đổi vòng lặp mRNA giảm từ 1,17 lần xuống 0,57 lần khi có 500 μM EGCG ở liều hấp thụ 50 Gy và nó giảm từ 1,09 lần xuống 0,51 lần ở 100 Gy (Hình 2).



Hình 2. Sự thay đổi vòng lặp mRNA của DNA trong nấm men được chiếu xạ bởi tia gamma khi có và không có 500 μM EGCG

Kết quả với chiếu xạ tia X và chiếu xạ tia gamma cho thấy khi có EGCG, số lần thay đổi mRNA thấp hơn so với số lần đối chứng. Điều này có nghĩa là khi có 500 μM EGCG, số lượng đứt gãy sợi đơn trong DNA sẽ nhỏ hơn so với trường hợp không có thuốc thử.

### 4. KẾT LUẬN

EGCG hoạt động như một tác nhân có thể ức chế sự phá hủy phân tử do bức xạ ion hóa gây ra. Bioflavonoid có chứa EGCG có tác dụng bảo vệ đối với tổn thương DNA do các gốc hydroxyl gây ra. Một trong những cơ chế giải thích tác dụng bảo vệ của flavonoid đối với DNA là sự tham gia của các ion kim loại chelat, chẳng hạn như đồng hoặc sắt (phản ứng Fenton).

Các flavonoid tạo phức với đồng hoặc sắt ngăn cản việc tạo ra các loài trung gian phản ứng, được biết là để bảo vệ DNA khỏi tổn thương oxy hóa do sự tấn công của  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  và  $\cdot\text{O}_2^-$  trên các oligonucleotide của DNA. Tác dụng loại bỏ tận gốc của EGCG trên DNA là do các hoạt động kép: hoạt động thu dọn phản ứng trung gian và khử ion năng lượng trong phản ứng Fenton (6,7). Các flavonoid tạo phức với đồng hoặc sắt ngăn cản sự hình thành ROS. Trong hệ thống phản ứng Fenton,  $\text{Fe}^{2+}$  phản ứng với  $\text{H}_2\text{O}_2$  và bị oxy hóa thành  $\text{Fe}^{3+}$  và tạo ra gốc hydroxyl, dẫn đến tổn thương DNA. EGCG thể hiện sức mạnh khử lớn đối với các ion sắt, đặc biệt là ở nồng độ cao. Tác

động loại bỏ tận gốc của EGCG đối với DNA do hoạt động kép: ROS Hoạt động nhặt rác, và khử ion công suất trong phản ứng Fenton (5). Ở nồng độ thấp, EGCG bảo vệ DNA chống lại sự phá hủy do oxy hóa và với sự gia tăng nồng độ, EGCG làm giảm sức mạnh của ion sắt, làm tăng tốc độ tạo gốc hydroxyl từ phản ứng Fenton, nó có thể dần dần chiếm ưu thế so với khả năng quét gốc tự do tác động lên hư hại lên DNA.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students, TCS (Training Course Series), No. 42 (2010), International Atomic Energy Agency, Vienna.
- [2] BEIR V (Biological Effects of Ionizing Radiation, V) (1990) Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation,; Washington (DC): National Academies Press (US), 1990 ISBN-10: 0-309-03997-5.
- [3] Eric Hall (1994). Radiobiology for the Radiologist, 4th ed. (Philadelphia: J. B. Lippincott, 1994), 3.
- [4] Cheng Chen, Qian Liu, Lin Liu, Yi-yang Hu, and Qin Feng (2018). Potential Biological Effects of Epigallocatechin-3-gallate on the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Mol. Nutr. Food Res. 2018, 62, DOI: 10.1002/mnfr.201700483.
- [5] Ryuchiro Sakata, Takato Ueno, Toru Nakamura, Masaharu Sakamoto, Takuji Torimura, Michio Sata (2004) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cell line LI90, Journal of Hepatology 40(1): 52-59.
- [6] Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS (1998) Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. Carcinogenesis 19:611–616.
- [7] Yang GY, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, Yang CS (2000) Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. Carcinogenesis 21:2035–2039.
- [8] Liang YC, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK (1997) Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. J Cell Biochem 67:55–65.
- [9] Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong AN (2000) Activation of antioxidant response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. Arch Pharm Res 23:605–612.
- [10] Kong AN, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T (2000) Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. Arch Pharm Res 23:1–16.
- [11] Aghamohammadi SZ, David TM, Thacker LSJ (1992) Rapid screening for deletion mutations in the hprt gene under X-ray and  $\alpha$ -irradiation using the polymerase chain reaction: X-ray and  $\alpha$ -particle mutant spectra. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 269(1): 1-7.