

PHÂN TÍCH *IN VITRO* CỦA PHẢN ỨNG PROTEIN MỞ RA CỦA TY THỂ VÀ BIỂU HIỆN CỦA HSPA9, HSPD1 VÀ ATF5 THÔNG QUA SỬ DỤNG CÁC MÔ HÌNH NUÔI CẤY TẾ BÀO

Nguyễn Thành Trung^{1*}, Yuki Kambe², Nguyễn Văn Giáp¹,
Mai Thị Ngân¹, Vũ Thị Thu Trà¹, Huỳnh Thị Mỹ Lệ¹, Bùi Trần Anh Đào¹

¹Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
²Trường Đại học Kagoshima, Nhật Bản

*Tác giả liên hệ: nguyenthanchung@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 17.04.2023

Ngày chấp nhận đăng: 20.11.2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá vai trò của các yếu tố báo hiệu của protein chaperone ty thể dưới tác động của phản ứng protein mở ra ty thể. Các mô hình *in vitro* đã được sử dụng, trong đó mRNA của các gen Hspa9, Hspd1 and ATF5 được khảo sát dưới điều kiện stress ty thể bởi chất cảm ứng Paraquat và 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid trên các dòng tế bào NIH3T3 và HEK293 bằng kỹ thuật qPCR. Kết quả đã chứng minh rằng dòng tế bào NIH3T3 không phù hợp làm chỉ số đọc cho cảm ứng phản ứng protein mở ra của ty thể *in vitro*. Hơn nữa, kết quả cũng cho thấy rằng mức độ của yếu tố phiên mã ATF5 có xu hướng giảm, trong khi đó sự tăng biểu hiện của Hspa9 và Hspd1 được quan sát sau khi các tế bào được xử lý bằng 50 hoặc 500 μ m Paraquat hoặc 3 μ m CDDO. Đáng lưu ý, nồng độ glucose có ảnh hưởng trực tiếp đến tín hiệu phản ứng protein mở ra của ty thể *in vitro*. Tóm lại, kết quả của nghiên cứu chỉ ra rằng dòng tế bào HEK293 nên được sử dụng để đánh giá mức độ biểu hiện của các gen được khảo sát dưới điều kiện stress ty thể và mở ra hướng mới để phát triển các liệu pháp điều trị các rối loạn ty thể và các bệnh liên quan trong tương lai.

Từ khóa: CDDO, *in vitro*, Paraquat, phản ứng protein mở ra của ty thể và stress ty thể.

In Vitro Analysis of Mitochondrial Unfolded Protein Response and Expression of HSPA9, HSPD1 and ATF5 using Cell Culture Models

ABSTRACT

This study aimed to assess the role of the mitochondrial chaperones signaling factors induced by the mammalian mitochondrial unfolded protein response. *In vitro* models were used with the mRNA of Hspa9, Hspd1 and ATF5 gene measured upon mitochondrial stress via Paraquat and 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid in NIH3T3 and HEK293 cell lines by quantitative real time Polymerase Chain Reaction. The results demonstrated that NIH3T3 cells were not suitable as a readout for UPRmt induction *in vitro*. Further, it was found that the levels of the transcription factor ATF5 tended to be decreased, while the upregulation of the Hspa9 and Hspd1 was observed upon mitochondrial stress in the context of the cells treated with 50 or 500 μ m Paraquat or 3 μ m 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid. Notably, glucose concentration directly affected mammalian mitochondrial unfolded protein response signaling *in vitro*. Taken together, the results of the study indicates that the HEK293 cell line should be used to evaluate the expression levels of the genes upon mitochondrial stress conditions and might pave the way for the development of novel therapies for the cure of mitochondrial disorders and associated diseases in the future..

Keywords: CDDO, *in vitro*, Paraquat, UPRmt and mitochondrial stress.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phản ứng protein mở ra của ty thể (UPRmt) là một phản ứng stress kích hoạt quá trình

phiên mã của protein chaperone ty thể, giúp loại bỏ các protein bị gấp sai để thúc đẩy cân bằng nội môi (Haynes & Ron, 2010). Trong quá trình UPRmt, protease AAA+ ClpP phá vỡ các protein

chưa được mở xoắn thành các peptit để có thể dễ được vận chuyển qua màng trong, thông qua bộ vận chuyển băng cassette gắn ATP, Abcb10. Đó rất có thể là chất đồng đẳng của haf-1 của chuột có nguồn gốc từ giun tròn *C. Elegans*. Ubl5 liên kết với vùng gen khởi động của protein chaperone ty thể, Hspa9 và Hspd1, để thúc đẩy kích hoạt phiên mã. Sự thay đổi của protein chaperone ty thể góp phần làm giảm stress và giúp thiết lập lại cân bằng nội môi (Haynes & Ron, 2010). UPRmt được biết là có liên quan với một số rối loạn não như liệt cứng hai chi và bệnh Parkinson. Liệt cứng hai chi dưới là một rối loạn thoái hóa thần kinh gây ra bởi 13 đột biến bao gồm cả chaperone ty thể, Hspd1 (Hansen & cs., 2002). Ngoài ra, các biến thể liên quan đến bệnh Parkinson ở gen Hspa9 gây suy giảm chức năng ty thể (Burbulla & cs., 2010). Tuy nhiên, theo hiểu biết của chúng tôi, các cơ chế phân tử của UPRmt *in vitro* và *in vivo* chưa được hiểu rõ và nghiên cứu đầy đủ.

Hiện nay, các yếu tố ảnh hưởng đến sự sắp xếp sai của các protein ty thể bao gồm sự phức tạp trong sinh học ty thể, ADN và các loại oxy phản ứng gây tổn thương protein (ROS) được tạo ra trong ty thể, cũng như các yếu tố như thay đổi nhiệt độ và tiếp xúc với chất độc (Pellegrino & cs., 2013). Cụ thể, nhiều chất độc làm suy giảm cân bằng nội môi protein của ty thể như Paraquat, được biết đến là một loại thuốc diệt cỏ, gây tích lũy ROS ở mức độ cao (Castello & cs., 2007). Paraquat (PQ) là loại thuốc diệt cỏ hiệu quả và được sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp. Do PQ có độc tính cao dẫn đến tỷ lệ tử vong cao ở người và động vật nên ngộ độc PQ đã trở thành mối quan tâm quan trọng trong độc học lâm sàng (Lock & Wilks, 2010). Bên cạnh đó, CDDO, một chất ức chế protease LON, nhanh chóng gây ra sự sai lệch protein của ty thể và cũng làm thay đổi biểu hiện Hspd1, phù hợp với cảm ứng UPRmt (Bernstein & cs., 2012).

Trong những năm gần đây, nhiều tác giả đã tập trung nghiên cứu về mô hình hóa tín hiệu UPRmt ở giun tròn *C. elegans* và đã đóng góp nhiều hiểu biết mới về quá trình cơ bản này (Jensen & Jasper, 2014). Tuy nhiên, số lượng kết quả nghiên cứu đã được chuyển sang ứng dụng trên động vật có vú chỉ ở mức hạn chế.

Dưới góc nhìn đó, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá tiềm năng của protein chaperone ty thể Hspa9, Hspd1 dưới dạng các dấu hiệu UPRmt khi bị căng thẳng ty thể *in vitro*. Hơn nữa, vai trò của ATF5, một dạng đồng đẳng của ATFS-1, đóng vai trò trung gian của tín hiệu UPRmt trong *C. elegans* đã được nghiên cứu *in vitro* (Nargund & cs., 2012). Chính vì vậy, trong nghiên cứu hiện tại, để hiểu rõ hơn về cơ chế phân tử của phản ứng protein mở ra của ty thể của động vật có vú, chúng tôi đã khảo sát để định lượng mARN các gen Hspa9, Hspd1 and ATF5 dưới điều kiện stress ty thể bởi Paraquat và CDDO trên các dòng tế bào NIH3T3 và HEK293 bằng kỹ thuật qPCR.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hóa chất và nguyên liệu dùng trong cho thử độc tính trên dòng tế bào gồm: (i) dung dịch FBS (Fetal bovine serum, Gibco) 10%, (ii) amphotericin B 0,25 g/ml, (iii) penicillin 100 units/ml, (iv) streptomycin 100 mg/ml (Nacalai Tesque Inc., Nhật Bản), (v) dung dịch DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco), (vi) dung dịch PBS 1X, (vii) Trypsin 2X (Nakarai, Nhật Bản) và (viii) dung dịch DMEM, Gibco bổ sung nồng độ thấp glucose (1 g/l).

Hóa chất và nguyên liệu dùng cho đánh giá khả năng đánh giá độc tính tế bào gây stress ty thể gồm: (i) tế bào NIH3T3 (CRL-1658), (ii) tế bào HEK293 (CRL-1658), (iii) Paraquat (St Louis, MO, Mỹ), (iv) CDDO (Cayman Chemicals cat# 81035) và (v) đĩa 12 giếng vô trùng đáy phẳng (Sumitomo, Nhật Bản).

Sinh phẩm, hóa chất dùng cho phản ứng qPCR: HighCapacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, Foster City, CA); Bộ kit Thunderbird SYBR qPCR kit (Toyobo Life Science, Osaka, Nhật Bản); Trình tự các cặp mồi đánh giá định lượng mức độ biểu hiện mARN của các gen Hspd1, Hspa9, ATF5 và housekeeping gen GAPDH được tham khảo theo các công bố trước đây và trình tự mồi đặc hiệu được trình bày ở bảng 1. Các cặp mồi được công ty Integrated DNA Technologies, Hoa Kỳ tổng hợp.

Phân tích *in vitro* của phản ứng protein mở ra của ty thể và biểu hiện của HSPA9, HSPD1 và ATF5 thông qua sử dụng các mô hình nuôi cấy tế bào

Bảng 1. Trình tự mỗi đánh giá định lượng mức độ biểu hiện mRNA của Hspa9, Hspd1 và ATF5 dưới điều kiện stress ty thể cho phản ứng qPCR

Gen	Tên mỗi	Trình tự (5'-3')	Nguồn
Hspa9	F	AATGAGAGCGCTCCTTGCTG	Bresciani & cs. (2022)
	R	CTGTTCCCCAGTGCCAGAAC	
Hspd1	F	TCTTCAGTTGTGGCAGTCA	Bresciani & cs. (2022)
	R	CCCCTCTTCTCCAAACTG	
ATF5	F	GGGTGCAGTGGCTTATGC	Gaither & cs. (2020)
	R	GCCCAGGCTGGTATTGAC	
GAPDH	F	GAAGGTCGGTGTGAACGGAT	Kambe & cs. (2021)
	R	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG	

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nuôi cấy tế bào

Các tế bào NIH3T3 và HEK293 (Invitrogen, Karsruhe, Đức) đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Các tế bào được nuôi trong đĩa để đạt mật độ 3×10^4 tế bào/cm² trong DMEM bổ sung 10% FBS đã được bất hoạt bằng nhiệt ở 56°C/30 phút, penicillin (100 UI/ml) và streptomycin (100 µg/ml).

Các tế bào được nuôi cấy trong tủ ấm 5% CO₂ ở 37°C. Sau khi tế bào đạt mật độ yêu cầu 3×10^4 tế bào/cm² và được tiến hành làm thí nghiệm thử độc tính.

(i) Để tìm ra các yếu tố tiềm năng điều chỉnh tăng tín hiệu UPRmt *in vitro*, các nghiên cứu khác nhau về hợp chất hóa học ảnh hưởng đến chức năng ty thể đã được áp dụng và sàng lọc cho cảm ứng Hspa9, Hspd1 và ATF5 trong các dòng tế bào khác nhau (Yoneda & cs., 2004; Houtkooper & cs., 2013; Runkel & cs., 2013). Dựa trên những quan sát đó, PQ và CDDO đã được bổ sung cho các dòng tế bào khác nhau ở các thời điểm khác nhau để định lượng mức độ mRNA Hspa9, Hspd1 và ATF5 trong nghiên cứu này. Cụ thể, các bước được thực hiện như sau:

- Dòng tế bào NIH3T3 được thử với chất Paraquat ở hai nồng độ 50 hoặc 500µM ở các thời điểm 6, 24 và 48 giờ và được lặp lại 3 lần;

- Dòng tế bào HEK293 được thử với chất Paraquat ở nồng độ 50µM ở thời điểm 48 giờ và được lặp lại 8 lần.

(iii) Do CDDO nhanh chóng gây ra sự sai lệch protein ty thể và cũng làm thay đổi biểu

hiện gen của protein chaperone (Zou & cs., 2008), nên chúng tôi tiếp tục tiến hành đánh giá độc tính khi có mặt của CDDO đối với dòng tế bào HEK293. Dòng tế bào HEK293 được thử với chất CDDO ở 2 nồng độ 1 và 3µM ở thời điểm 48 giờ và được lặp lại 3 lần;

(iv) Các bằng chứng trước đây đã chỉ ra UPRmt được kích hoạt để tăng chuyển hóa glucose và giảm tổng hợp protein và tạo ROS (Fernandes & cs., 2020). Để tìm ra các yếu tố tiềm năng điều chỉnh tăng tín hiệu UPRmt *in vitro*, nghiên cứu này tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của glucose đến chức năng ty thể và sàng lọc cho cảm ứng Hspa9, Hspd1 và ATF5 trên dòng tế bào HEK293. Dòng tế bào HEK293 nuôi trong đĩa trong dung dịch DMEM nồng độ glucose thấp 1 g/l và dung dịch DMEM nồng độ glucose cao 4 g/l ở thời điểm 48 giờ và được lặp lại 3 lần.

2.2.2. Phương pháp tách chiết ARN

ARN tổng số được tách từ cặn tế bào sau khi bổ sung hóa chất tại các thời điểm bởi Sepasol-RNA 1 Super G kit (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), với các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, các bước thực hiện như sau:

(i) Ly giải mẫu: Cặn tế bào được trộn đều trong 250µl dung dịch Sepasol. Vortex trong 5 phút. Sau đó thêm 50µl Chloroform và ủ trong vòng 3 phút ở nhiệt độ phòng. Dung dịch ly tâm 12.000 vòng/15 phút, ở nhiệt độ 4°C.

(ii) Thu 150µl dịch nổi và thêm vào 2µl linear acrylamide và 220µl isopropanol. Vortex

và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm 15.000 vòng/10 phút;

(iii) Cặn thu được thêm 250 μ l 75% ethanol và ly tâm 15.000 vòng/5 phút;

(iv) Cặn thu được tiếp tục được bổ sung 8 μ l nước với 1 μ l DNase và 1 μ l DNase buffer. Ủ 37°C/30 phút. Sau đó, thêm vào 45 μ l vào cặn thu được;

(v) Tách pha ARN bằng PCI (phenol-chloroform-isoamyl, 25:24:1): Bổ sung 55 μ l dung dịch PCI vào ống mẫu sau khi ly giải. Vortex hỗn hợp rồi ly tâm 15.000 vòng/5 phút, ở nhiệt độ 4°C;

(vi) Tủa ARN: Dùng ống Eppendorf mới, trộn 5 μ l 3M Kali acetat + 125 μ l 100% ethanol + 50 μ l dịch nổi phía trên. Tủa ARN ở 37°C/10 phút. Ly tâm, 15.000 vòng/10 phút;

(vii) Rửa tủa ARN: Rửa mẫu bằng 150 μ l ethanol 75% (pha trong nước cất đã xử lý DEPC). Ly tâm, 12.000 vòng/5 phút, ở nhiệt độ 4°C. Loại bỏ hết cồn. hong khô ở nhiệt độ phòng trong 15 phút;

(viii) Hòa tan tủa ARN: Tủa ARN được hòa tan trong 15 μ l nước, ủ ở 55°C/10 phút;

(ix) Đo nồng độ tổng số ARN.

2.2.3. Phương pháp real-time qPCR định lượng mức độ biểu hiện mARN của gen Hspd1, Hspa9, ATF5

Complementary DNA (cDNA) được tổng hợp bằng HighCapacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). qPCR được thực hiện bằng bộ kit Thunderbird SYBR qPCR (Toyobo Life Science, Osaka, Nhật Bản) trong máy chu trình nhiệt Thermal Cycler Dice (Real Time System TP800, Takara Bio Inc., Shiga, Nhật Bản). Thành phần phản ứng qPCR được phối trộn theo hướng dẫn của nhà sản xuất, trong đó: 1 μ l mỗi xuôi (5pmol) mỗi loại + 1 μ l mỗi ngược mỗi loại (5pmol) + 5 μ l cDNA mẫu tách chiết + 10 μ l master mix + và cho nước để tổng thể tích cuối là 20 μ l. Mức độ biểu hiện của mỗi gen đã được chuẩn hóa bởi housekeeping gen GAPDH và được biểu thị dưới dạng đơn vị biểu hiện tương đối (%).

2.2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích bằng phần mềm PrismGraph 4.0 (GraphPad, La Jolla, CA, Mỹ). Việc xử lý mức độ biểu hiện của các gen sau khi chạy qPCR theo phương pháp định lượng tương đối $2^{-\Delta\Delta Ct}$ của Livak (Livak & Schmittgen, 2001). So sánh sự khác biệt giữa hai nhóm được đánh giá bằng student's *t* test. Phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định Bonferroni được thực hiện để so sánh các giá trị trung bình giữa ba nhóm. Sự khác biệt với $P < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

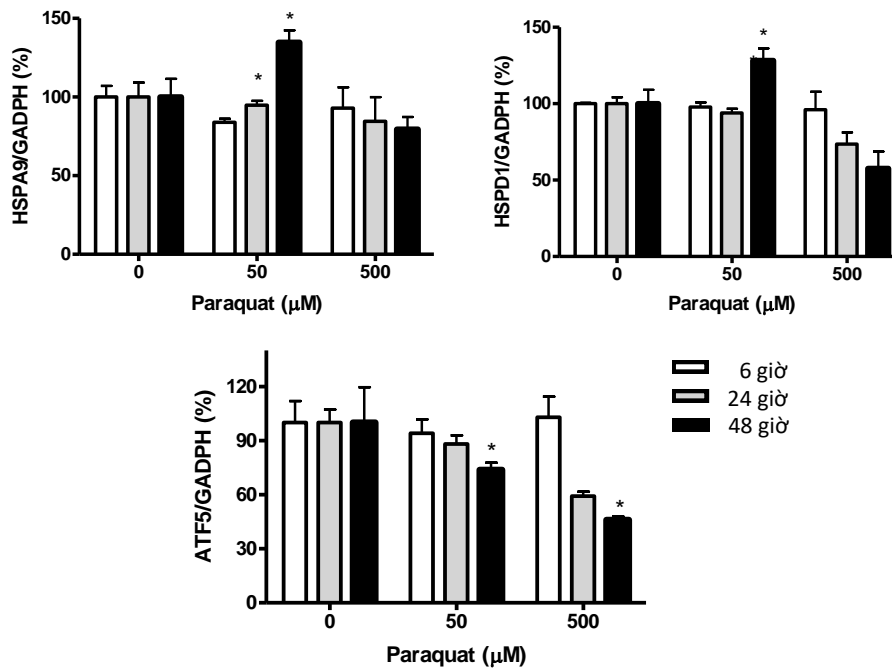
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Biểu hiện mARN của các gen Hsp9, Hspd1 và ATF5 dưới điều kiện stress ty thể in vitro của Paraquat trên tế bào NIH3T3 và HEK293

Kết quả biểu hiện mARN của các gen Hspa9, Hspd1 và ATF5 *in vitro* trên tế bào NIH3T3 với chất gây cảm ứng là Paraquat được thể hiện ở hình 1. Kết quả cho thấy, việc bổ sung PQ làm tăng mức độ biểu hiện mARN của Hspd1 và Hspa9 và làm giảm mức độ biểu hiện của ATF5 ở nồng độ 50 μ m sau 48 giờ. Tuy nhiên, khi PQ được sử dụng ở nồng độ 500 μ m thì mức độ biểu hiện của ATF5 giảm đáng kể, trong khi đó sự thay đổi biểu hiện của Hspa9, Hspd1 không có ý nghĩa thống kê sau 48 giờ bổ sung.

Kết quả khảo sát tiếp dòng tế bào nào phù hợp sự biểu hiện của các dấu hiệu UPRmt *in vitro* dưới điều kiện stress ty thể với tế bào HEK293 được thể hiện ở hình 2. Kết quả cho thấy, việc bổ sung PQ ở nồng độ 50 μ m làm giảm mức độ biểu hiện Hspa9, Hspd1 và tăng mức độ biểu hiện ATF5. Đáng lưu ý, chúng tôi cũng quan sát hiện tượng tương tự và xảy ra rõ rệt hơn ở dòng tế bào HEK293 khi so sánh với dòng tế bào NIH3T3 mặc dù nồng độ PQ bổ sung thấp hơn. Mặc dù cơ chế chính xác gây độc tế bào của PQ vẫn chưa rõ ràng, nhưng người ta đã nhận ra rằng PQ gây ra tác dụng độc hại thông qua việc can thiệp vào hệ thống chuyển điện tử nội bào và sau đó tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS) dẫn đến stress oxy hóa (Dinis-Oliveira & cs., 2008).

Phân tích *in vitro* của phản ứng protein mở ra của ty thể và biểu hiện của HSPA9, HSPD1 và ATF5 thông qua sử dụng các mô hình nuôi cấy tế bào

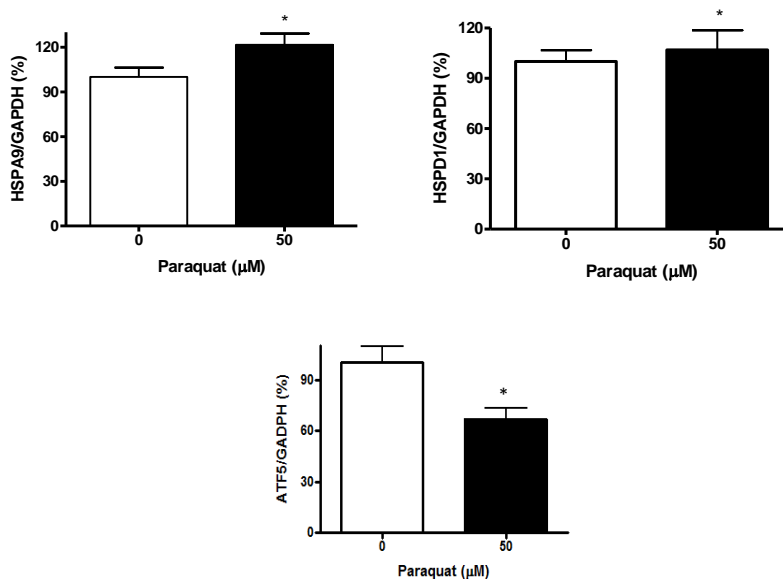


Ghi chú: *: $P < 0,05$.

Hình 1. Kết quả định lượng mRNA của Hspa9, Hspd1 và ATF5 khi có mặt của Paraquat ở các nồng độ khác nhau sau 6, 24 và 48 giờ trên tế bào NIH3T3 (n = 3)

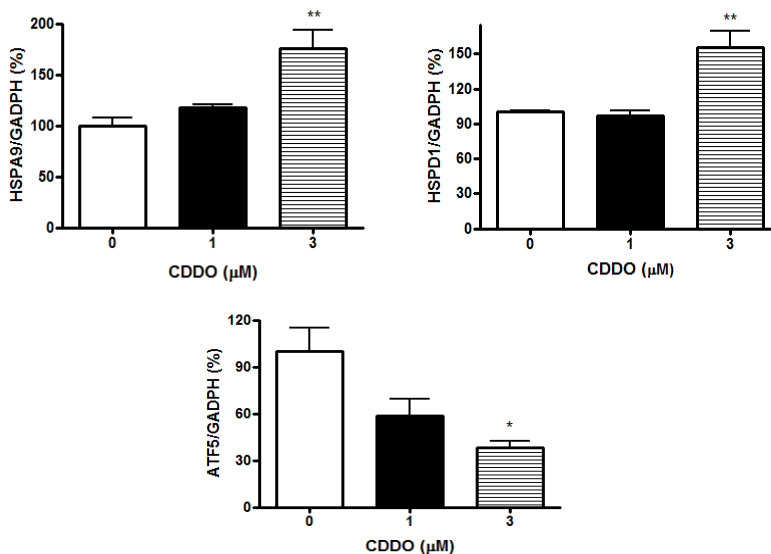
PQ được biết đến là một chất tiền oxy hóa mạnh tạo ra các loại oxy phản ứng ty thể tại chỗ ở chuỗi hô hấp (Bus & cs., 1976; Cocheme & Murphy, 2008). Ở người, việc tiếp xúc môi trường lâu dài với dư lượng PQ được sử dụng làm thuốc trừ sâu có liên quan đến sự phát triển của bệnh Parkinson (Berry & cs., 2010), trong khi trong một số ít trường hợp ngộ độc PQ cấp tính ở liều cao hơn cũng đã được báo cáo về tính chất gây độc ở đa cơ quan và thậm chí có thể gây tử vong (Yu & cs., 2014). Cụ thể, độc tính là do tổn thương phổi cấp tính hoặc xơ phổi tiến triển ở người vì PQ chủ yếu tích tụ trong mô phổi sau khi ngộ độc (Dinis-Oliveira & cs., 2008). Hiện nay, tỷ lệ tử vong do ngộ độc PQ sau khi uống là khoảng 90% do thiếu các biện pháp điều trị y tế đặc hiệu (Sun & Chen, 2016). Trong các thí nghiệm *in vitro*, PQ liều cao (~ 20-80 mg/kg) đã được sử dụng rộng rãi ở loài gặm nhấm để gây ra stress oxy hóa cấp tính ở tim (Wang & cs., 2016) và ở phổi (Liu & cs., 2018). Do đó, cần nhiều nghiên cứu tiếp theo để có thể mở ra hướng mới về sự phát triển của các tác nhân trị liệu để có thể ứng dụng trong việc giảm bớt tổn thương ở phổi hoặc tim do PQ gây ra.

Đáng lưu ý, dòng tế bào NIH3T3 là dòng tế bào nguyên bào sợi được phân lập từ phôi của chuột nhắt trắng, trong khi đó dòng tế bào HEK293 có nguồn gốc từ tế bào thận phôi người. Trong nghiên cứu này, sự biểu hiện của các gen Hspd1, Hspa9, ATF5 chỉ được quan sát rõ rệt ở nồng độ 50μm sau 48 giờ bổ sung Paraquat. Vì vậy, dữ liệu cho thấy rằng kết quả của nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu trên và chỉ ra rằng dòng tế bào NIH3T3 không phù hợp để có thể đánh giá sự biểu hiện của các dấu hiệu UPRmt đã biết *in vitro* dưới điều kiện stress ty thể. Tuy chung lại, những dữ liệu này đề xuất một cơ chế tương tự của ATF5 ở động vật có vú với ATFS-1 ở giun tròn *C. elegans*, nơi stress của ty thể được cảm nhận thông qua hiệu quả nhập bào của ATFS-1 (Nargund & cs., 2012) và có sự biểu hiện nghịch chiều nhau với sự biểu hiện của các dấu hiệu UPRmt đã biết như Hspd1, Hspa9 và ATF5 *in vitro* dưới điều kiện stress ty thể. Vì vậy, thông qua kết quả trên, chúng tôi khuyến cáo nên sử dụng dòng tế bào HEK293 thay vì dòng tế bào NIH3T3 để đánh giá mức độ biểu hiện của các gen được khảo sát dưới điều kiện stress ty thể.



Ghi chú: *: $P < 0,05$.

Hình 2. Kết quả định lượng mRNA của Hspa9, Hspd1 và ATF5 khi có mặt của Paraquat ở các nồng độ 50 μM sau 48 giờ trên tế bào HEK293 (n = 8)



Ghi chú: *: $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Hình 3. Kết quả định lượng mRNA của Hspa9, Hspd1 và ATF5 khi bổ sung CDDO ở các nồng độ khác nhau sau 48 giờ trên dòng tế bào HEK293 (n = 3)

3.2. Định lượng mRNA các gen Hspa9, Hspd1 và ATF5 dưới điều kiện stress ty thể *in vitro* của CDDO trên tế bào HEK293

Kết quả ở hình 3 cho thấy, mức độ biểu hiện mRNA thay đổi phụ thuộc vào nồng độ CDDO. Có sự tăng mức độ biểu hiện của Hspa9, Hspd1 tại

nồng độ 3μm. Tuy nhiên, mức độ mRNA ATF5 có sự giảm đáng kể với cùng nồng độ CDDO.

Theo hiểu biết của chúng tôi, vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về vai trò của UPRmt. Hiện nay, protein chaperone ty thể Hspa9, Hspd1 được báo cáo là có sự biểu hiện cao dưới điều kiện nuôi cấy tế bào thông thường trong các loại

Phân tích *in vitro* của phản ứng protein mở ra của ty thể và biểu hiện của HSPA9, HSPD1 và ATF5 thông qua sử dụng các mô hình nuôi cấy tế bào

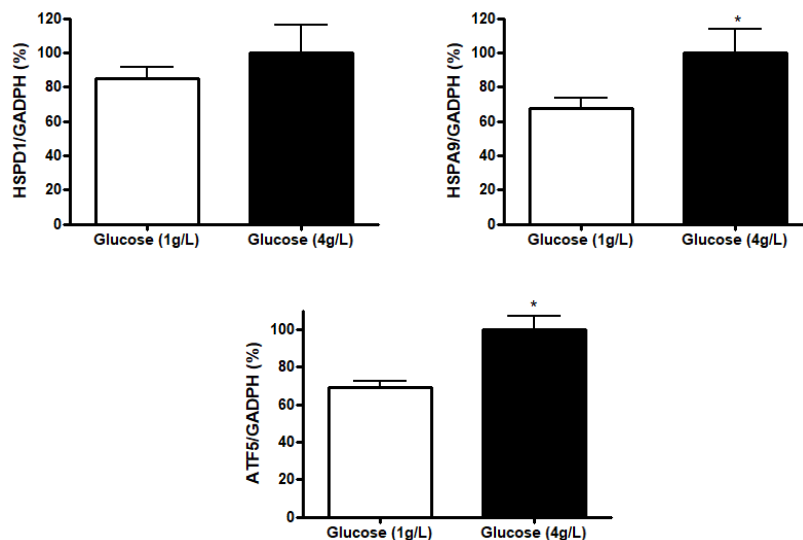
tế bào khác nhau (Stetler & cs., 2010). Nhiều lập luận cho rằng các tế bào tăng sinh cao liên tục và có sự biểu hiện protein chaperone ty thể ở mức độ cao khi chúng tham gia để thúc đẩy sự chết tế bào theo chương trình trên phạm vi rộng (Havalova & cs., 2021).

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng CDDO triterpenoid tổng hợp và các dẫn xuất của nó thúc đẩy quá trình chết theo chương trình của tế bào bạch huyết lympho B thông qua một con đường mới qua trung gian ty thể liên quan đến sự tổng hợp protein của ty thể (Brookes & cs., 2007). Cùng với đó, dữ liệu cho thấy LON là mục tiêu sinh lý của CDDO và là mục tiêu protein ty thể cụ thể đầu tiên của hợp chất này được xác định. Các kết quả chứng minh rằng CDDO và các dẫn xuất của nó ngăn chặn một cách có chọn lọc và trực tiếp hoạt động protease của LON (Bernstein & cs., 2012). Bên cạnh đó, CDDO và các dẫn xuất của nó ức chế trực tiếp và có chọn lọc quá trình phân giải protein qua trung gian LON. Mặc dù các hợp chất này ngăn chặn LON ty thể, nhưng chúng thể hiện rất ít tác dụng ức chế đối với enzyme proteasome 20S. Hơn nữa, kết quả của nghiên cứu đó cho thấy rằng cơ chế cơ bản của sự ức chế LON là do sự hình thành các chất cộng hợp giữa CDDO và LON. Các dữ liệu cũng chỉ ra rằng các

tế bào ung thư hạch tế bào lớp phủ Granta biểu hiện các thể dày đặc điện tử đặc biệt trong ty thể nhưng không có trong các ngăn tế bào khác khi tiếp xúc với liều CDDO dẫn đến phản ứng cộng LON-CDDO và gây chết tế bào ung thư hạch. Kiểu hình tương tự này được quan sát thấy trong một dòng tế bào ung thư biểu mô ruột kết bị knock-down gen đối với LON (Bernstein & cs., 2012). Tựu chung lại, dữ liệu trên đề xuất rằng sự ức chế LON góp phần gây ra sự chết của tế bào ung thư hạch do CDDO và LON ty thể là một mục tiêu tiềm năng mới cho phương pháp điều trị chống ung thư trong tương lai.

3.3. Định lượng mRNA các gen Hspa9, Hspd1 và ATF5 dưới điều kiện stress ty thể *in vitro* trên tế bào HEK293 khi bổ sung nồng độ thấp glucose (1 g/l) và nồng độ cao glucose (4 g/l)

Hình 4 cho thấy, mức độ biểu hiện mRNA thay đổi cũng phụ thuộc vào nồng độ glucose. Kết quả thể hiện rõ sự tăng mức độ biểu hiện của Hspa9 và ATF5 tại nồng độ 4 g/l glucose. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của Hspd1 không có sự thay đổi đáng kể. Kết quả cho thấy, nồng độ glucose có ảnh hưởng trực tiếp đến tín hiệu UPRmt *in vitro*.



Ghi chú: *: $P < 0,05$.

Hình 4. Kết quả định lượng mRNA của Hspa9, Hspd1 và ATF5 khi sử dụng ở nồng độ glucose thấp (1 g/l) và glucose cao (4 g/l) sau 48 giờ trên tế bào HEK293 (n = 3)

Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, não bộ động vật có vú sử dụng nhiều glucose để tiêu thụ năng lượng. Rối loạn chuyển hóa ở não bộ đã được quan sát thấy ở những bệnh nhân bị suy giảm nhận thức nhẹ với tác động của sự tham gia vận chuyển glucose bị suy yếu, rối loạn chức năng ty thể và phản ứng stress UPR (Croteau & cs., 2018; Weise & cs., 2018). Kết quả từ nghiên cứu này chỉ ra rằng, nồng độ glucose có ảnh hưởng rõ rệt đến UPRmt. Do vậy, việc bổ sung glucose ở nồng độ thấp có thể giúp giảm thiểu mức độ stress ty thể. Tuy nhiên, do số lượng mẫu lặp lại trong nghiên cứu này còn thấp nên cần có nhiều nghiên cứu tiếp theo để làm sáng tỏ ảnh hưởng của glucose đối với stress ty thể.

4. KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu trên đã chứng minh rằng dòng tế bào NIH3T3 không phù hợp làm chỉ số đọc cho cảm ứng UPRmt *in vitro*. Hơn nữa, nghiên cứu này cung cấp bằng chứng rằng mức độ của yếu tố phiên mã ATF5 biểu hiện nghịch chiều với sự biểu hiện của các dấu hiệu UPRmt Hspa9, Hspd1 *in vitro* dưới điều kiện stress ty thể khi sử dụng PQ và CDDO. Bên cạnh đó, nồng độ glucose có ảnh hưởng trực tiếp đến tín hiệu phản ứng protein mở ra của ty thể *in vitro*. Dòng tế bào HEK293 được khuyến cáo sử dụng để đánh giá mức độ biểu hiện của các gen được khảo sát dưới điều kiện stress ty thể. Kết quả của nghiên cứu này sẽ là cơ sở để hiểu rõ hơn về cơ chế phân tử của phản ứng protein mở ra của ty thể ở động vật có vú và có thể là hướng mới để phát triển các liệu pháp để chữa các rối loạn ty thể trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bernstein S.H., Venkatesh S., Li M., Lee J., Lu B., Hilchey S.P., Morse K.M., Metcalfe H.M., Skalska J., Andreeff M., Brookes P.S. & Suzuki C.K. (2012). The mitochondrial ATP-dependent Lon protease: a novel target in lymphoma death mediated by the synthetic triterpenoid CDDO and its derivatives. *Blood*. 119(14): 3321-3329.
- Berry C., La Vecchia C. & Nicotera P. (2010). Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ*. 17(7): 1115-1125.
- Bresciani N., Demagny H., Lemos V., Pontanari F., Li X., Sun Y., Li H., Perino A., Auwerx J. & Schoonjans K. (2022). The Slc25a47 locus is a novel determinant of hepatic mitochondrial function implicated in liver fibrosis. *J Hepatol*. 77(4): 1071-1082.
- Brookes P.S., Morse K., Ray D., Tompkins A., Young S.M., Hilchey S., Salim S., Konopleva M., Andreeff M., Phipps R. & Bernstein S. H. (2007). The triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid and its derivatives elicit human lymphoid cell apoptosis through a novel pathway involving the unregulated mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Res*. 67(4): 1793-1802.
- Burbulla L.F., Schelling C., Kato H., Rapaport D., Weitalla D., Schiesling C., Schulte C., Sharma M., Illig T., Bauer P., Jung S., Nordheim A., Schols L., Riess O. & Kruger R. (2010). Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis. *Hum Mol Genet*. 19(22): 4437-4452.
- Bus J.S., Aust S.D. & Gibson J.E. (1976). Paraquat toxicity: proposed mechanism of action involving lipid peroxidation. *Environ Health Perspect*. 16: 139-146.
- Castello P.R., Drechsel D.A. & Patel M. (2007). Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. *J Biol Chem*. 282(19): 14186-14193.
- Cocheme H.M. & Murphy M.P. (2008). Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem*. 283(4): 1786-1798.
- Croteau E., Castellano C.A., Fortier M., Bocti C., Fulop T., Paquet N. & Cunnane S.C. (2018). A cross-sectional comparison of brain glucose and ketone metabolism in cognitively healthy older adults, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 107: 18-26.
- Dinis-Oliveira R.J., Duarte J.A., Sanchez-Navarro A., Remiao F., Bastos M.L. & Carvalho F. (2008). Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Crit Rev Toxicol*. 38(1): 13-71.
- Fernandes V., Choudhary M., Kumar A. & Singh S.B. (2020). Proteotoxicity and mitochondrial dynamics in aging diabetic brain. *Pharmacol Res*. 159: 104948.
- Gaither K.A., Watson C.J.W., Madarampalli B. & Lazarus P. (2020). Expression of activating transcription factor 5 (ATF5) is mediated by microRNA-520b-3p under diverse cellular stress in cancer cells. *PLoS One*. 15(6): e0225044.

- Hansen J.J., Durr A., Cournu-Rebeix I., Georgopoulos C., Ang D., Nielsen M.N., Davoine C.S., Brice A., Fontaine B., Gregersen N. & Bross P. (2002). Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet.* 70(5): 1328-1332.
- Havalova H., Ondrovicova G., Keresztesova B., Bauer J.A., Pevala V., Kutejova E. & Kunova N. (2021). Mitochondrial HSP70 Chaperone System-The Influence of Post-Translational Modifications and Involvement in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 22(15): 8077.
- Haynes C.M. & Ron D. (2010). The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *J Cell Sci.* 123(Pt 22): 3849-3855.
- Houtkooper R.H., Mouchiroud L., Ryu D., Moullan N., Katsyuba E., Knott G., Williams R. W. & Auwerx J. (2013). Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature.* 497(7450): 451-457.
- Jensen M.B. & Jasper H. (2014). Mitochondrial proteostasis in the control of aging and longevity. *Cell Metab.* 20(2): 214-225.
- Kambe Y., Yamauchi Y., Thanh Nguyen T., Thi Nguyen T., Ago Y., Shintani N., Hashimoto H., Yoshitake S., Yoshitake T., Kehr J., Kawamura N., Katsuura G., Kurihara T. & Miyata A. (2021). The pivotal role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide for lactate production and secretion in astrocytes during fear memory. *Pharmacol Rep.* 73(4): 1109-1121.
- Liu Y., Li Z., Xue X., Wang Y., Zhang Y. & Wang J. (2018). Apigenin reverses lung injury and immunotoxicity in paraquat-treated mice. *Int Immunopharmacol.* 65: 531-538.
- Livak K.J. & Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4): 402-408.
- Lock E.A. & Wilks M.F. (2010). Chapter 83 - Paraquat. In: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition). Krieger R. (ed.). Academic Press New York. pp. 1771-1827.
- Nargund A.M., Pellegrino M.W., Fiorese C.J., Baker B.M. & Haynes C.M. (2012). Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science.* 337(6094): 587-590.
- Pellegrino M.W., Nargund A.M. & Haynes C.M. (2013). Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta.* 1833(2): 410-416.
- Runkel E.D., Liu S., Baumeister R. & Schulze E. (2013). Surveillance-activated defenses block the ROS-induced mitochondrial unfolded protein response. *PLoS Genet.* 9(3): e1003346.
- Stetler R. A., Gan Y., Zhang W., Liou A. K., Gao Y., Cao G. & Chen J. (2010). Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 92(2): 184-211.
- Sun B. & Chen Y.G. (2016). Advances in the mechanism of paraquat-induced pulmonary injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 20(8): 1597-1602.
- Wang J., Lu S., Zheng Q., Hu N., Yu W., Li N., Liu M., Gao B., Zhang G., Zhang Y. & Wang H. (2016). Cardiac-Specific Knockout of ETA Receptor Mitigates Paraquat-Induced Cardiac Contractile Dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.* 16(3): 235-243.
- Weise C. M., Chen K., Chen Y., Kuang X., Savage C.R., Reiman E.M. & Alzheimer's Disease Neuroimaging I. (2018). Left lateralized cerebral glucose metabolism declines in amyloid-beta positive persons with mild cognitive impairment. *Neuroimage Clin.* 20: 286-296.
- Yoneda T., Benedetti C., Urano F., Clark S.G., Harding H.P. & Ron D. (2004). Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J Cell Sci.* 117(Pt 18): 4055-4066.
- Yu G., Kan B., Jian X., Wang J., Sun J. & Song C. (2014). A case report of acute severe paraquat poisoning and long-term follow-up. *Exp Ther Med.* 8(1): 233-236.
- Zou W., Yue P., Khuri F.R. & Sun S.Y. (2008). Coupling of endoplasmic reticulum stress to CDDO-Me-induced up-regulation of death receptor 5 via a CHOP-dependent mechanism involving JNK activation. *Cancer Res.* 68(18): 7484-7492.