

# BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU CƠ CHẾ BẢO VỆ PHÂN TỬ CỦA DỊCH CHIẾT TỔNG SỐ TÁCH TỪ RONG BIỂN *Ulva reticulata* THU TẠI NHA TRANG, KHÁNH HÒA, VIỆT NAM TRONG MÔ HÌNH BỆNH ALZHEIMER TRÊN DÒNG TẾ BÀO THẦN KINH C6

Nguyễn Mạnh Đạt<sup>1,3</sup>, Lê Thị Thơm<sup>1</sup>, Ngô Thị Hoài Thu<sup>1\*</sup>, Nguyễn Cẩm Hà<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Trữ<sup>1</sup>, Trần Mai Đức<sup>4</sup>, Đặng Diễm Hồng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

<sup>4</sup>Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Nha Trang, Khánh Hòa

## TÓM TẮT

Bệnh Alzheimer là dạng phổ biến nhất của bệnh sa sút trí tuệ gây nhiều ca tử vong và gánh nặng kinh tế cho xã hội. Cho đến nay, cơ chế cụ thể về con đường sinh bệnh của bệnh này vẫn chưa được làm sáng tỏ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng bảo vệ thần kinh của dịch chiết cồn 75% tách từ loài rong biển *Ulva reticulata* (UE75S) có hỗ trợ của sóng siêu âm ở mô hình bệnh Alzheimer trên dòng tế bào thần kinh C6 và các kết quả bước đầu nghiên cứu về cơ chế bảo vệ phân tử của dịch chiết này thông qua điều chỉnh biểu hiện của một số các gen tham gia vào một số con đường trao đổi chất của tế bào. Kết quả cho thấy, dịch chiết UE75S không gây độc cho tế bào ở các nồng độ thử nghiệm từ 10 đến 400  $\mu\text{g/mL}$ . Trong đó, các nồng độ 100, 200, 300 và 400  $\mu\text{g/mL}$  có tác dụng bảo vệ khỏi độc tính tế bào cảm ứng bởi amyloid  $\beta$ -Protein Fragment 25-35 ( $A\beta_{25-35}$ ) và  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tỷ lệ tế bào sống sót dao động khoảng 62,5% đến 84,7% so với nhóm mô hình 62,4% (cảm ứng bằng  $A\beta_{25-35}$ ) và 65,5% (cảm ứng bằng  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Hơn nữa, phân tích realtime PCR cho thấy tác dụng bảo vệ thần kinh của dịch chiết UE75S là do sự điều hòa mức độ biểu hiện của các gen liên quan tới tích lũy  $A\beta$  (*APP*, *BACE1* và *BACE2*), cũng như tăng cường mức độ biểu hiện của các gen sinh tổng hợp acetylcholine (*VACHT* và *CHAT*) và các gen liên quan đến các enzyme chống oxy hóa (*GPx*, *CAT* và *SOD*). Vì vậy, dịch chiết cồn 75% tách từ rong *U. reticulata* là nguồn nguyên liệu tiềm năng để nghiên cứu sâu cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng bảo vệ thần kinh cho con người.

**Từ khóa:** Alzheimer, amyloid  $\beta$ -Protein Fragment 25-35 ( $A\beta_{25-35}$ ), bảo vệ thần kinh, rong biển, *Ulva reticulata*.

## MỞ ĐẦU

Từ lâu, rong biển đã được sử dụng làm nguyên liệu cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe và được phẩm tiềm năng cho con người. Việt Nam hiện có khoảng hơn 800 loài rong biển, trong đó nhiều loài có giá trị kinh tế cao thuộc các ngành rong đỏ (Rhodophyta), rong lục (Chlorophyta) và rong nâu (Ochrophyta-Phaeophytaceae) (Dang *et al.*, 2019). Rong lục *Ulva reticulata* là một trong những loài rong biển kinh tế tiềm năng đã được ứng dụng rộng rãi và khai thác với sản lượng lớn. Sinh khối loài rong này rất giàu các hợp chất thứ cấp có giá trị cao như ulvan, carotenoid, polyphenols, polysaccharide, chlorophyll và melatonin. Do đó, việc nghiên cứu tách chiết và sàng lọc các chất/hợp chất có hoạt tính sinh học cao từ loài rong này đang được tập trung nghiên cứu.

Bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease-AD) là một bệnh thoái hóa thần kinh đặc trưng bởi trạng thái mất trí nhớ phát triển xảy ra ở giai đoạn giữa và cuối đời gây ra sự suy giảm và vô hiệu hóa chức năng nhận thức (Kumar *et al.*, 2024). Bệnh liên quan chặt chẽ đến một số yếu tố như tuổi tác, di truyền, chấn thương đầu, bệnh mạch máu, nhiễm trùng và các yếu tố môi trường khác. Theo World Alzheimer Report 2019, có 50 triệu người mắc bệnh sa sút trí tuệ trên toàn thế giới và đến năm 2050 ước tính con số này sẽ lên tới 115 triệu người. Tại Việt Nam, theo số liệu từ Viện Sức khỏe tâm thần Quốc gia thông báo số người mắc bệnh sa sút trí tuệ năm 2015 là 660.000 người, chiếm 52% các ca bệnh lý liên quan tới thần kinh ở người cao tuổi. Hiện nay, các loại thuốc đã được thương mại hóa trên thị trường chỉ có tác dụng làm chậm tiến triển của bệnh chứ không thể chữa khỏi bệnh, đồng thời, chúng còn đi kèm nhiều tác dụng phụ không mong muốn cho người bệnh. Do vậy, tập trung nghiên cứu các hợp chất tự nhiên có giá trị, giàu dinh dưỡng, có tác dụng bảo vệ thần kinh nhưng không hoặc ít gây ra tác dụng phụ là một hướng đi phù hợp, đặc biệt với một quốc gia biển như Việt Nam. Hiện nay, cơ chế cụ thể trong con đường sinh bệnh của AD vẫn chưa được tìm hiểu rõ. Một số giả thuyết chính mô tả cơ chế sinh bệnh gồm giả thuyết cholinergic, giả thuyết tăng cường kích thích gây ra bởi glutamate, giả thuyết  $\beta$ -amyloid, giả thuyết TAU, giả thuyết viêm và giả thuyết stress oxy hóa (Kumar *et al.*, 2018). Sự tích tụ  $A\beta$  là một trong những nguyên

nhân chính gây AD. Chúng được sản xuất thông qua sự phân cắt của amyloid precursor protein (APP) bởi beta-site APP-cleaving enzyme 1 và 2 (BACE1 và BACE2) (Chen *et al.*, 2021b). Tế bào thường có cơ chế trung hòa gốc tự do bằng các enzyme glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) và superoxide dismutase (SOD) nhưng khi mức ROS (reaction oxygen species) mạnh hơn so với hoạt động của hệ thống enzyme chống oxy hóa thì quá trình stress oxy hóa sẽ xảy ra (Martins *et al.*, 2022). Choline acetyltransferase (ChAT) và vesicle acetylcholine transporter (VAcHT) là các protein chuyên biệt chịu trách nhiệm tổng hợp, lưu trữ và giải phóng acetylcholine - một chất dẫn truyền thần kinh liên quan đến nhận thức. Thúc đẩy sự biểu hiện của các gen *ChAT* và *VAcHT* là một chiến lược để bảo vệ tế bào thần kinh hiệu quả (Chen *et al.*, 2021b). Một số gen có thay đổi mức độ biểu hiện ở trong AD cũng đã được công bố (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2023; Lin *et al.*, 2008). Lưu Thị Tâm và đồng tác giả (2022) đã sàng lọc được dịch chiết cồn 75% từ loài rong biển *U. reticulata* có hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh C6 khi bị cảm ứng bằng tác nhân A $\beta_{25-25}$  trên mô hình AD cũng như hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE), có tác dụng bảo vệ thần kinh. Vì vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi xin trình bày kết quả bước đầu nghiên cứu cơ chế bảo vệ phân tử của dịch chiết này trên dòng tế bào thần kinh C6.

## NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Nguyên liệu:** Sinh khối khô rong biển *Ulva reticulata* (Forssk), 1775 được thu thập tại vùng biển Khánh Hoà, Việt Nam từ tháng 2 đến tháng 4 năm 2022 (Hình 1) do ThS. Trần Mai Đức (Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang) cung cấp và định danh tên khoa học dựa trên đặc điểm hình thái. Dịch chiết từ sinh khối *U. reticulata* bằng ethanol 75% (E75) có sử dụng siêu âm (S) theo công bố của Lưu Thị Tâm và đồng tác giả (2022) ký hiệu là UE75S được sử dụng trong nghiên cứu này.

**Dòng tế bào:** Dòng tế bào u thần kinh đệm chuột C6 (C6 rat glioma cell line, American Type Culture Collection – ATCC, cat. No. CCL-107). Tế bào được nuôi cấy trong tủ nuôi cấy vô trùng 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, trong môi trường DMEM/high glucose bổ sung thêm 10% FBS, 100 U/mL penicillin và 0,1 mg/mL streptomycin.



Hình 1. Hình thái rong *U. reticulata* (A), sinh khối rong tươi (B) và sinh khối khô (C) thu tại Hòn Chông, Nha Trang, Khánh Hoà năm 2022

**Hoá chất:** Hóa chất dùng để nuôi cấy tế bào: môi trường nuôi cấy Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/high glucose, Fetal bovine serum (FBS), penicillin và streptomycin (Invitrogen, Mỹ), Trypsin-EDTA 0,25% (Gibco, Mỹ). Nghiên cứu còn sử dụng: 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Invitrogen, Mỹ), galantamine hydrobromid (Sopharma AD, Bulgaria); A $\beta_{25-35}$  (độ tinh sạch  $\geq 97\%$ , No. A.4559; Sigma, Mỹ), TRIZOL™ Reagent (Invitrogen, Singapore), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma, Mỹ) và các hóa chất thông dụng khác.

## Phương pháp

**Xác định hoạt tính bảo vệ thần kinh chống lại độc tính trên dòng tế bào C6 cảm ứng bởi A $\beta_{25-35}$ :** Hoạt tính bảo vệ tế bào chống lại độc tính gây ra bởi A $\beta_{25-35}$  trên dòng tế bào thần kinh C6 của các dịch chiết được tiến hành như mô tả của Lưu Thị Tâm và đồng tác giả (2022). Dịch chiết được sử dụng ở các nồng độ 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300 và 400  $\mu\text{g/mL}$ . Công thức đối chứng sử dụng là ethanol 75% (EtOH). Chất chuẩn galantamine 100  $\mu\text{g/mL}$  được sử dụng làm đối chứng dương.

**Xác định hoạt tính bảo vệ thần kinh chống lại tổn thương do stress oxy hoá gây ra bởi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trên dòng tế bào thần kinh C6:** Để đánh giá khả năng bảo vệ chống lại stress oxy hóa gây bởi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> của mẫu thử, tế bào C6 được nuôi cấy 24 giờ trong đĩa nuôi cấy 96 giếng có chứa môi trường DMEM/high glucose ở mật độ  $1 \times 10^5$  tế bào/giếng. Sau 24 giờ, tiến hành loại bỏ môi trường cũ và bổ sung 100  $\mu\text{L}$  mỗi trường DMEM/high glucose mới và bổ sung 1  $\mu\text{L}$  Ethanol (EtOH) hoặc 1  $\mu\text{L}$  dịch chiết của UE75S (với các nồng độ thử nghiệm từ 10 - 400  $\mu\text{g/mL}$ )/ascorbic acid (nồng độ 20  $\mu\text{g/mL}$ ) và tiếp tục nuôi cấy trong 24 giờ. Sau đó, tế bào được bổ sung dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> để đạt nồng độ cuối cùng trong môi trường là 30  $\mu\text{M}$  và tiếp tục nuôi cấy trong 1 giờ. Thí nghiệm có 3 nhóm gồm nhóm đối chứng: EtOH- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; nhóm mô hình EtOH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và nhóm thí nghiệm gồm có dịch chiết UE75S/ ascorbic acid + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hiệu quả bảo vệ tế bào thần kinh C6 được gây tổn thương bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (stress oxy hóa) được đánh giá dựa trên tỷ lệ sống sót của tế bào theo phương pháp 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) với mật độ quang (OD) được đo ở bước

sóng 570 nm. Phần trăm sống sót của tế bào C6 được tính toán theo công thức: % tế bào sống sót =  $[\text{OD}_{570\text{nm}} \text{ thí nghiệm} / \text{OD}_{570\text{nm}} \text{ đối chứng}] \times 100\%$  (Lưu Thị Tâm và cộng sự, 2022).

**Phương pháp xác định tăng sinh tế bào dựa trên chiều dài neurite:** Xác định tăng sinh tế bào thần kinh dựa theo công bố của Agapouda và đồng tác giả (2022). Tế bào C6 ban đầu được gieo vào các đĩa nuôi tế bào 24 giếng, nuôi ở tủ nuôi cấy trong 24 giờ. Sau đó, loại bỏ môi trường cũ và bổ sung 0,5 mL môi trường DMEM +/- có bổ sung dịch chiết UE75S ở các nồng độ 50, 100, 200 và 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sau 24 giờ, tiến hành chụp ảnh các sợi neurite của tế bào thần kinh C6 bằng kính hiển vi quang học (Nikon eclipse Ti, Nhật Bản). Phân tích chiều dài sợi neurite bằng phần mềm ImageJ (Neurophology plugin).

**Phương pháp Real-time polymerase chain reaction (qPCR):** RNA tổng số đã được tách chiết từ các tế bào C6 sử dụng TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Singapore) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các trình tự mỗi nhân gen liên quan tới tích lũy  $\text{A}\beta$  (*APP*, *BACE1* và *BACE2*), các gen sinh tổng hợp acetylcholine (*VACHT* và *CHAT*) và các gen liên quan đến các enzyme chống oxy hóa (*GPx*, *CAT* và *SOD*) do công ty Cổ phần Phù Sa Genomics, Việt Nam cung cấp và được sử dụng cho phản ứng real-time PCR theo công bố của Đặng Diễm Hồng và đồng tác giả (2023) Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 20  $\mu\text{L}$  bao gồm 1  $\mu\text{L}$  cDNA; 2  $\mu\text{L}$  Green buffer (10X); 1,5  $\mu\text{L}$  dNTP (2,5mM); 0,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM); 1  $\mu\text{L}$  mỗi F (10 pmol); 1  $\mu\text{L}$  mỗi R (10 pmol); 0,5  $\mu\text{L}$   $\text{e}\mu\text{L}$ ; 12,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Chu trình nhiệt: 95°C trong 3 phút, 35 chu kỳ: 94°C - 1 phút, 45-60°C (phụ thuộc vào mỗi) - 1 phút, 72°C - 1 phút. 72°C - 10 phút, giữ sản phẩm ở 15°C cho tới khi sử dụng. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2%. Phương pháp Livak ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ) (Livak and Schmittgen, 2001) được sử dụng để so sánh tương đối mức độ biểu hiện gen ở các nồng độ khác nhau.  $\beta$ -actin được sử dụng như là gen nội chuẩn để chuẩn hóa số liệu.

**Xử lý số liệu:** Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phần mềm Microsoft Excel 2016. Số liệu được biểu diễn dưới giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn ( $X \pm \text{SD}$ ). Sự sai khác giữa các mẫu được đánh giá bằng phân tích ANOVA hai yếu tố ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

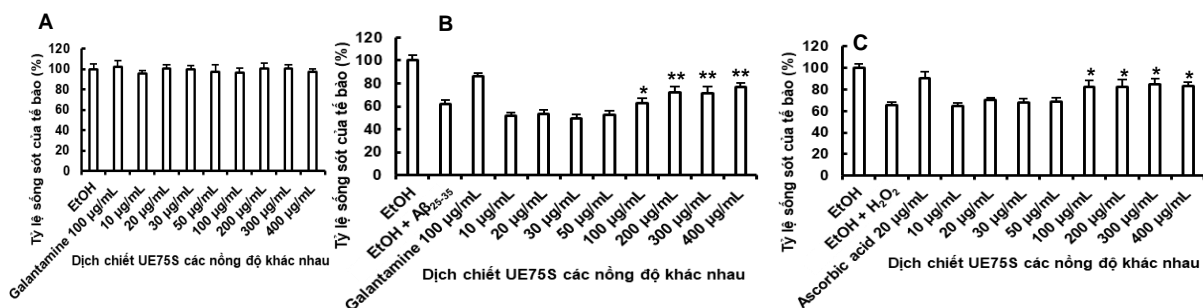
## KẾT QUẢ

### Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh C6 chống lại độc tính gây ra bởi $\text{A}\beta_{25-35}$ và stress oxy hóa gây ra bởi $\text{H}_2\text{O}_2$ ở mô hình bệnh AD của dịch chiết UE75S

Kế thừa kết quả nghiên cứu của Lưu Thị Tâm và đồng tác giả (2022) đã cho thấy, dịch chiết bằng ethanol 75% kết hợp với siêu âm-UE75S tách từ rong *U. reticulata* có các đặc tính dược học tốt bao gồm hoạt tính chống oxy hóa, ức chế AChE và có hoạt tính bảo vệ tế bào chống lại độc tính gây ra bởi  $\text{A}\beta_{25-35}$  ở nồng độ từ 50-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Trong nghiên cứu này, hoạt tính bảo vệ thần kinh khỏi độc tính gây ra bởi  $\text{A}\beta_{25-35}$  và  $\text{H}_2\text{O}_2$  của UE75S ở các nồng độ từ 10 đến 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trên dòng tế bào C6 tiếp tục được đánh giá (Hình 2).

Sự tích tụ protein  $\beta$ -amyloid là một trong những dấu hiệu bệnh lý của bệnh AD. Chúng tạo thành mảng bám làm gây độc trực tiếp lên tế bào thần kinh, chúng làm tăng độ nhạy cảm của tế bào thần kinh đối với những yếu tố có hại như các gốc tự do và stress oxy hoá, cuối cùng tế bào đi vào chết theo chương trình (apoptosis) một cách nhanh chóng.

Kết quả chỉ ra ở Hình 2A cho thấy, sau 24 giờ xử lý với dịch chiết UE75S tại các nồng độ thử nghiệm từ 10 đến 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  đều không gây độc cho tế bào C6. Tỷ lệ sống sót của tế bào C6 được xử lý bằng UE75S ở các nồng độ thử nghiệm dao động từ 95,41 đến 100,81%. Không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm về tỷ lệ sống của tế bào C6 ( $p > 0,05$ ). Kết quả chỉ ra ở Hình 2B cho thấy, khi các tế bào C6 sau 2 giờ cảm ứng bởi  $\text{A}\beta_{25-35}$  đã làm giảm tỷ lệ sống sót của tế bào xuống 62,40% so với công thức đối chứng (các tế bào không được xử lý  $\text{A}\beta_{25-35}$  xem như có tỷ lệ sống sót 100%). Khi có mặt dịch chiết UE75S ở các nồng độ khác nhau đã có ảnh hưởng tích cực tới tỷ lệ sống sót của tế bào C6. Trong đó, các nồng độ 100, 200, 300 và 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  có khả năng bảo vệ tế bào C6 khi cảm ứng bằng  $\text{A}\beta_{25-35}$  với phần trăm tế bào sống sót lần lượt là 62,50; 71,94; 71,70; 76,65% (cao hơn 62,40% ở nhóm mô hình). Galantamine 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  được sử dụng như chất đối chứng dương trong mô hình gây bệnh Alzheimer có khả năng bảo vệ tế bào khỏi độc tính do  $\text{A}\beta_{25-35}$  gây ra với tỷ lệ sống sót của tế bào là 86,22%. Kết quả chỉ ra ở Hình 2C cho thấy, tế bào C6 sau 1 giờ xử lý bằng 30  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  đã làm giảm đáng kể tỷ lệ sống sót của tế bào xuống còn 65,50% (so với 100% của công thức đối chứng - không có  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Các nồng độ 100, 200, 300 và 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  có tác dụng bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa gây ra bởi  $\text{H}_2\text{O}_2$  với tỷ lệ sống sót của tế bào lần lượt là 82,12%; 82,45%; 84,70% và 83,07% (sai số có ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ ). Ascorbic acid - 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  được sử dụng như chất đối chứng dương trong mô hình gây bệnh Alzheimer có khả năng bảo vệ tế bào khỏi độc tính do  $\text{H}_2\text{O}_2$  gây ra với tỷ lệ sống sót của tế bào là 90,87%. Có thể thấy, hoạt tính bảo vệ thần kinh của dịch chiết UE75S phụ thuộc vào nồng độ. Tiếp theo, chúng tôi sẽ sử dụng các nồng độ 100, 200 và 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  để tiếp tục thử nghiệm hoạt tính tăng sinh tế bào thần kinh C6 thông qua chiều dài sợi neurite.

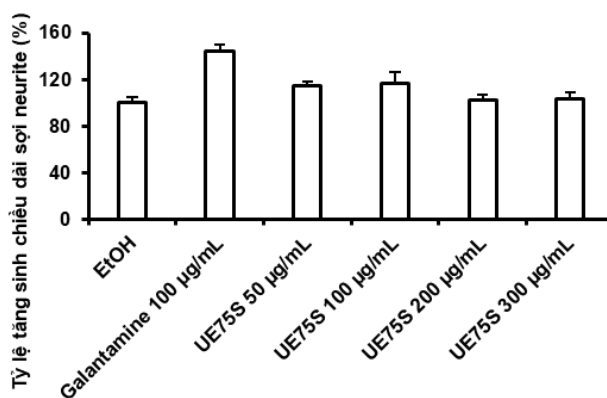


**Hình 2. Độc tính tế bào (A), hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh C6 ở mô hình AD cảm ứng bằng Aβ<sub>25-35</sub> (B) và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C) của dịch chiết UE75S ở các nồng độ khác nhau**

Ghi chú: Ethanol (EtOH) được sử dụng làm nhóm đối chứng. Đối chứng dương là galantamine 100 µg/mL và ascorbic acid 20 µg/mL; Nhóm mô hình: Ethanol + Aβ<sub>25-35</sub> (đối với thí nghiệm độc tính gây ra bởi Aβ<sub>25-35</sub>) và Ethanol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (đối với thí nghiệm stress oxy hóa gây ra bởi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Dấu “\*” chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học giữa các công thức thí nghiệm và nhóm mô hình ( $p < 0,05$ ). Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình ± SD ( $n = 3$ ).

**Kết quả tăng sinh tế bào thần kinh C6 của dịch chiết UE75S thông qua chiều dài sợi neurite**

Sự tăng sinh của các sợi neurite rất quan trọng đối với sự thiết lập cấu trúc chức năng của tế bào thần kinh. Các tế bào thần kinh liên kết với nhau bằng sợi neurite giúp tăng cường trao đổi tín hiệu dẫn truyền thần kinh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định sự tăng sinh sợi neurite của tế bào thần kinh C6 với việc có và không có mặt của dịch chiết UE75S ở nồng độ khác nhau (Hình 3) đã cho thấy, sau 24 giờ xử lý bằng dịch chiết UE75S, tế bào C6 có dấu hiệu tăng sinh sợi neurite tốt. So với công thức đối chứng (tỷ lệ tăng sinh là 100%) thì tế bào được xử lý bằng dịch chiết UE75S ở các nồng độ 50, 100, 200 và 300 µg/mL có tỷ lệ tăng sinh chiều dài sợi neurite tăng đến 114,75; 117,00, 102,19 và 103,37%, tương ứng. Chất chuẩn galantamine giúp tế bào tăng sinh sợi neurite mạnh lên tới 144,8% so với đối chứng. Theo Agapouda và đồng tác giả (2022) công bố, dịch chiết cỏ từ *Rhodiola rosea* có khả năng tăng sinh tế bào thần kinh tốt ở nồng độ 5 và 10 ng/mL, làm tăng số lượng tế bào thần kinh lần lượt là 90,1% và 64,3%; tăng lần lượt 104% và 61,8% về tổng chiều dài sợi neurite. Do vậy, dịch chiết UE75S các nồng độ 100, 200 và 300 µg/mL đã được lựa chọn cho các nghiên cứu về mức độ biểu hiện của một số gen tham gia ở các con đường trao đổi chất ở các tế bào thần kinh C6. Hình ảnh minh họa sự tăng sinh của sợi neurite trên dòng tế bào C6 được xử lý bằng ethanol, galantamine và dịch chiết UE75S ở các nồng độ khác nhau được trình bày ở Hình 4.

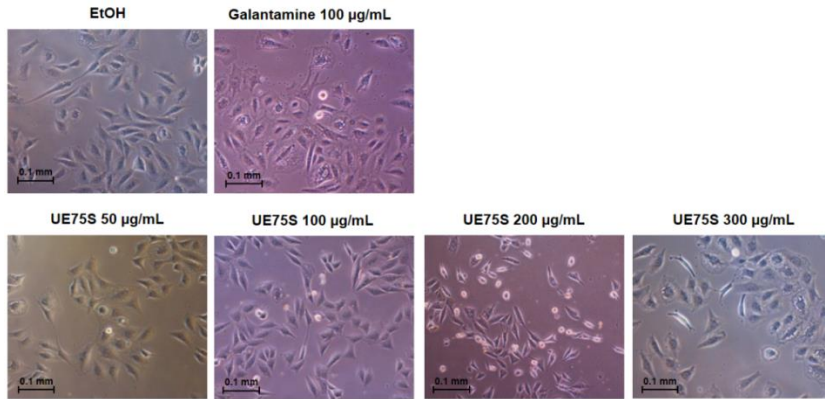


**Hình 3. Tỷ lệ tăng sinh chiều dài sợi neurite trên dòng tế bào C6 được xử lý bằng dịch chiết UE75S ở các nồng độ khác nhau**

Ghi chú: EtOH được sử dụng làm nhóm đối chứng. Đối chứng dương là galantamine 100 µg/mL. Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình ± SD ( $n = 3$ ).

**Kết quả tác dụng bảo vệ thần kinh của dịch chiết UE75S thông qua điều chỉnh biểu hiện của một số các gen tham gia vào một số con đường trao đổi chất ở dòng tế bào thần kinh C6**

Mức độ biểu hiện mRNA của các enzyme ở dòng tế bào thần kinh C6 có sự thay đổi ở mô hình AD được cảm ứng bằng Aβ<sub>25-35</sub> khi có mặt và không có mặt dịch chiết UE75S ở các nồng độ 100, 200 và 300 µg/mL (Hình 5). Kết quả Hình 5 cho thấy, việc xử lý bằng Aβ<sub>25-35</sub> đã ức chế mức độ biểu hiện mRNA của các enzyme tham gia và con đường trao đổi chất so với mẫu đối chứng và mức độ ức chế nêu trên đã phần nào được cải thiện khi tế bào C6 được xử lý bằng UE75S và galantamine.

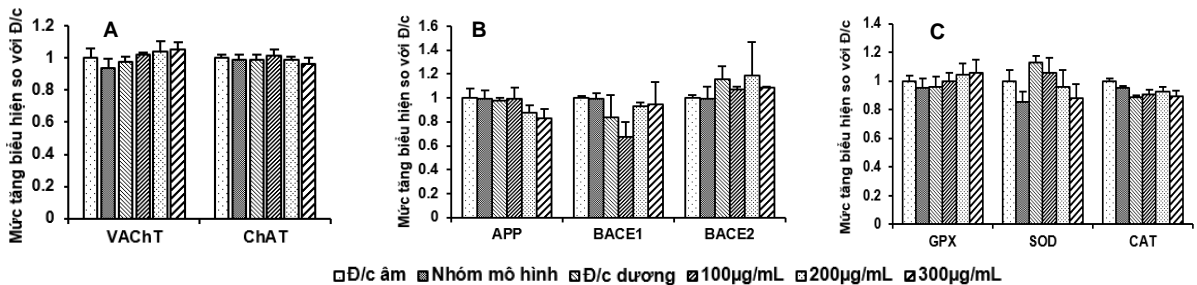


**Hình 4. Hình ảnh minh họa sự tăng sinh sợi neurite trên dòng tế bào C6 được xử lý bằng dịch chiết UE75S ở các nồng độ khác nhau**

*Ghi chú: EtOH được sử dụng làm nhóm đối chứng. Đối chứng dương là galantamine 100 µg/mL.*

Đối với các gen liên quan tới sinh tổng hợp acetylcholine, *ChAT* chịu trách nhiệm trong quá trình sinh tổng hợp Ach từ acetyl CoA và choline trong tế bào chất, còn *VACHT* liên quan đến sự hấp thụ chất dẫn truyền thần kinh vào túi tiếp hợp (Ferreira-Vieira *et al.*, 2016). Kết quả Hình 5A cho thấy, khi cảm ứng bằng của  $A\beta_{25-35}$  mức độ biểu hiện của gen *VACHT* và *ChAT* đã bị giảm xuống lần lượt là 6,21 và 0,92 % so với nhóm đối chứng âm. Khi có mặt dịch chiết UE75S các nồng độ 100, 200 và 300 µg/mL đã giúp tăng mức độ biểu hiện mRNA của *VACHT* lên lần lượt 8,67; 10,99 và 12,18% so với nhóm mô hình và tốt hơn so với chất chuẩn galantamine nồng độ 100 µg/mL (tăng 4,16% so với nhóm mô hình). Đối với gen *ChAT*, chỉ có nồng độ 100 µg/mL có tác dụng tăng mức độ biểu hiện mRNA hơn 2,32% so với nhóm mô hình. Dịch chiết UE75S các nồng độ 200 và 300 µg/mL và galantamine không làm thay đổi mức biểu hiện gen *ChAT*. Việc thúc đẩy biểu hiện của *VACHT* và *ChAT* có thể cải thiện lượng acetylcholine giúp bảo vệ hoạt tính thần kinh liên quan đến AD. Kết quả này phù hợp với công bố của Chen và đồng tác giả (2021a) về bảo vệ thần kinh qua con đường sinh tổng hợp acetylcholine.

Việc biểu hiện quá mức của các gen *APP*, *BACE1* và *BACE2* có thể dẫn đến việc tích tụ  $A\beta$  - được tạo ra bởi quá trình phân cắt protein của APP (Chen *et al.*, 2021b). Lin và đồng tác giả (2008) đã công bố rằng chất curcumin đã làm giảm mức độ biểu hiện mRNA của các gen *APP*, *BACE1* trên dòng tế bào PC-12. Trong nghiên cứu này, dịch chiết UE75S đã giảm mức độ biểu hiện mRNA của *APP*, *BACE1* so với nhóm mô hình xử lý bằng  $A\beta_{25-35}$  (Hình 5B). Cụ thể, dịch chiết UE75S ở các nồng độ 100, 200 và 300 µg/mL đã làm giảm mức độ biểu hiện mRNA của gen *APP* (lần lượt là 0,3; 11,43 và 16,74% so với nhóm mô hình) và gen *BACE1* (lần lượt là 31,65; 5,8 và 4,14% so với nhóm mô hình). Như vậy, các kết quả thu được của chúng tôi cũng tương tự với công bố nêu trên.



**Hình 5. Ảnh hưởng của dịch chiết UE75S lên biểu hiện của một số gen liên quan đến sinh tổng hợp AChE (A) cơ chế sinh bệnh AD (B) và các enzyme chống oxy hóa (C)**

*Ghi chú: Đối chứng âm (Ethanol), nhóm mô hình (Ethanol +  $A\beta_{25-35}$ ); đối chứng dương (Galantamine 100 µg/mL +  $A\beta_{25-35}$ ).*

*Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  SD (n = 3). VACHT: Vesicle acetylcholine transporter; CHAT: Choline acetyltransferase; APP: Amyloid precursor protein; BACE1: Beta-site APP-cleaving enzyme 1; BACE2: Beta-site APP-cleaving enzyme 2; GPx: Glutathione peroxidase; SOD: Superoxide dismutase; CAT: Catalase.*

Các tế bào sản xuất ROS quá mức gây ra rối loạn chức năng ty thể và dẫn đến stress oxy hóa. SOD, CAT và GPx là các enzyme chống oxy hóa quan trọng của tế bào, chúng hoạt động như chất chống oxy hóa nội sinh chống lại các gốc tự do dư thừa đã được tạo ra trong tế bào và loại bỏ chúng bằng cách xúc tác trực tiếp quá trình phân hủy  $H_2O_2$  thành  $O_2$  (García-Pérez *et al.*, 2021). Việc giảm mức độ biểu hiện của các enzyme này có thể dẫn đến stress oxy hóa. Kết quả chỉ ra ở Hình 5C đã cho thấy, sự biểu hiện của các gen *GPx* và *SOD* đã được tăng lên đáng kể ở tế bào được xử lý bằng UE75S sau khi cảm ứng bằng  $A\beta_{25-35}$  và giảm biểu hiện đối với gen *CAT*. Ở cả 3 nồng độ 100, 200 và 300 µg/mL, mức độ biểu hiện mRNA đã tăng lần lượt là 4,88; 10,04 và

11,16% (đối với gen *GPx*); 23,73; 112,01 và 3,01% (đối với gen *SOD*), tương ứng. Việc tăng mức độ biểu hiện mRNA của các gen mã hóa các enzyme chống oxy hóa này giúp tế bào cân bằng ROS từ đó có tác dụng bảo vệ được tế bào. Đặng Diễm Hồng và đồng tác giả (2023) đã công bố, fucoxanthin tách chiết từ rong mơ *Sargassum oligocystum* giúp làm tăng đáng kể hoạt động của enzyme CAT và GPx trên dòng tế bào thần kinh C6. Như vậy, có thể thấy dịch chiết UE75S giúp điều hòa biểu hiện gen của các gen bệnh sinh AD (*APP*, *BACE1* và *BACE2*), cũng như thúc đẩy gen sinh tổng hợp ACh (*VACHT*, *CHAT*), các gen liên quan đến các enzyme chống oxy hóa (*GPx*, *CAT* và *SOD*).

Các nghiên cứu trước đây đã cũng đã chứng minh khả năng bảo vệ thần kinh theo các con đường khác nhau trên mô hình bệnh Alzheimer của các loài rong biển như *Ecklonia cave*, *Sargassum oligocystum* (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2023; Nho *et al.*, 2020). Như vậy, dịch chiết UE75S có tác dụng bảo vệ thần kinh thông qua các con đường khác nhau bằng cách điều chỉnh tăng hoặc giảm biểu hiện mRNA của các gen tham gia để giúp điều hòa được tế bào khỏi những tác động bất thường trong AD. Tiếp theo việc đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của dịch chiết UES75S trên mô hình động vật thực nghiệm *in vivo* cho định hướng sử dụng dịch chiết này làm nguyên liệu thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người có tác dụng bảo vệ thần kinh sẽ được tiến hành.

## KẾT LUẬN

Dịch chiết cồn 75% được tách từ rong *Ulva reticulatum* (UE75S) có hỗ trợ của siêu âm, có tác dụng bảo vệ thần kinh khỏi các tác nhân gây độc tế bào như  $A\beta_{25-35}$  và  $H_2O_2$ . Nghiên cứu cơ chế phân tử bước đầu cho thấy dịch chiết UE75S giúp điều hòa biểu hiện quá mức ở một số gen liên quan tới tích lũy  $A\beta$  (*APP*, *BACE1* và *BACE2*), cũng như tăng cường biểu hiện của các gen sinh tổng hợp acetylcholine (*VACHT* và *CHAT*) và các gen liên quan đến các enzyme chống oxy hóa (*GPx*, *CAT* và *SOD*). Dịch chiết cồn 75% từ rong *U. reticulata* có hỗ trợ của siêu âm là nguyên liệu tiềm năng cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng bảo vệ thần kinh cho con người.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report 2019. Attitudes to dementia. (2019): Alzheimer's Disease International, London. p. 9-160.
- Agapouda A, Grimm A, Lejri I, Eckert A (2022). Rhodiola Rosea Extract Counteracts Stress in an Adaptogenic Response Curve Manner via Elimination of ROS and Induction of Neurite Outgrowth. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (1):5647599.
- Martins B, Vieira M, Delerue-Matos C, Grosso C, Soares C (2022). Biological potential, gastrointestinal digestion, absorption, and bioavailability of algae-derived compounds with neuroprotective activity: A comprehensive review. *Mar Drugs*, 20(6):362.
- Nho JA, Shin YS, Jeong HR, Cho S, Heo HJ, Kim GH, Kim DO (2020). Neuroprotective effects of phlorotannin-rich extract from brown seaweed *Ecklonia cava* on neuronal PC-12 and SH-SY5Y cells with oxidative stress. *J Microbiol Biotechnol* 30(3):359-367.
- Chen MH, Wang TJ, Chen LJ, Jiang MY, Wang YJ, Tseng GF, Chen JR (2021a). The effects of astaxanthin treatment on a rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*, 172:151-63.
- Chen X, Drew J, Berney W, Lei W (2021b). Neuroprotective natural products for Alzheimer's disease. *Cells*, 10(6):1309.
- Dang DH, Anh HTL, Thom LT, Ha NC, Tien DD, Duy DA (2019). The Genus *Gracilaria* in Vietnam. *Institute of Ocean & Earth Sciences Series*.17: 29–46.
- Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*, 14, 101–115.
- García-Pérez E, Ryu D, Lee C, Lee HJ (2021). Ochratoxin A induces oxidative stress in HepG2 Cells by impairing the gene expression of antioxidant enzymes. *Toxins*, 13(4):271.
- Hong DD, Thom LT, Ha NC, Thu NTH, Hien HTM, Tam LT, Dat NM, Duc TM, Tru NV, Hang NT, Ambati RR (2023). Isolation of Fucoxanthin from *Sargassum oligocystum* Montagne, 1845 Seaweed in Vietnam and Its Neuroprotective Activity. *Biomedicines*, 11(8):2310.
- Kumar A, Sidhu J, Lui F, Tsao JW, Doerr C. Alzheimer Disease (Nursing). (2024). *Treasure Island (FL): StatPearls*.
- Kumar K, Kumar A, Keegan RM, Deshmukh RR (2018). Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*, 9: 297-307.
- Lin R, Chen X, Li W, Han Y, Liu P, Pi R (2008). Exposure to metal ions regulates mRNA levels of APP and BACE1 in PC12 cells: Blockage by curcumin. *Neurosci Lett*, 440(3): 344–347.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25 (4): 402-408
- Lưu Thị Tâm, Hoàng Thị Minh Hiền, Ngô Thị Hoài Thu, Nguyễn Cẩm Hà, Trần Mai Đức, Nguyễn Mạnh Đạt, Nguyễn Thành Vinh, Trịnh Thị Hiền, Trịnh Đình Khả, Nguyễn Văn Trữ, Đặng Diễm Hồng (2022). Tác dụng bảo vệ thần kinh chống lại bệnh alzheimer của dịch chiết tổng số tách từ hai loài rong biển *Kappaphycus alvarezii* và *Ulva reticulata* thu tại Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam trên mô hình *in vitro*. *Tuyển tập báo cáo toàn văn tại Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2022* : 331-337.

## INITIAL RESEARCH THE MOLECULAR MECHANISM OF TOTAL EXTRACT FROM *Ulva reticulata* COLLECTED IN NHA TRANG, KHANH HOA, VIETNAM IN THE ALZHEIMER'S DISEASE MODEL ON THE C6 NEURONAL CELL LINE

Nguyen Manh Dat<sup>1,3</sup>, Le Thi Thom<sup>1</sup>, Ngo Thi Hoai Thu<sup>1\*</sup>, Nguyen Cam Ha<sup>1</sup>,  
Nguyen Van Tru<sup>1</sup>, Tran Mai Đức<sup>4</sup>, Dang Diem Hong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

<sup>3</sup>*University of Science and Technology of Hanoi*

<sup>4</sup>*Nha Trang Institute of Technology Research and Application, Nha Trang, Khanh Hoa*

### SUMMARY

Alzheimer's disease is the most common form of dementia, leading to many deaths and a significant economic burden on society. The specific mechanisms in the pathogenesis of this disease have yet to be well understood. This study evaluated the neuroprotective effects of a 75% ethanol total extract (assisted by ultrasound waves) from the seaweed *Ulva reticulata* (UE75S) in an Alzheimer's disease model using the C6 neuronal cell line. The initially investigated molecular protection mechanisms of this extract's neuroprotective effects through gene expression in cellular metabolism were carried out. The results showed that the UE75S extract was nontoxic to cells at tested concentrations ranging from 10 to 400 µg/mL. At concentrations of 100, 200, 300, and 400 µg/mL, the extract exhibited neuroprotective effects against toxicity induced by Aβ<sub>25-35</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with the percentage of viable cell ranging from approximately 62.5% to 84.7% compared to the model groups at 62.4% (induced by Aβ<sub>25-35</sub>) and 65.5% (induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Furthermore, real-time PCR analysis indicated that the neuroprotective effects of the UE75S extract were due to the regulation of gene expression involved in AD pathogenesis (*APP*, *BACE1*, and *BACE2*), ACh synthesis (*VACHT*), and antioxidant enzymes (*GPx*, *CAT* and *SOD*). Thus, the 75% ethanol extract (assisted by ultrasound waves) from *U. reticulata* is a potential resource for human protective health food with neuroprotection bioactivity.

**Keywords:** Alzheimer, amyloid β-Protein Fragment 25-35 (Aβ<sub>25-35</sub>), neuroprotection, seaweed, *Ulva reticulata*.

---

\*Corresponding author: Tel: 02437911059; ddhong60vn@yahoo.com; nhthu@ibt.ac.vn