

# Suy giảm phiên mã của gene PPAR $\gamma$ và C/EBP $\alpha$ ở gan cá sọc ngựa giai đoạn Juvenile phơi nhiễm mãn tính với bisphenol A

Nguyễn Thành Công<sup>1</sup>, Ngô Thị Mai<sup>2</sup>, Lê Phi Nga<sup>3,\*</sup>

## TÓM TẮT

**Giới thiệu:** Bisphenol A (BPA) dùng trong tổng hợp nhựa. Chất này được biết có khả năng gây biến đổi nội tiết tố ở người và động vật. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy BPA hoạt động tương tự estrogen tác động lên giai đoạn phôi và mới sinh. Với cách tiếp cận khác, một nghiên cứu của cùng nhóm tác giả công bố năm 2017 cho thấy BPA có khả năng tác động lên giai đoạn tăng trưởng nhanh của động vật dựa trên dữ liệu proteomics của gan cá sọc ngựa giai đoạn Juvenile phơi nhiễm BPA mức  $\mu\text{g/L}$ . Nghiên cứu này là bước tiếp theo của nghiên cứu trên để chỉ ra những thụ thể chuyển hóa hóa sinh nào ở gan có khả năng bị tác động bởi phơi nhiễm BPA. Trong số các thụ thể ở gan được dự đoán thì PPAR $\gamma$  và C/EBP $\alpha$  là có thể là đích tác động của BPA trong điều kiện phơi nhiễm này. **Phương pháp:** Trong nghiên cứu này, cá sọc ngựa 30 ngày tuổi được phơi nhiễm với 0, 10 và 100  $\mu\text{g/L}$  BPA suốt 60 ngày trong điều kiện tiêu chuẩn cho một thử nghiệm độc học mãn tính trên cá. Sau khi thí nghiệm kết thúc, sự khác biệt về mức biểu hiện mRNA của gene PPAR $\gamma$  và gene C/EBP $\alpha$  ở gan cá phơi nhiễm BPA được phân tích so sánh với gan cá không phơi nhiễm sử dụng phương pháp Real-Time PCR với  $\beta$ -actine làm gene tham chiếu. **Kết quả:** BPA tác động lên cả hai gene và đều phụ thuộc nồng độ. Mức biểu hiện mRNA giảm 67% ở gene PPAR $\gamma$  và 70% ở gene C/EBP $\alpha$  chỉ ghi nhận ở nhóm phơi nhiễm với 100  $\mu\text{g/L}$  BPA. Mức biểu hiện này không thay đổi đáng kể ở nhóm phơi nhiễm với 10  $\mu\text{g/L}$  BPA. **Kết luận:** Như vậy tác động của phơi nhiễm BPA suốt giai đoạn tăng trưởng cá sọc ngựa lên chức năng gan có thể có sự tham gia của thụ thể PPAR $\gamma$  và C/EBP $\alpha$ . Tác động này phụ thuộc vào nồng độ BPA.

**Từ khoá:** bisphenol A, C/EBP $\alpha$ , Danio rerio, zebrafish liver, PPAR $\gamma$

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, ĐHQG-HCM

<sup>2</sup>Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

<sup>3</sup>Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

## Liên hệ

**Lê Phi Nga**, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

Email: lephinga@hcmut.edu.vn

## Lịch sử

- Ngày nhận: 13-11-2018
- Ngày chấp nhận: 27-3-2019
- Ngày đăng: 29-6-2019

## DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v3i2.519>



## Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



## GIỚI THIỆU

Các hợp chất gây rối loạn nội tiết tố gọi chung là EDCs (Endocrine-disrupting chemicals) ngày nay trở thành nhóm chất độc đặc biệt, không chỉ ảnh hưởng lên sức khỏe của con người mà còn cả sinh thái. Bisphenol A (BPA) thuộc nhóm EDCs. Năm 2012, hợp chất này bị cấm sử dụng làm phụ gia nhựa sản xuất đồ dùng cho trẻ em ở Mỹ, sau đó ở Châu Âu và Canada. Các nước trên thế giới đã biết đến tác hại của BPA, thế nhưng sự hiện diện của nó vẫn được phát hiện thấy rộng rãi trong các sản phẩm nhựa dân dụng và trong cả môi trường nước, nơi các chất thải nhựa dung giải ra các chất phụ gia khắp nơi trên thế giới. Khá nhiều các nghiên cứu cho thấy BPA đóng vai trò tương tự như một estrogen do đó gây ảnh hưởng xấu lên phát triển giới tính ở động vật từ giai đoạn bào thai đến mới sinh. Đó là cơ sở khoa học cho luật cấm sản xuất đồ dùng nhựa chứa BPA cho trẻ em. Với một cách tiếp cận mới, nhóm nghiên cứu của Ngô TM, 2017<sup>1</sup> đã đánh giá ảnh hưởng của BPA nồng độ thấp (10 và 100  $\mu\text{g/L}$ ) lên cá sọc ngựa suốt giai đoạn tăng trưởng (Juvenile), từ 30 ngày tuổi và phơi nhiễm 60 ngày. Kết quả phân tích proteomics

gan cá cho thấy hợp chất này có ảnh hưởng rõ rệt lên chức năng chuyển hóa của gan: làm suy giảm tổng hợp năng lượng, giảm glycogen, tăng hình thành lipid, tăng kháng viêm. Câu hỏi đặt ra là protein thụ thể nào đã chịu tác động của BPA để gây nên sự thay đổi đó? Nhóm protein thụ thể nhân PPARs có thể là đầu mối vì nhiều nghiên cứu cho thấy các protein này tham gia vào việc điều hòa các con đường chuyển hóa glucose và lipid ở các bệnh béo phì, tiểu đường, xơ vữa động mạch và viêm nhiễm<sup>2-4</sup>. PPAR $\gamma$  chủ yếu được tìm thấy ở mô mỡ trắng. Ở mô gan, mặc dù biểu hiện với lượng rất nhỏ nhưng thụ thể này có ảnh hưởng mạnh đến điều hòa con đường chuyển hóa glucose<sup>5,6</sup>. Thiazolidine đã được dùng làm thuốc để tăng hoạt tính thụ thể PPAR trong điều trị bệnh tiểu đường type 2 kháng insulin<sup>7,8</sup>. Việc suy giảm biểu hiện của thụ thể này ở gan được ghi nhận ở chuột nhắt với chế độ ăn nghèo năng lượng và tăng biểu hiện khi cho ăn nhiều lipid<sup>9</sup>. C/EBP $\alpha$  cũng là protein thụ thể nhân, thuộc nhóm C/EBPs, ngược lại, biểu hiện nhiều ở mô gan và mô mỡ trắng<sup>10</sup>. Một số nghiên cứu chỉ ra C/EBP $\alpha$  cũng đóng vai trò là mắt xích quan trọng trong điều hòa chuyển hóa glucose và lipid ở gan<sup>11,12</sup>. Hơn nữa

**Trích dẫn bài báo này:** Thành Công N, Thị Mai N, Phi Nga L. **Suy giảm phiên mã của gene PPAR $\gamma$  và C/EBP $\alpha$  ở gan cá sọc ngựa giai đoạn Juvenile phơi nhiễm mãn tính với bisphenol A.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 3(2):120-127.

C/EBP $\alpha$  và PPAR $\gamma$  có mối quan hệ mật thiết với nhau trong biệt hóa tế bào mỡ<sup>13</sup>. Trong nghiên cứu này chúng tôi giả thuyết biểu hiện gene của PPAR $\gamma$  và C/EBP $\alpha$  ở gan cá có thể bị tác động bởi BPA, tác động này đã làm thay đổi biểu hiện protein gan cá chỉ ra trong nghiên cứu của Ngo TM, 2017<sup>1</sup>. Do đó chúng tôi đã thiết lập lại điều kiện thí nghiệm hoàn toàn giống như công bố của Ngo TM, 2017<sup>1</sup> nhưng đánh giá điểm cuối không phải là biểu hiện protein mà là biểu hiện mRNA của hai gene đã chọn.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Thí nghiệm phơi nhiễm với BPA

Mô hình phơi nhiễm mãn tính tuân thủ theo chỉ dẫn TG234 của OECD. Cá sọc ngựa 30 ngày tuổi được phơi nhiễm với BPA nồng độ 0 (đối chứng), 10 và 100  $\mu\text{g/L}$  trong 60 ngày tương tự như công bố của Ngo TM, 2017<sup>1</sup>. Một lô đối chứng và hai lô nhiễm BPA, mỗi lô gồm 4 bể và mỗi bể có 10 con cá. Sau 60 ngày thí nghiệm ở mỗi bể có 9 hoặc 10 con cá còn sống, tức là số cá chết < 10% đáp ứng điều kiện của phép thử độc học. Mỗi lô thí nghiệm có được trung bình 37 gan cá, thu tươi sống, ngay lập tức đông lạnh bằng nitrogen lỏng và trữ ở (-) 80 $^{\circ}\text{C}$  cho thí nghiệm tách chiết RNA.

### Tách chiết RNA tổng số từ gan cá

Mỗi lần chiết RNA tổng số, 3 gan cá (100  $\pm$  0,08 mg) được rửa đông, gom chung và đông hóa bằng cối nghiền. Chiết RNA tổng số bằng EZ-10 Spin Column Plant RNA Mini-Preps Kit (Bio Basic, Canada), thực hiện theo như hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA lẫn trong mẫu chiết RNA cuối cùng được loại bỏ bằng cách sử dụng RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Scientific, U.S). Chất lượng của RNA tổng số được đánh giá bằng điện di gel agarose 1% và xác định nồng độ bằng quang phổ NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, U.S).

### Phản ứng tổng hợp cDNA từ RNA tổng số

cDNA được tổng hợp bằng phản ứng phiên mã ngược (reverse transcript PCR) trên khuôn RNA tổng số (5  $\mu\text{g}$ ) sử dụng Tetro cDNA Synthesis Kit với mỗi Oligo(dT)18 (Bioline Reagenets, UK). Thể tích phản ứng là 20  $\mu\text{L}$ . Chu trình nhiệt là 45 $^{\circ}\text{C}$ , 30 phút, 85 $^{\circ}\text{C}$ , 5 phút; giữ ở 4 $^{\circ}\text{C}$ .

### PCR các gene đích và gene tham chiếu

Trước khi thực hiện các phản ứng Real-Time PCR, các cặp mồi cần được xác nhận hiệu quả khuếch đại bằng cách thực hiện phản ứng PCR thông thường với

sản phẩm cDNA tổng hợp được. Các phản ứng dùng PCR Master mix của Thermo Fisher Scientifics, U.S. Các cặp mồi PCR được tổng hợp bởi PhuSa Biochem (Việt Nam) dựa trên trình tự công bố của cho gene PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ <sup>14</sup> và  $\beta$ -actin dùng để làm gene tham chiếu<sup>15</sup> (Bảng 1). Chu trình nhiệt là 95 $^{\circ}\text{C}$  - 2 phút; tiếp theo 40 chu kỳ gồm: 55 $^{\circ}\text{C}$  (cho PPAR $\gamma$  hoặc C/EBP $\alpha$ ) hoặc 56 $^{\circ}\text{C}$  (cho  $\beta$ -actin) kéo dài 30 giây; 72 $^{\circ}\text{C}$  kéo dài 30 giây; 72 $^{\circ}\text{C}$  kéo dài 7 phút; giữ ở 4 $^{\circ}\text{C}$ . Sản phẩm được điện di gel agarose 1%, nhuộm bằng ethidium bromide.

### Phản ứng Real-Time PCR

Phản ứng Real-Time PCR được thực hiện với thể tích cuối cùng là 20  $\mu\text{L}$  chứa 350 ng cDNA, 1X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, U.S) và nồng độ mỗi đã tối ưu là 0,8  $\mu\text{M}$ ; 0,8  $\mu\text{M}$ ; 0,7  $\mu\text{M}$  tương ứng cho từng gene  $\beta$ -actin, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ . Các mẫu được phân tích trong đĩa PCR 96 giếng của hệ thống iQ5 Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, U.S) với quy trình khuếch đại như sau: một chu kỳ 95 $^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút, 40 chu kỳ 95 $^{\circ}\text{C}$  cho 15 giây, bắt khuôn ở nhiệt độ tối ưu cho mỗi cặp mồi trong 30 giây, và kéo dài 72 $^{\circ}\text{C}$  trong 30 giây. Phản ứng được chạy lặp lại bốn lần (n=4) cho mỗi mẫu cDNA. Sử dụng điện di gel agarose 1% để kiểm tra khả năng khuếch đại của cDNA sau khi thực hiện phản ứng Real-Time PCR. Dữ liệu Real-Time PCR được thu thập và phân tích bằng phần mềm iQ5 2.1 (Bio-Rad, U.S).

Để đánh giá khác biệt về biểu hiện một gene đích giữa mẫu phơi nhiễm với BPA với mẫu không phơi nhiễm (mẫu cắt ngang cùng thời điểm) nghiên cứu đã áp dụng phương pháp  $2^{-\Delta\Delta CT}$  của Livak KJ, 2001<sup>16</sup>. Trong phương pháp này sử dụng  $\beta$ -actin làm gene tham chiếu (Ref) là điều kiện tiên quyết và quy ước không thay đổi dưới tác động của độc chất. Để tính trị số  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , sử dụng chu kỳ ngưỡng của gene đích CT(T/Tg) cho gene PPAR $\gamma$  hoặc C/EBP $\alpha$  được hiệu chỉnh (normalized) theo chu kỳ ngưỡng của gene tham chiếu  $\beta$ -actin CT(C/Ref) thực hiện trên 2 mẫu phơi nhiễm BPA (T) và 1 mẫu đối chứng (C) theo các phương trình sau:

$$\text{Mẫu phơi nhiễm} : \Delta CT(T) = CT(T/Tg) - CT(T/Ref) \quad (1)$$

$$\text{Mẫu đối chứng} : \Delta CT(C) = CT(C/Tg) - CT(C/Ref) \quad (2)$$

Hiệu chỉnh  $\Delta CT$  mẫu thử bằng hiệu số  $\Delta CT(T)$  và  $\Delta CT(C)$  :

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(T) - \Delta CT(C) \quad (3)$$

Từ đó tính ra tỷ lệ thay đổi biểu hiện của PPAR $\gamma$  hoặc C/EBP $\alpha$  trên mẫu phơi nhiễm so với mẫu đối chứng

**Bảng 1:** Trình tự các cặp môi PCR

Gene	Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Độ dài môi (bp)	Sản phẩm PCR (bp)	Tm( ° C)
<i>β-actin</i>	Xuôi	CGAGCTGTCTTCCCATCCA	19	86	56
	Ngược	TCACCAACGTAGCTGTCTTCT	23		
<i>PPARγ</i>	Xuôi	GGTTTCATTACGGCGTTCAC	20	120	55
	Ngược	TGCGGCTCTTCTTGTGTATG	20		
<i>C/EBPα</i>	Xuôi	CACAACAGCTCCAAGCAAGA	20	121	55
	Ngược	AATCCATGTAGCCGTTTCAGG	20		

(không phơi nhiễm BPA) được quy về 1 hay 100% tính bằng  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Nếu tỉ số này <1 là biểu hiện giảm, nếu > 1 là biểu hiện tăng; nếu = 1 là không thay đổi mức độ biểu hiện. Phép thống kê Student's t-test được dùng để kiểm định mức độ khác biệt có nghĩa giữa các mẫu với độ tin cậy 95%.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Chất lượng của RNA tổng số

RNA tổng số của gan cá phơi nhiễm với 10 μg/L, 100 μg/L BPA và nhóm đối chứng (không phơi nhiễm) được phân tích trên điện di gel agarose 1% (Hình 1) với 5 μg RNA nạp vào mỗi giếng. Kết quả điện di cho thấy RNA tổng số của cả 3 mẫu đều cho 4 vạch RNA, trong đó 3 vạch rõ rệt tương ứng với rRNA tiểu phần 28S, 18S, và 5,8S. Vạch có trọng lượng phân tử thấp nhất, khá mờ nhạt so với 3 vạch kia, có thể là sản phẩm rRNA bị phân hủy trong quá trình tách chiết. Các mRNA thông thường không tập trung thành vạch vì có độ dài rất khác biệt và chiếm tỉ trọng rất nhỏ, khoảng 3% trong tổng RNA. Như vậy chất lượng của RNA tổng số thu được có thể sử dụng cho việc tổng hợp cDNA.

### Chất lượng của cDNA và tính đặc hiệu của cặp môi PCR

Kết quả phản ứng PCR với các cặp môi và khuôn cDNA thu được thể hiện trong Hình 2 cho thấy mỗi gene (giếng 1 và 3, giếng 6 và 7; giếng 9 và 10) chỉ có 1 sản phẩm duy nhất có kích thước phù hợp nằm ở khoảng dưới vạch thấp nhất 350 bp của thang DNA. Vạch sản phẩm của *β-actin* (giếng 9, 10) thấp nhất, còn của 2 gene đích tương đương nhau. Trong khi đó các đối chứng âm không có vạch sáng cho thấy không có hiện tượng tạo dimer của các cặp môi. Kết quả này cho thấy các cặp môi và chất lượng các cDNA đáp ứng yêu cầu cho phản ứng Real-Time PCR. Sản phẩm PCR thuộc về 3 gene đích (Hình 2) đã được khẳng định bằng giải trình tự gene (không trình bày dữ liệu).

Tính đặc hiệu của cặp môi, hay sản phẩm PCR là duy nhất cho mỗi gene tiếp tục được phân tích trong khi chạy phản ứng Real-Time PCR.

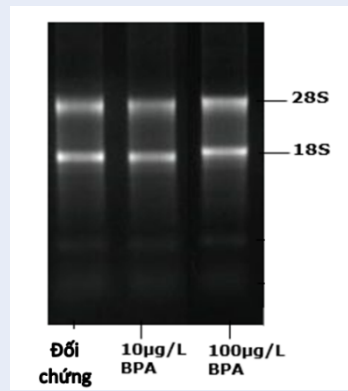
### Tối ưu nhiệt độ và nồng độ môi của phản ứng Real-Time PCR

Nhiệt độ bắt cặp tối ưu cho gene *β-actin*, *PPARγ* và *C/EBPα* được xác định qua phân tích sản phẩm Real-Time PCR sử dụng phần mềm iQ5 Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, U.S). Kết quả cho thấy (không trình bày dữ liệu) tất cả các phản ứng đều cho đường cong nhiệt độ chảy của sản phẩm có một đỉnh duy nhất tương ứng với nhiệt độ bắt cặp của môi tại 56° C cho gene *β-actin*, tại 55° C cho *PPARγ* và *C/EBPα*. Sản phẩm Real-Time PCR là duy nhất cho mỗi gene chứng tỏ tính đặc hiệu của cặp môi đã sử dụng cũng như nhiệt độ bắt cặp môi của phản ứng đã được chuẩn hóa.

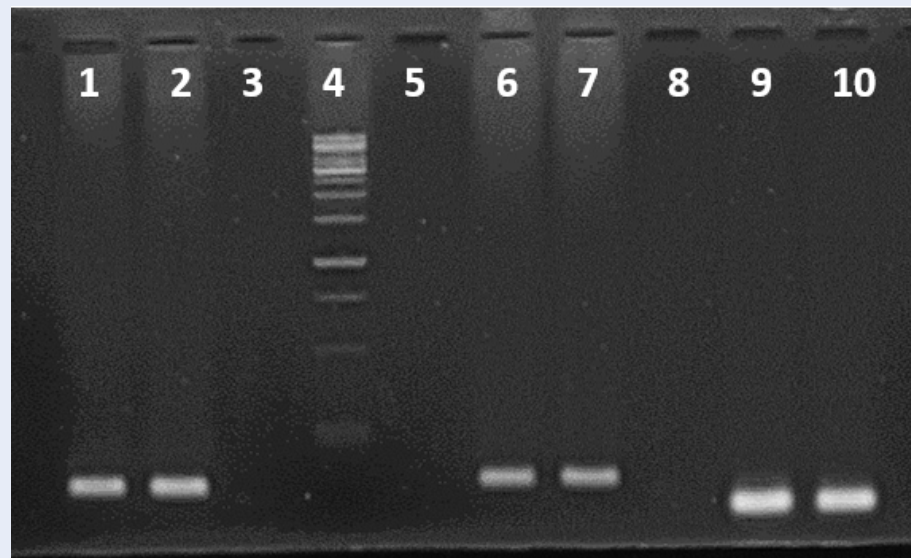
Nồng độ môi tốt nhất của phản ứng Real-Time PCR sẽ cho giá trị chu kì ngưỡng CT thấp nhất. Đối với gene *β-actin*, khảo sát nồng độ môi từ 0,1 μM đến 0,9 μM cho thấy nồng độ tốt nhất là 0,8 μM (CT = 15,54). Đối với gene *PPARγ* và *C/EBPα* khảo sát nồng độ môi tương tự nhau từ 0,5 μM đến 0,9 μM, cho thấy nồng độ tốt nhất lần lượt cho từng gene là 0,8 μM (CT = 25,29) và 0,7 μM (CT = 26,06).

### Thay đổi mức độ biểu hiện mRNA của gene *PPARγ*

Các thông số đặc trưng cho biểu hiện gene *PPARγ* tác động bởi BPA được thể hiện trong Bảng 2. Chỉ số CT đo được của gene *β-actin* về lý thuyết là không có sự khác biệt giữa các mẫu do quy ước gene này không chịu tác động của độc chất và sử dụng để tham chiếu. Thực tế trên Bảng 2 cho thấy CT của gene này khá là khác biệt giữa 3 mẫu. Điều này có thể gây bởi độ tinh sạch ban đầu của RNA hay độ đồng nhất cDNA giữa 3 mẫu không đồng đều, trong khi đó các phản ứng Real-Time PCR khống chế lượng cDNA khuôn bằng



**Hình 1:** Gel điện di agarose 1% của RNA tổng số của gan cá phơi nhiễm với BPA và đối chứng.



**Hình 2:** Gel điện di agarose 1% sản phẩm PCR của gene PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$  và  $\beta$ -actin. Ghi chú: (1) và (2) sản phẩm 120 bp của gene PPAR $\gamma$ ; (3) Đối chứng âm phản ứng PCR gene PPAR $\gamma$ ; (4) Thang DNA ruler 1kb; (5) Đối chứng âm phản ứng PCR gene C/EBP $\alpha$ ; (6) và (7) sản phẩm 121 bp của gene C/EBP $\alpha$ ; (8) Đối chứng âm phản ứng PCR gene  $\beta$ -actin; (9) và (10) sản phẩm 86 bp của gene  $\beta$ -actin.

nhau, 350 ng cDNA cho mỗi phản ứng, dẫn đến CT khác nhau. Tuy nhiên khác biệt này sẽ được loại trừ khi tính trị số  $\Delta$ CT trong mỗi mẫu của từng cặp gene đích và gene tham chiếu. Trị số  $2^{-\Delta\Delta CT}$  biểu thị mức độ biểu hiện của cùng gene trong mẫu phơi nhiễm so với đối chứng. Kết quả cho thấy biểu hiện của gene PPAR $\gamma$  trong mẫu gan cá phơi nhiễm với BPA 100  $\mu$ g/L thấp hơn đáng kể (0,67 lần) so với đối chứng, trong khi đó trong mẫu phơi nhiễm với BPA 10  $\mu$ g/L suy giảm ít hơn (0,11 lần) so với nhóm đối chứng. Như vậy BPA đã gây nên suy giảm biểu hiện của gene nhưng phụ thuộc nồng độ. Mức độ suy giảm thay đổi không đáng kể ở lò nhiễm BPA 10  $\mu$ g/L nhưng giảm

rõ rệt ở nồng độ 100  $\mu$ g/L cho thấy vùng 10 – 100  $\mu$ g/L là quan trọng trong phơi nhiễm mãn tính BPA lên cá sọc ngựa giai đoạn Juvenile. BPA 10  $\mu$ g/L có thể coi là giá trị NOEC (not observed effect concentration) và BPA 10  $\mu$ g/L là giá trị LOEC (lowest observed effect concentration).

### Thay đổi mức độ biểu hiện mRNA của C/EBP $\alpha$

Các thông số đặc trưng cho biểu hiện gene của C/EBP $\alpha$  được thể hiện trong Bảng 3. Kết quả cho thấy, tương tự như gene PPAR $\gamma$  ở trên, chỉ có lò mẫu phơi nhiễm 100  $\mu$ g/L BPA là bị giảm biểu hiện 70%,

**Bảng 2:** Thay đổi biểu hiện mRNA của gene PPAR $\gamma$

Mẫu	PPAR $\gamma$ C <sub>T</sub> ±SD	$\beta$ -actin C <sub>T</sub> ±SD	$\Delta$ CT	$\Delta\Delta$ CT	2 <sup>-<math>\Delta\Delta</math>CT</sup> (95% CI)	F
Đối chứng	26,00±0,79	18,30±1,06	7,7 ±1,32	0,00±1,32	1,00 (0,40-2,50)	-
BPA 10 $\mu$ g/L	32,10±0,85	21,18±0,44	10,92±0,96	3,22±0,96	0,11 (0,06-0,21)	**
BPA 100 $\mu$ g/L	23,62±0,83	15,34±0,37	8,28±0,91	0,58±0,91	0,67 (0,36-1,26)	*

Ghi chú: Độ lặp lại n = 4; CI: Confidence Interval; \*p < 0,01; \*\*p < 0,05.

sự thay đổi là không đáng kể ở lò 10  $\mu$ g/L BPA (giảm 2%).

## THẢO LUẬN

Phơi nhiễm cá sọc ngựa giai đoạn Juvenile với 100  $\mu$ g/L BPA liên tục 60 ngày gây nên suy giảm biểu hiện mRNA đồng thời hai gene, PPAR $\gamma$  và C/EBP $\alpha$  ở gan với mức độ suy giảm tương tự nhau, 67% và 70%.

Trong khi một số nghiên cứu chỉ ra BPA gây tăng biểu hiện gene PPAR $\gamma$  ở mô mỡ và biệt hóa tế bào béo của động vật<sup>17,18</sup> thì nghiên cứu này lại cho thấy ở nồng độ BPA 100  $\mu$ g/L (438 nM) gây tác động biểu hiện giảm ở mô gan cá sọc ngựa giai đoạn tăng trưởng. Như vậy tác động của BPA có thể trái chiều ở các mô khác nhau, có thể do vai trò điều hòa của PPAR $\gamma$  ở mỗi mô là khác nhau<sup>19</sup>. Thụ thể này chỉ biểu hiện một lượng rất nhỏ ở mô gan càng cho thấy những thay đổi nhỏ về mức độ có thể gây ảnh hưởng lớn lên chuyển hóa. Nghiên cứu còn cho thấy thụ thể này có tác động trực tiếp lên điều hòa glucose ở gan<sup>19,20</sup>. Tác động giảm biểu hiện khoảng 67% của gene PPAR $\gamma$  gan trong nghiên cứu này là đáng kể, cho thấy protein này có thể là một mắt xích quan trọng chịu trách nhiệm điều hòa các chu trình trung tâm giữa glucose, lipid và năng lượng ghi nhận trong nghiên cứu proteomics của Ngo TM, 2017<sup>1</sup> thực hiện ở điều kiện tương tự. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Martella A, 2016<sup>20</sup> về thụ thể khác cùng nhóm là PPAR $\alpha$ , biểu hiện chủ yếu ở gan, cũng bị giảm biểu hiện khoảng 30% và lipid bị tích tụ nhiều hơn ở gan khi cho cá sọc ngựa 6 tháng tuổi phơi nhiễm với BPA 100  $\mu$ g/L trong 48 giờ. PPAR $\gamma$  vốn biểu hiện rất ít ở gan người bình thường nhưng đối với bệnh tiểu đường type 2 thì gần như không có biểu hiện. Khi nghiên cứu dùng thuốc chủ vận (agonist) đã làm tăng biểu hiện của PPAR $\gamma$  lên 6 – 7 lần, nhờ đó tăng hoạt tính của của gan, tăng oxi hóa glucose, nhưng đồng thời giảm chất béo tự do, giảm kháng insulin<sup>21</sup>. BPA tác động ngược lại, làm giảm lượng PPAR $\gamma$  có nghĩa là giảm hoạt tính của gan, giảm điều hòa glucose của gan tương tự như tình trạng chuyển hóa của bệnh tiểu đường type 2<sup>8</sup>. Ngoài ra nghiên cứu của Gazit V, 2012<sup>9</sup> còn cho thấy PPAR $\gamma$  còn đóng vai trò trong

tái tạo tế bào gan, một chức năng quan trọng của gan mà nếu suy giảm dẫn đến xơ gan. BPA làm giảm biểu hiện của thụ thể này còn có thể gây nên giảm khả năng tái tạo của tế bào gan. Cần có thêm nghiên cứu về vấn đề này.

C/EBP $\alpha$  là thụ thể ở nhân biểu hiện nhiều cả ở mô gan và mô mỡ trắng. Trong khi phần lớn các nghiên cứu về vai trò của thụ thể này ở mô mỡ thì có rất ít nghiên cứu ở gan. Ở gan, thụ thể này tham gia vào chức năng kiểm soát điều hòa lipid và glucose theo cách thức trái ngược nhau. Khi phá hỏng gene này ở gan chuột nhắt gây sụt giảm sự biểu hiện của enzyme glucokinase, tức suy giảm mức độ điều hòa nồng độ đường huyết cao của gan, giảm tạo thành triglyceride, tăng protein vận chuyển acid béo, nhưng không thay đổi tổng hợp glycogen<sup>11,22</sup>. Mặt khác, gan người nhiễm mỡ (steatosis) không phải do rượu thì protein vận chuyển acid béo FABP1 bị ức chế bởi C/EBP $\alpha$ <sup>23</sup>. Điều này có nghĩa giảm mức độ biểu hiện C/EBP $\alpha$  có thể làm tăng hình thành acid béo. Như vậy tác động của BPA gây suy giảm gene C/EBP $\alpha$  ở gan ở đây có thể liên quan tới sự tăng protein vận chuyển acid béo ghi nhận được ở gan cá sọc ngựa như trong nghiên cứu proteomics của Ngo TM, 2017<sup>1</sup> khi phơi nhiễm ở cùng nồng độ 100  $\mu$ g/L BPA. Kết hợp kết quả nghiên cứu này với kết quả nghiên cứu đã công bố của cùng nhóm tác giả Ngo TM, 2017<sup>1,24</sup> cho thấy BPA có khả năng tác động đến điều hòa glucose và lipid ở gan gây nên suy giảm chức năng gan, dẫn đến gan nhiễm mỡ, tức là tích tụ acid béo (steatosis) chứ không phải là biệt hóa tế bào mỡ (adipogenesis).

## KẾT LUẬN

Như vậy ở động vật, BPA không chỉ là hợp chất gây biến đổi nội tiết tố sinh sản trong giai đoạn phôi và mới sinh như nhiều tài liệu công bố mà còn tác động làm suy giảm chức năng hoạt động của gan ở giai đoạn tăng trưởng. Chức năng gan của cá sọc ngựa bị thay đổi bởi tác động của BPA có thể có sự tham gia của hai thụ thể PPAR $\gamma$  và C/EBP $\alpha$ . Để có được kết luận chắc chắn hơn về vai trò của hai thụ thể này đối với chức năng gan thì cần phải có được dữ liệu tương quan giữa hoạt tính sinh hóa của gan với mức độ biểu hiện

**Bảng 3: Sự thay đổi biểu hiện mRNA của gene C/EBP $\alpha$**

Mẫu	C/EBP $\alpha$ CT $\pm$ SD	$\beta$ -actin CT $\pm$ SD	$\Delta$ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta CT}$ (95% CI)	F
Đối chứng	26,39 $\pm$ 0,29	18,30 $\pm$ 1,06	8,09 $\pm$ 1,1	0,00 $\pm$ 1,10	1,0 (0,47-2,14)	-
BPA 10 $\mu$ g/L	34,62 $\pm$ 0,80	21,18 $\pm$ 0,44	13,4 $\pm$ 0,91	5,35 $\pm$ 0,91	0,02 (0,01-0,05)	**
BPA 100 $\mu$ g/L	23,94 $\pm$ 0,65	15,34 $\pm$ 0,37	8,6 $\pm$ 0,75	0,51 $\pm$ 0,75	0,70 (0,42-1,18)	*

Ghi chú: Độ lặp lại n = 4; CI: Confidence Interval; \*p < 0,01; \*\*p < 0,05

mRNA. Ngoài ra khoảng nồng độ từ 10  $\mu$ g/L BPA đến 100  $\mu$ g/L BPA chứa các ngưỡng NOEC và LOEC, vì thế cần được chia nhỏ bước nhảy nồng độ để xác định lại các trị số này chính xác hơn.

## CHỮ VIẾT TẮT

BPA: bisphenol A

C/EBPs : nhóm protein tăng cường gắn CCAAT

C/EBP $\alpha$  : protein tăng cường gắn CCAAT dạng alpha

CT: chu kì ngưỡng

LOEC: Nồng độ thấp nhất quan sát thấy tác động

NOEC: Nồng độ cao nhất không quan sát thấy tác động

OECD: Tổ chức Hợp tác Kinh tế và Phát triển

PPARs : nhóm protein thụ thể hoạt hóa tiền peroxisome

PPAR $\gamma$ : thụ thể hoạt hóa tiền peroxisome dạng gamma

## Y ĐÚC TRONG NGHIÊN CỨU

Các thí nghiệm với cá sọc ngựa thuộc đề tài C2017-20-35 của Đại học Quốc gia TP.HCM đã được chấp thuận về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học, chứng nhận số 4-2019/NCHG-HĐĐĐ của Viện nghiên cứu thể hệ gene.

## XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả không có xung đột lợi ích.

## ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Nguyễn Thành Công và Ngô Thị Mai là người thực hiện thí nghiệm, thu thập và xử lý các dữ liệu thu được. Lê Phi Nga và Ngô Thị Mai đóng góp chính trong việc viết và chỉnh sửa bản thảo.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ từ đề tài C2017-20-35 của Đại học Quốc gia TP.HCM.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngo TM, Chi HLD, Le PN. A proteomic analysis to assess the effects of chronic exposure of bisphenol A to adult zebrafish (*Danio rerio*). Tạp chí Sinh học. 2017;39(3):333-341. Available from: [10.15625/0866-7160/v39n3.98995](https://doi.org/10.15625/0866-7160/v39n3.98995).

2. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. Nature. 2017;405(6785):421-4. Available from: [10.1038/35013000](https://doi.org/10.1038/35013000).
3. Cave M, Clair HB, Hardesty JE, Falkner KC, Feng W, Clark BJ, et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. Biochim Biophys Acta. 2016;1859(9):1083-99. Available from: [10.1016/j.bbagr.2016.03.002](https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.03.002).
4. Eguchi A, Feldstein AE. Adipocyte cell death, fatty liver disease and associated metabolic disorders. Digestive Diseases. 2014;32(5):579-85. Available from: [10.1159/000360509](https://doi.org/10.1159/000360509).
5. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. Cell. 2005;123(6):993-1002. Available from: [10.1016/j.cell.2005.11.026](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.026).
6. Tsai YS, Maeda N. PPARgamma: a critical determinant of body fat distribution in humans and mice. Trends in Cardiovascular Medicine. 2005;15(3):81-6.
7. Derosa G, Maffioli P. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- (PPAR-) Agonists on Glycemic Control, Lipid Profile and Cardiovascular Risk. Current Molecular Pharmacology. 2012;5(2):272-81. Available from: [10.2174/1874467211205020272](https://doi.org/10.2174/1874467211205020272).
8. Chigurupati S, Dhanaraj SA, Balakumar P. A step ahead of PPAR full agonists to PPAR partial agonists: therapeutic perspectives in the management of diabetic insulin resistance. European Journal of Pharmacology. 2015;755:50-7. Available from: [DOI:10.1016/j.ejphar.2015.02.043](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.02.043).
9. Gazit V, Huang J, Weymann A, Rudnick DA. Analysis of the role of hepatic PPAR expression during mouse liver regeneration. Hepatology. 2012;56(4):1489-98. Available from: [10.1002/hep.25880](https://doi.org/10.1002/hep.25880).
10. Birkenmeier EH, Gwynn B, Howard S, Gordon JJ, Landschulz JI, Mcknight WH, et al. Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. Genes & Development. 1989;3(8):1146-56.
11. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. Science. 1995;269(5227):1108-20.
12. Inoue Y, Inoue J, Lambert G, Yim SH, Gonzalez FJ. Disruption of hepatic C/EBP results in impaired glucose tolerance and age-dependent hepatosteatosis. Journal of Biological Chemistry. 2004;279(43):44740-8. Available from: [10.1074/jbc.M405177200](https://doi.org/10.1074/jbc.M405177200).
13. Evan DR, Chung-Hsin H, Xinzhong W, Shuichi S, Mason WF, Frank JG, et al. C/EBP induces adipogenesis through PPAR: a unified pathway. Genes & Development. 2002;16(1):22-8. Available from: [10.1101/gad.948702](https://doi.org/10.1101/gad.948702).
14. Andrea CE, Hogenedoorn P. Epiphyseal growth plate and secondary peripheral chondrosarcoma: the neighbours matter. Journal of Pathology. 2012;226(2):219-28. Available from: [10.1002/path.3003](https://doi.org/10.1002/path.3003).
15. Tang R, Dodd A, Lai D, Mcnabb WC, Love DR. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 2007;39(5):384-90. Available from: [10.1111/j.1745-7270.2007.00283](https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00283).

16. Livak KJ, Schmittgene TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8. Available from: [10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262).
17. Ariemma F, Esposito D, Liguoro V, Cabaro D, Liotti S, A, et al. Low-Dose Bisphenol-A Impairs Adipogenesis and Generates Dysfunctional 3T3-L1 Adipocytes. *PloS One*. 2016;11(3):e0150762. Available from: [10.1371/journal.pone.0150762](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150762).
18. Broeder MJ, Kopylova VA, Kamminga LM, Legler J. Zebrafish as a model to study the role of peroxisome proliferating-activated receptors in adipogenesis and obesity. *PPAR Researches*. 2015;p. ID358029. Available from: [10.1155/2015/358029](https://doi.org/10.1155/2015/358029).
19. Kim H, Ahn Y. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- in the Glucose-Sensing Apparatus of Liver and - Cells. *Diabetes*. 2004;53(1):60–5. Available from: [10.2337/diabetes.53.2007.S60](https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S60).
20. Martella A, Silvestri C, Maradonna F, Gioacchini G, Allar M, Radaellic G, et al. Bisphenol A induces fatty liver by an endocannabinoid-mediated positive feedback loop. *Endocrinology*. 2016;157(5):1751–63. Available from: [10.1210/en.2015-1384](https://doi.org/10.1210/en.2015-1384).
21. Abbas A, Blandon J, Rude J, Elfar A, Mukherjee D. PPAR- agonist in treatment of diabetes: cardiovascular safety considerations. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medical Chemistry*. 2012;10:124–34. Available from: [10.2174/187152512800388948](https://doi.org/10.2174/187152512800388948).
22. Pedersen TA, Bereshchenko O, Garcia-Silva S, Ermakova O, Kurz E, Mandrup S, et al. Distinct C/EBP motifs regulate lipogenic and gluconeogenic gene expression in vivo. *EMBO Journal*. 2007;26(4):1081–93. Available from: [10.1038/sj.emboj.7601563](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601563).
23. Guzmán C, Benet M, Jover R. The human liver fatty acid binding protein (FABP) gene is activated by FOXA1 and PPAR; and repressed by C/EBP: Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1831(4):803–8. Available from: [10.1016/j.bbali.2012.12.014](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2012.12.014).
24. Ngo TM, Doan TPT, Nguyen TC, Vo TN, Do HL, Le PN. Chronic exposure of ug/L range Bisphenol A to adult zebrafish (*Danio rerio*) leading to adipogenesis. *AIP Conference Proceedings*. 2017;1878:22028. Available from: [10.1063/1.5000196](https://doi.org/10.1063/1.5000196).

# Down-regulation of hepatic PPAR $\gamma$ and C/EBP $\alpha$ genes in Juvenile-stage zebrafish exposed chronically to bisphenol A

Nguyen Thanh Cong<sup>1</sup>, Ngo Thi Mai<sup>2</sup>, Le Phi Nga<sup>3,\*</sup>

## ABSTRACT

**Introduction:** Bisphenol A (BPA) is used in synthesis of plastics. It is known as a potential chemical that causes hormonal changes in human and animals. Many previously studies showed that the activity of BPA was similar to estrogen and it could affect on embryonic and newborn stages. From a different approach, a research by these authors published in 2017 suggested that BPA could effect to the fast- growing stage of an animal based on proteomic profiles of Juvenile-stage zebrafish livers long term exposed to  $\mu\text{g/L}$  range of the chemical. This study was the extent of that research to further investigate which metabolic receptors in liver effected by BPA exposure. Among suggested-hepatic receptors, PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  genes may be targeted by BPA under such exposure condition. **Methods:** In this study, zebrafish at 30<sup>th</sup> day of age were exposed to 0, 10 and 100  $\mu\text{g/L}$  BPA, respectively, and continuously for 60 days under a standar condition for testing chronic toxicity of a chemical on fish. At the end of the testing, mRNA levels of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  genes in zebrafish livers of BPA-exposed groups were compared to that of BPA-unexposed group using Real-Time PCR method with  $\beta$ -actin gene as the reference gene. **Results:** BPA affected transcription level of both genes depending on the concentration of the chemical. Reduction of 67% and 70% on mRNA level for PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ , respectively, was only observed on 100  $\mu\text{g/L}$  BPA-exposed group. No significant change on such regulation was found in 10  $\mu\text{g/L}$  BPA-exposed group. **Conclusion:** Thus, the effect of BPA exposure on liver functions of zebrafish at juvenile stage may associate with hepatic PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  receptors and it depends on the chemical concentration.

**Key words:** bisphenol A, C/EBP $\alpha$ , Danio rerio, zebrafish liver, PPAR $\gamma$

<sup>1</sup>School of Biotechnology, International University, VNU-HCM

<sup>2</sup>Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM

<sup>3</sup>Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology, VNU-HCM

## Correspondence

**Le Phi Nga**, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology, VNU-HCM

Email: lephinga@hcmut.edu.vn

## History

- Received: 13-11-2018
- Accepted: 27-3-2019
- Published: 29-6-2019

## DOI :

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v3i2.519>



## Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Cong N T, Mai N T, Nga L P. Down-regulation of hepatic PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  genes in Juvenile-stage zebrafish exposed chronically to bisphenol A. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 3(2):120-127.