

Cao chiết Rau đắng biển (*Bacopa monnieri*) cải thiện hành vi tự kỷ theo cơ chế liên quan đến protein PTEN trên mô hình chuột thực nghiệm gây bởi muối natri valproat

Phạm Thị Nguyệt Hằng^{1*}, Phạm Anh Tùng², Trần Nguyên Hồng¹, Lê Thị Xoan¹,
Nguyễn Thị Lập², Nguyễn Thị Hiền³

¹Khoa Dược lý - Sinh hóa, Viện Dược liệu, 3B Quang Trung, phường Trảng Tiền, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Cao đẳng Y tế Hà Đông, 39 Nguyễn Viết Xuân, phường Quang Trung, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/6/2021; ngày chuyển phản biện 25/6/2021; ngày nhận phản biện 7/7/2021; ngày chấp nhận đăng 12/7/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu tiền đề của các tác giả đã chứng minh được tác dụng cải thiện khiếm khuyết hành vi của cao chiết Rau đắng biển (BME) trên mô hình chuột tự kỷ gây bởi muối natri valproat (VPA). Nghiên cứu này tập trung tìm hiểu thêm về tác dụng cải thiện một số hành vi thần kinh và cơ chế hóa sinh của BME. Chuột nhắt trắng cái mang thai 12-13 ngày được chia ra thành lô sinh lý và lô bệnh lý (tiêm phúc mạc bằng nước muối sinh lý hoặc VPA với liều 500 mg/kg). Lô sinh lý và lô bệnh lý lần lượt là lô chuột con có mẹ được tiêm nước muối sinh lý hoặc tiêm VPA và được uống nước cất trong suốt quá trình nghiên cứu. Lô điều trị gồm chuột con có mẹ được tiêm VPA và chuột mẹ sau khi sinh được uống BME hoặc nước cất cho đến khi con được 13 ngày tuổi. Từ 14 ngày tuổi, chuột con rối loạn tự kỷ được trực tiếp uống BME (50 mg/kg) nước cất trong suốt quá trình thí nghiệm. Các thử nghiệm hành vi (tự chải chuốt và giao tiếp xã hội) được đánh giá vào ngày tuổi thứ 20 và 30. Vào ngày tuổi thứ 40, não chuột được tách ra để đánh giá mức độ biểu hiện của protein PTEN bằng kỹ thuật Western blot. Kết quả cho thấy, BME liều 50 mg/kg có tác dụng cải thiện tự chải chuốt lại và thiếu hụt hành vi tương tác xã hội trên chuột tự kỷ 20 và 30 ngày tuổi; đồng thời có tác dụng phục hồi sự giảm mức độ biểu hiện của protein PTEN ở vỏ não chuột tự kỷ. Những kết quả này đã chứng minh, BME có tác dụng cải thiện một số hành vi cốt lõi của bệnh tự kỷ thông qua cơ chế liên quan đến phục hồi sự giảm mức độ biểu hiện protein PTEN trong vỏ não chuột tự kỷ thực nghiệm.

Từ khóa: hành vi lặp lại, lo âu, muối natri valproat, rau đắng biển, tương tác cộng đồng, tự kỷ.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Rối loạn phổ tự kỷ (Autism spectrum disorder - ASD, gọi tắt là tự kỷ) là rối loạn phát triển thần kinh, đặc trưng bởi những khiếm khuyết về giao tiếp và tương tác xã hội, đồng thời kèm theo các mẫu hình hành vi, sở thích lặp khuôn, giới hạn. Đặc biệt, rối loạn này thường xuất hiện ở đối tượng nhạy cảm là trẻ nhỏ với tỷ lệ hiện mắc theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) là 1/270 trẻ vào năm 2021 [1]. Ở Việt Nam, số lượng trẻ được chẩn đoán mắc tự kỷ tăng lên theo từng năm do việc thay đổi các tiêu chuẩn chẩn đoán và các yếu tố nguy cơ ngày càng nhiều. Vào năm 2017, tỷ lệ mắc tự kỷ ở Việt Nam là 0,752% [2]. Do đó, ASD đang ngày càng được quan tâm và nghiên cứu sâu hơn về cả nguyên nhân, chẩn đoán và điều trị. Rối loạn này vẫn chưa có thuốc điều trị đặc hiệu. Các thuốc được dùng cho các trường hợp được chẩn đoán ASD chủ yếu là các thuốc điều trị triệu chứng cho các rối loạn đi kèm và hỗ trợ cho các can thiệp chức năng. Các thuốc này chủ yếu thuộc nhóm chống loạn thần không điển hình và được chỉ ra có nhiều tác dụng không mong muốn và biến cố bất lợi hơn là hiệu quả mang lại [3]. Các liệu pháp hiện nay chủ yếu vẫn dựa trên trị liệu giáo dục và hành vi, vừa tốn công sức của gia đình, nhân viên y tế, vừa tốn nhiều chi phí. Vì vậy, ASD đang nhận được nhiều sự quan tâm, hỗ trợ từ cộng đồng.

Cây Rau đắng biển, hay còn gọi là cây ruột gà, rau sam trắng, rau sam đắng, ba kích, là một loại cây leo mọc ở những nơi ẩm ướt và nhiều ánh sáng. Rau đắng biển được phân bố ở khắp các vùng

đồng bằng và trung du ở cả miền Bắc và miền Nam. Loài cây này đã được sử dụng từ rất lâu để điều trị nhiều bệnh, đặc biệt là các bệnh có liên quan đến thần kinh. Trong các văn tự cổ của Ấn Độ, Rau đắng biển được ghi nhận là có tác dụng tăng hiểu biết, học tập và trí nhớ. Trong y học hiện đại, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành để chứng minh các tác dụng của loài thảo dược này. Nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã chứng minh rằng, BME có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ và cơ chế tác dụng liên quan đến khả năng bảo vệ, kích thích tăng sinh tế bào thần kinh trên mô hình thiếu máu não cục bộ cũng như mô hình cắt bỏ thùy khứu giác ở chuột nhắt [4, 5]. Trên mô hình chuột tự kỷ thực nghiệm gây bởi VPA, chúng tôi cũng đã chứng minh BME có tác dụng cải thiện khiếm khuyết hành vi của BME [6]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, chuột tự kỷ được điều trị bằng BME bắt đầu từ ngày tuổi thứ 21 mà không phải là qua sữa mẹ ngay từ khi mới sinh. Thêm vào đó, nhóm nghiên cứu chưa đánh giá cơ chế phân tử tác dụng của BME trên mô hình tự kỷ thực nghiệm. Chính vì vậy, để tìm hiểu thêm về tác dụng và cơ chế tác dụng của BME đối với bệnh ASD là cần thiết. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tiến hành đánh giá tác dụng cải thiện một số hành vi thần kinh của BME trên mô hình chuột nhắt trắng tự kỷ gây bởi VPA thông qua thử nghiệm đánh giá tương tác xã hội và hành vi lặp lại. Từ đó, bước đầu tìm hiểu cơ chế hóa sinh của BME thông qua đánh giá thay đổi mức độ biểu hiện protein đặc trưng cho ASD trên mô hình chuột nhắt trắng tự kỷ gây bởi VPA sử dụng kỹ thuật Western blot.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyethangpt@nimm.org.vn

Bacopa monnieri extract ameliorates core autistic behavioural deficits of sodium valproate-induced autism spectrum disorder in mice, and its mechanism of action related to PTEN protein

Thi Nguyen Hang Pham^{1*}, Anh Tung Pham², Nguyen Hong Tran¹, Thi Xoan Le¹, Thi Lap Nguyen², Thi Hien Nguyen³

¹Department of Pharmacology and Biochemistry, National Institute of Medicinal Materials, 3B Quang Trung, Trang Tien Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Pharmacy,

13-15 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

³Ha Dong Medical College,

39 Nguyen Viet Xuan Street, Quang Trung Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 22 June 2021; revised 7 July 2021; accepted 12 July 2021

Abstract:

Our previous study demonstrated the effect of *Bacopa monnieri* extract (BME) on behavioural deficits in sodium valproate (VPA)-induced autism spectrum disorder in mice. The present study aims to further investigate the effect of BME on neurobehaviors of autism spectrum disorder (ASD) in mice and the biochemical mechanism(s) involved. Female pregnant mice were divided into control and VPA treated groups at 12-13 days of gestation (saline/sodium valproate 500 mg/kg respectively, i.p.). Control group pups of saline-treated mothers received distilled water. The VPA-treated mothers received either distilled water or BME (50 mg/kg, p.o.) after birth until 13 days later. Then, from postnatal day 14, ASD pups were orally treated with BME (50 mg/kg)/distilled water for the duration of the study. Behavioural deficits (repetitive behaviour and social behaviour deficit) were measured by a self-grooming test and a three-chamber test on postnatal days 20 and 30. On postnatal day 40, the cerebral cortex of pups was isolated for evaluation of the expression level of PTEN protein using the Western blot method. The results showed that BME (50 mg/kg, p.o.) significantly improved repetitive behaviour and social behaviour deficits in ASD mice on postnatal day 20 and 30, and also increased PTEN protein expression level in the brain of ASD mice. These results demonstrated that BME ameliorates core behaviours of autism and concurrently restores decreases in PTEN protein expression in the cerebral cortex of valproate-treated mice.

Keywords: anxiety, ASD, *Bacopa monnieri*, self-repetitive behaviour, social interaction, sodium valproate.

Classification number: 3.4

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị BME

Mẫu Rau đắng biển được thu thập tại Thanh Hóa (2019) và được giám định bởi Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. BME được chuẩn bị như những nghiên cứu trước tại Viện Dược liệu [4]. Phần trên mặt đất được liệu Rau đắng biển được sấy khô ở 50°C, sau đó cắt nhỏ và nghiền đến kích thước thích hợp. Bột dược liệu được chiết cách thủy ở 85°C 3 lần bằng ethanol 50%. Dịch chiết ethanol

được gộp lại và lọc qua giấy lọc. Dịch chiết được thu hồi ethanol dưới áp suất giảm và bốc hơi nước. Dịch cô đặc sau đó sẽ được chiết 3 lần với n-butanol. Pha butanol được rửa lại với nước rồi thu hồi dung môi dưới áp suất giảm. Cao được sấy trong tủ sấy chân không ở 50°C để thu được BME có hàm ẩm 4,5%. Hiệu suất chiết là 8,3%. BME sau đó được phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC. Kết quả thu được cao chứa 21,8% bacoside A và 11,0% bacoside I [4].

2.2. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng mang thai chủng *Swiss albino* do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Chuột mẹ được nuôi ổn định trong chuồng riêng, điều kiện phòng thí nghiệm nhiệt độ 25±1°C, độ ẩm 65±5%, chu kỳ sáng và tối là 12/12 (bật đèn từ 7:00 đến 19:00 giờ), thức ăn và nước uống được cung cấp đầy đủ. Chuột con sau khi sinh ra được đánh dấu và nuôi cùng chuột mẹ trong 21 ngày đầu, sau đó tách mẹ. Sau khi tách mẹ, chuột con được nuôi theo nhóm (4-6 con/chuồng). Tất cả các thử nghiệm hành vi được tiến hành trong pha sáng từ 9:00 đến 18:00 giờ. Chuột con 40 ngày tuổi được tách lấy não để làm Western blot.

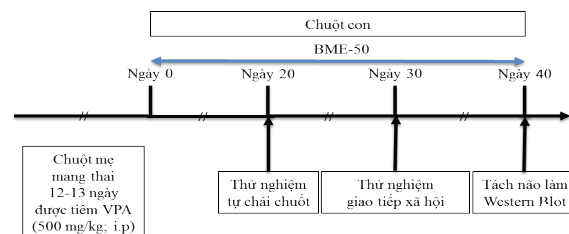
2.3. Phương pháp gây mô hình chuột tự kỷ thực nghiệm bởi VPA

Áp dụng mô hình gây tự kỷ thực nghiệm trên chuột nhắt trắng bằng VPA [6]. Chuột mang thai 12-13 ngày, được tiêm phúc mạc VPA liều 500 mg/kg thể trọng.

Chuột mẹ được chia 3 lô (2 chuột mẹ/lô): lô 1 (lô chứng sinh lý): chuột mẹ khỏe mạnh và được cho uống nước cất trong vòng 13 ngày đầu sau sinh; lô 2 (lô chứng bệnh lý, ký hiệu VPA): chuột mẹ được tiêm VPA như trên và được cho uống nước cất trong vòng 13 ngày đầu sau sinh; lô 3 (lô điều trị, ký hiệu VPA-BME 50): chuột mẹ được tiêm VPA và được cho uống BME liều 50 mg/kg thể trọng trong vòng 13 ngày đầu sau sinh.

Chuột con sau sinh được chia 3 lô (9-11 con/lô) tương ứng với chuột mẹ: lô 1 (lô chứng sinh, 9 chuột con): con của chuột mẹ khỏe mạnh và được cho uống nước cất từ 14 ngày tuổi đến khi kết thúc quá trình thí nghiệm; lô 2 (lô chứng bệnh lý, VPA, 11 chuột con): con của chuột mẹ được tiêm VPA như trên và được cho uống nước cất từ 14 ngày tuổi đến khi kết thúc quá trình thí nghiệm; lô 3 (lô điều trị, VPA-BME 50, 11 chuột con): con của chuột mẹ được tiêm VPA như trên và được cho uống BME liều 50 mg/kg thể trọng từ 14 ngày tuổi đến khi kết thúc quá trình thí nghiệm.

Quá trình nghiên cứu được mô tả ở hình 1.



Hình 1. Quy trình thí nghiệm. BME-50: BME liều 50 mg/kg.

2.4. Phương pháp đánh giá tác dụng cải thiện hành vi lặp lại bằng thử nghiệm tự chải chuốt (self-grooming assay)

Thử nghiệm được tiến hành theo nghiên cứu của J.L. Silverman và cs (2010) [7]. Thử nghiệm dựa trên tập tính tự chải chuốt nhằm

duy trì vệ sinh và các quá trình sinh lý quan trọng khác như điều chỉnh nhiệt độ, giao tiếp xã hội và kích thích của các loài gặm nhấm. Hành vi này được quan sát thấy thường xuyên nhất ở động vật gặm nhấm bình thường, mang tính lặp lại. Chuột con 20 ngày tuổi được cho uống nước muối sinh lý hoặc BME liều 50 mg/kg 30 phút trước khi tiến hành thử nghiệm. Chuột con được đặt vào trong một buồng thí nghiệm cách âm, cường độ ánh sáng là 7 lux, trên buồng có một camera. Chuột được tự do khám phá buồng trong 10 phút. Tất cả hoạt động của chuột trong 10 phút được camera ghi lại. Sau 10 phút, chuột được đưa ra ngoài và buồng được vệ sinh bằng ethanol 70% trước khi tiến hành thử nghiệm với các chuột con khác. Sau đó, tổng thời gian chuột chải chuốt (gãi đầu, tai và lông) được phân tích mù bởi 2 nghiên cứu viên một cách độc lập.

2.5. Phương pháp đánh giá tác dụng cải thiện suy giảm tương tác cộng đồng bằng thử nghiệm giao tiếp xã hội (social interaction test)

Thử nghiệm được tiến hành theo nghiên cứu của J.J. Nadler và cs (2004) [8]. Thử nghiệm dựa trên đặc điểm thích dành nhiều thời gian hơn với con cùng loài và tìm hiểu các thử mới hơn là những thử quen thuộc của loài gặm nhấm. Thử nghiệm gồm có 2 pha là làm quen và kiểm tra. Chuột con 30 ngày tuổi được cho uống nước hoặc BME (50 mg/kg) 1 giờ trước khi tiến hành thử nghiệm. Thử nghiệm cần một hệ thống gồm có 3 buồng, 2 buồng hai bên có chứa hộp lưới ở chính giữa, có phiên nhựa để ngăn các buồng khi cần. Cường độ ánh sáng trong buồng là 7-8 lux. Chuột được đặt nhẹ nhàng vào buồng giữa. Trong pha làm quen, chuột được tự do di chuyển khám phá cả 3 buồng trong 5 phút. Sau đó, chuột lại được đưa về buồng giữa trong 1 phút và buồng giữa được ngăn cách với các buồng còn lại bằng tấm nhựa. Trong pha kiểm tra, một chuột khác cùng giới và cùng khối lượng được đưa vào một trong hai hộp lưới. Con chuột cùng giới được đặt trong hộp lưới là chuột được nuôi ở riêng biệt với nhóm chuột thí nghiệm. Các tấm nhựa ngăn được đưa ra ngoài và chuột nghiên cứu lại được tự do khám phá cả 3 buồng trong 10 phút. Toàn bộ hoạt động của chuột được máy quay phim ghi lại. Thời gian chuột vào các buồng và tiếp xúc với các hộp lưới được lưu lại để phân tích bằng phần mềm ANY-maze, Stoeling, Mỹ.

2.6. Phương pháp đánh giá sự thay đổi biểu hiện của protein PTEN ở vùng vỏ não bằng kỹ thuật Western blot

Mức độ biểu hiện của protein PTEN được phân tích bằng kỹ thuật Western blot. Chuột con 40 ngày tuổi sẽ được gây mê để tách lấy não và thu lấy phần vỏ não. Các phần này được bảo quản trong tủ lạnh âm sâu (-86°C) cho đến khi tiến hành thí nghiệm tiếp theo. Quy trình thực hiện được tiến hành theo mô tả của các nghiên cứu trước của chúng tôi [5]. Vỏ não được đồng nhất hóa sử dụng máy nghiền mô Lab gen 125 (Cole-Parmer, Mỹ) trong đệm ly giải, chứa 50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% sodium deoxycholate, 1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (v/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 150 mM NaF, 1,12 µg/ml aprotinin, 20 mM sodium orthovanadate, 10 µg/ml leupeptin, 0,25 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride. Dịch ly giải được ly tâm ở tốc độ 15000 vòng/15 phút/4°C, thu lấy dịch nổi để định lượng protein. Nồng độ protein được xác định bằng bộ kit định lượng protein BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, Mỹ) và máy đọc đĩa ELISA (BioTek, Mỹ). Protein tổng số (15 µg) từ mỗi mẫu vỏ não chuột được được điện di trên gel 12,5% SDS-polyacrylamid (SDS-PAGE) và sau đó được chuyển bằng điện trường lên một màng nitrocellulose (Bio-Rad, Mỹ). Màng được khóa bằng dung dịch skim milk 5% (Sigma-Aldrich, Mỹ)

trong dung dịch đệm Tris chứa 0,1% Tween 20 (TBS-T) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Màng được ủ với kháng thể đơn dòng của chuột kháng protein PTEN (1:500, sc-7974, Santa Cruz Biotechnology, INC., Mỹ), kháng thể đơn dòng của thỏ kháng β -actin (1:6000, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Mỹ) ở 4°C qua đêm. Sau khi được rửa bằng TBS-T, màng được ủ với kháng thể thứ cấp IgG kháng thỏ hoặc chuột liên kết với HRP (DakoCytomation EnVision+System-HRP Labeled Polymer) (Dako Cytomation, Inc., Carpinteria, CA, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phức hệ miễn dịch được nhận biết bởi phương pháp phát quang hóa học tăng cường (GE Healthcare Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) (GE Healthcare, Mỹ) và được chụp lại bằng máy ImageQuant LAS500 (GE Healthcare, Mỹ). Định lượng các băng có phản ứng miễn dịch được phân tích bằng phần mềm ImageJ 1.50i (Wayne Rasband, NIH, Mỹ). Màng được tái sử dụng bằng đệm Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Mỹ).

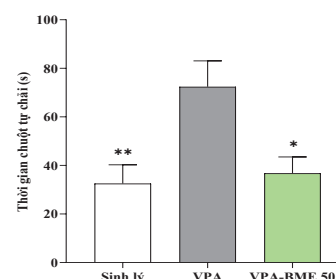
2.7. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0. Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình (MEAN) $\pm$ sai số chuẩn (SEM). Dữ liệu của thử nghiệm tự chải chuốt và Western blot được phân tích bằng one-way analysis of variance (ANOVA), theo sau bởi hậu kiểm (Dunnnett 2-sided t test). Dữ liệu của thử nghiệm 3 buồng được phân tích bằng Student's Pair T test. Sự khác biệt giữa các mẫu đạt ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Đánh giá tác dụng cải thiện các hành vi lặp lại bằng thử nghiệm tự chải chuốt

Thử nghiệm tự chải chuốt để đánh giá tác dụng cải thiện hành vi lặp lại trên chuột tự kỷ của BME. Thí nghiệm được thực hiện trên 3 lô (n=9-11 con/lô). Kết quả của thử nghiệm tự chải chuốt để đánh giá tác dụng cải thiện các hành vi lặp lại của BME được thể hiện ở hình 2 cho thấy, ở lô chuột VPA (bệnh lý), tổng thời gian chuột tự chải chuốt trong 10 phút tăng đáng kể so với lô chuột sinh lý. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Tổng thời gian chuột tự chải chuốt trong 10 phút ở nhóm điều trị BME liều 50 mg/kg giảm 1,97 lần so với lô bệnh lý, đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

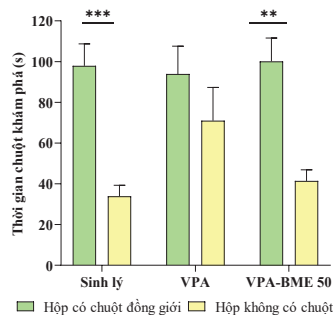


Hình 2. Tác dụng cải thiện hành vi lặp lại của BME. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ so sánh với lô VPA.

3.2. Đánh giá tác dụng cải thiện suy giảm tương tác xã hội của chuột ASD 30 ngày tuổi bằng thử nghiệm giao tiếp xã hội

Thử nghiệm giao tiếp xã hội được thực hiện để đánh giá tác dụng cải thiện thiếu hụt hành vi tương tác xã hội trên chuột tự kỷ của BME. Thí nghiệm được thực hiện trên 3 lô (n=8-10 con/lô). Kết

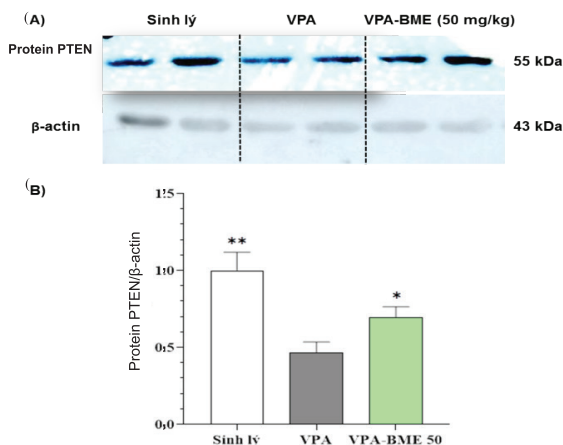
qua được thể hiện ở hình 3 cho thấy, đối với chuột ở lô sinh lý, thời gian chuột khám phá hộp có chuột đồng giới cao hơn đáng kể so với thời gian khám phá hộp không có chuột. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê về thời gian chuột khám phá hộp có chuột đồng giới so với thời gian khám phá hộp không có chuột ở lô bệnh lý. Đối với lô chuột tự kỷ được điều trị bằng BME với liều 50 mg/kg, thời gian chuột khám phá hộp có chuột đồng giới cao hơn gấp 2,39 lần so với thời gian khám phá hộp không có chuột. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.



Hình 3. Tác dụng tăng tương tác xã hội của BME. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ so sánh thời gian khám phá hộp có chuột đồng giới với thời gian khám phá hộp không có chuột của từng lô.

3.3. Đánh giá mức độ biểu hiện của protein PTEN

Để tìm hiểu về cơ chế tác dụng của BME, mức độ biểu hiện của protein PTEN được đánh giá bằng kỹ thuật Western blot. Thí nghiệm được thực hiện trên 3 lô ($n = 5-6$ con/lô).



Hình 4. Mức độ biểu hiện của protein PTEN. (A) Sự biểu hiện của protein PTEN theo cường độ tín hiệu hóa phát quang thu được; (B) Tỷ lệ tín hiệu protein PTEN/β-actin ở các lô chuột. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ so sánh với lô VPA.

Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của protein PTEN được thể hiện ở hình 4 cho thấy, mức độ biểu hiện của protein PTEN của lô sinh lý cao gấp 2,14 lần so với lô bệnh lý (sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$). Mức độ biểu hiện của protein PTEN ở lô điều trị bằng BME cao gấp 1,49 lần so với lô bệnh lý (sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$). Mặc dù vậy, phục hồi mức độ biểu hiện protein PTEN ở lô điều trị BME vẫn thấp hơn so với lô chứng sinh lý, đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng mô hình chuột nhắt trắng gây tự kỷ thực nghiệm bằng VPA để nghiên cứu tác dụng giảm các triệu chứng ASD của BME. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh BME (50 mg/kg) có tác dụng cải thiện một số hành vi thần kinh cốt lõi của rối loạn phổ tự kỷ trên mô hình chuột tự kỷ thực nghiệm gây bởi VPA. Việc lựa chọn liều cao chiết BME 50 mg/kg được thiết kế dựa trên các nghiên cứu đã công bố trước đây của chúng tôi [4-6].

Trên thế giới cũng đã có nhiều nghiên cứu về mô hình chuột với các bệnh về thần kinh, đặc biệt là về rối loạn phổ tự kỷ. Để gây được mô hình tự kỷ trên chuột, có thể dùng phương pháp di truyền hoặc hóa chất gây độc. Tuy nhiên, các mô hình gây tự kỷ bằng di truyền yêu cầu những kỹ thuật đặc biệt và cần nhiều kinh phí hơn. Do đó, mô hình gây tự kỷ bằng VPA được ứng dụng nhiều hơn do dễ thực hiện hơn trong các nghiên cứu về ASD [4, 5, 9-14]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã quyết định lựa chọn mô hình chuột nhắt trắng gây tự kỷ thực nghiệm bằng VPA để nghiên cứu tác dụng giảm các triệu chứng ASD của BME. Sau khi đã khắc phục các nhược điểm của mô hình, các kết quả về hành vi và mức độ biểu hiện của protein PTEN trong nghiên cứu này đã cho thấy mô hình tự kỷ gây bởi VPA được xây dựng thành công vì đã có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô sinh lý và bệnh lý.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng cải thiện khả năng tương tác xã hội qua thử nghiệm giao tiếp xã hội của BME. Khiếm khuyết trong khả năng tương tác xã hội là một trong những triệu chứng cốt lõi của ASD. Khiếm khuyết này là một trong những gánh nặng đối với bệnh nhân và có thể dễ dàng quan sát được khi bệnh nhân ở nơi có người lạ. Khả năng tương tác xã hội có liên quan chặt chẽ với mức độ tiếp xúc với người lạ. Ở chuột bình thường, chuột sẽ có xu hướng tiếp xúc với hộp có chuột đồng giới hơn là hộp không có chuột, do đó, thời gian chuột tiếp xúc với hộp có chuột đồng giới cao hơn [7]. So sánh sự khác biệt về thời gian tiếp xúc giữa hộp có chuột đồng giới với thời gian tiếp xúc với hộp không có chuột là tiêu chí để đánh giá được khả năng tương tác cộng đồng. Nghiên cứu này cho thấy, chuột sinh lý có thời gian tiếp xúc với hộp có chuột đồng giới lớn hơn đáng kể so với hộp không có chuột. Trong khi đó, không có sự khác biệt đáng kể, đạt ý nghĩa thống kê về thời gian tiếp xúc với hộp có chuột đồng giới so với hộp không có chuột ở lô bệnh lý cho thấy khiếm khuyết về tương tác xã hội. Như vậy, mô hình chuột tự kỷ đã được gây thành công. Bên cạnh đó, thời gian tiếp xúc với hộp có chuột đồng giới ở lô được điều trị BME liều 50 mg/kg thể trọng cao hơn đáng kể so với thời gian tiếp xúc với hộp không có chuột. Điều đó cho thấy, BME có tác dụng cải thiện thiếu hụt hành vi tương tác xã hội ở chuột tự kỷ gây bởi VPA. Kết quả này cũng phù hợp với thử nghiệm giao tiếp xã hội của nhóm nghiên cứu trước, cũng trên mô hình chuột tự kỷ gây bởi VPA và được điều trị bằng BME [6].

Nghiên cứu về hành vi lặp lại bằng thử nghiệm tự chải chuốt cho thấy, BME (50 mg/kg) có tác dụng cải thiện các hành vi lặp lại ở chuột tự kỷ gây bởi VPA. Hành vi lặp lại là một trong những triệu chứng cốt lõi và dễ dàng quan sát, nhận biết nhất ở các bệnh nhân tự kỷ. Tần suất lặp lại hành vi có liên quan đến mức độ bệnh. Nghiên cứu này cho thấy, chuột bệnh lý có tổng thời gian tự chải chuốt trong 10 phút cao hơn đáng kể so với chuột sinh lý cho thấy chuột tự kỷ có mức độ lặp lại hành vi cao hơn chuột bình thường. Đã có nhiều nghiên cứu trước đó cũng cho kết quả tương tự [8, 15-17]. Bên cạnh đó, lô chuột được

điều trị bằng BME (50 mg/kg) cũng có tổng thời gian tự chải chuốt ít hơn đáng kể so với lô bệnh lý.

Kết quả bước đầu nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, BME có tác dụng phục hồi sự giảm mức độ biểu hiện của protein PTEN cho thấy BME có tác dụng cải thiện một số hành vi cốt lõi của ASD có thể một phần thông qua cơ chế liên quan đến mức độ biểu hiện của protein PTEN. Các nghiên cứu di truyền và hóa sinh về protein PTEN đã chứng minh vai trò của protein này trong bệnh lý tự kỷ [18-23]. Protein PTEN đóng vai trò quan trọng trong điều hòa chu trình tế bào và tổng hợp protein thông qua con đường PI3K/AKT/mTOR. Trong đó, khi thiếu hụt protein PTEN, đặc biệt ở các tế bào hệ thần kinh trung ương, cấu trúc của tế bào và của mô có thể thay đổi, dẫn đến các triệu chứng của ASD. Do đó, nếu cải thiện được mức độ biểu hiện của protein PTEN, các triệu chứng của tự kỷ cũng có thể được cải thiện. Bằng kỹ thuật Western blot, chúng tôi đã đánh giá mức độ biểu hiện protein PTEN ở não chuột thử nghiệm. Kết quả cho thấy, tỷ lệ protein PTEN/ β -actin ở lô bệnh lý (tiêm VPA) là thấp hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,01$). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó [18-23]. Chuột VPA được điều trị bằng BME liều 50 mg/kg có tỷ lệ protein PTEN/ β -actin cao hơn 1,49 lần so với lô bệnh lý ($p < 0,05$).

Điểm mới của nghiên cứu này là thay vì cho chuột tự kỷ dùng thuốc từ 21 ngày tuổi như nhiều nghiên cứu trước đây, nghiên cứu này đã thay đổi thời điểm bắt đầu điều trị sang cho chuột uống thuốc điều trị ngay từ khi mới sinh. Điều này cũng tương đồng với chứng tự kỷ ở người, khi thời gian phát hiện ra bệnh chủ yếu rơi vào 3 năm đầu đời. Do đó, từ kết quả nghiên cứu trên mô hình chuột của đề tài này có thể rút ra khi tiến tới sử dụng trên người: nếu trẻ có thể dùng thuốc sớm thông qua sữa mẹ thì hiệu quả điều trị có thể được nâng cao hơn. Một điểm mới nữa có thể kể đến ở nghiên cứu này, đó là nghiên cứu đã chứng minh được BME có cải thiện mức độ biểu hiện của protein PTEN trên mô hình chuột nhất trắng gây tự kỷ thực nghiệm bởi VPA. Hiện tại trên thế giới, có một vài nghiên cứu sử dụng protein PTEN là một đích phân tử để đánh giá cơ chế tác dụng của Rau đắng biển. Tại Việt Nam, đây là nghiên cứu đầu tiên được tiến hành để tìm hiểu cơ chế hóa sinh của BME và sử dụng protein PTEN làm tiêu chí đánh giá. Theo hiểu biết của chúng tôi, còn có các đích phân tử khác như protein FOX hoặc SHANK. Tuy nhiên, do thời gian và điều kiện hạn chế của đề tài, chúng tôi hy vọng trong các nghiên cứu kế tiếp sẽ sử dụng các đích phân tử khác liên quan đến ASD để làm sáng tỏ hơn cơ chế cải thiện các khiếm khuyết hành vi thần kinh của Rau đắng biển.

5. Kết luận

Từ những kết quả thu được trong nghiên cứu này có thể kết luận rằng, BME liều 50 mg/kg có tác dụng cải thiện một số hành vi thần kinh cốt lõi của rối loạn phổ tự kỷ trên mô hình chuột tự kỷ thực nghiệm gây bởi VPA một phần thông qua cơ chế tăng cường mức độ biểu hiện protein PTEN trong vỏ não chuột tự kỷ.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.05-2018.319. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] World Health Organization (2021), "Autism", <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>, accessed 20 June 2021.

[2] V.M. Hoang, L.T. Vui, C.T.T. Quynh, et al. (2019), "Prevalence of autism spectrum disorders and their relation to selected socio-demographic factors among children aged 18-30 months in northern Vietnam, 2017", *International Journal of Mental Health Systems*, **13**, pp.29-29.

[3] C. Lord, S. Risi, P.S. DiLavore, et al. (2018), "Autism spectrum disorder", *Lancet*, **392**(10146), pp.508-520.

[4] X.T. Le, P.T.M. Nguyet, N.V. Tai, et al. (2015), "Protective effects of *Bacopa monnieri* on ischemia-induced cognitive deficits in mice: the possible contribution of bacopaside I and underlying mechanism", *Journal of Ethnopharmacology*, **164**, pp.37-45, DOI: 10.1016/j.jep.2015.01.041

[5] H.T.N. Pham, T.N. Hong, N.T. Phuong, et al. (2020), "*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. extract improves memory performance via promotion of neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus of adolescent mice", *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(9), DOI: 10.3390/ijms21093365.

[6] P.T.N. Hang, L.T. Xoan, N.M. Khoi (2015), "Effects of improving autism syndrome of bitter seaweed extract on experimental autism mice model induced by valproate salt", *Journal of Medicinal Materials*, **2015**(4), pp.241-246 (in Vietnamese).

[7] J.L. Silverman, D.G. Smith, S.J.S. Rizzo, et al. (2010), "Repetitive self-grooming behavior in the BTBR mouse model of autism is blocked by the mGluR5 antagonist MPEP", *Neuropsychopharmacology*, **35**(4), pp.976-989.

[8] J.J. Nadler, A. Perez, R.P. Barbaro, et al. (2004), "Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice", *Genes, Brain and Behavior*, **3**(5), pp.303-314, DOI: 10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x.

[9] V.B. Junior, L. Rodrigues, G.A. Behr, et al. (2011), "Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters", *Brain Research*, **1408**, pp.8-16.

[10] J.L. Ingram, S.M. Peckham, B. Tisdale, et al. (2000), "Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism", *Neurotoxicology and Teratology*, **22**(3), pp.319-324.

[11] K. Miyazaki, N. Narita, M. Narita (2005), "Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: Implication for pathogenesis of autism", *International Journal of Developmental Neuroscience*, **23**(2-3), pp.287-297.

[12] P.M. Rodier, Patricia (1997), "Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism", *Reproductive Toxicology*, **11**(2), pp.417-422.

[13] T. Sandhya, J. Sowjanya, B. Veeresh (2012), "*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. ameliorates behavioral alterations and oxidative markers in sodium valproate-induced autism in rats", *Neurochemical Research*, **37**(5), pp.1121-1131.

[14] G.C. Wagner, K.R. Reuhl, M. Cheh, et al. (2006), "A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate", *Journal of Autism and Developmental Disorders*, **36**(6), pp.779-793, DOI: 10.1007/s10803-006-0117-y.

[15] A.V. Kalueff, A.M. Stewart, J.H. Fentress (2016), "Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience", *Nature Reviews Neuroscience*, **17**(1), pp.45-59.

[16] H.G. McFarlane, G.K. Kusek, M. Yang, et al. (2008), "Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice", *Genes, Brain and Behavior*, **7**(2), pp.152-163, DOI: 10.1111/j.1601-183X.2007.00330.x.

[17] M. Yang, V. Zhodzishsky, J.N. Crawley (2007), "Social deficits in BTBR T+tf/J mice are unchanged by cross-fostering with C57BL/6J mothers", *International Journal of Developmental Neuroscience*, **25**(8), pp.515-521.

[18] C.H. Kwon, X. Zhu, L. Zhang, et al. (2006), "PTEN regulates neuronal arborization and social interaction in mice", *Neuron*, **50**(3), pp.377-388, DOI: 10.1016/j.neuron.2006.03.023.

[19] C.H. Kwon, X. Zhu, L. Zhang et al. (2003), "mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo", *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **100**(22), pp.12923-12928.

[20] U. Mahmood, S. Ahn, E.J. Yang, et al. (2018), "Dendritic spine anomalies and PTEN alterations in a mouse model of VPA-induced autism spectrum disorder", *Pharmacological Research*, **128**, pp.110-121.

[21] J. Sealy, I.P. Glovinsky (2016), "Strengthening the reflective functioning capacities of parents who have a child with a neurodevelopmental disability through a brief, relationship-focused intervention", *Infant Mental Health Journal*, **37**(2), pp.115-124.

[22] A.K. Tilot, T.W. Frazier, C. Eng (2015), "Balancing proliferation and connectivity in PTEN-associated autism spectrum disorder", *Neurotherapeutics*, **12**(3), pp.609-619.

[23] J. Zhou, K. Blundell, S. Ogawa, et al. (2009), "Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice", *The Journal of Neuroscience*, **29**(6), pp.1773-1783, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5685-08.2009.