

Đánh giá khả năng cảm ứng tăng sinh và bảo vệ da của astaxanthin trước những điều kiện bất lợi *in vitro* và *in vivo*

Tô Minh Quân*, Trần Quang Diệu, Tạ Nguyễn Ái Trinh, Trần Thị Kiều Duyên

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 4/5/2020; ngày chuyển phản biện 14/5/2020; ngày nhận phản biện 15/7/2020; ngày chấp nhận đăng 2/8/2020

Tóm tắt:

Astaxanthin (ASX) là một carotenoid có khả năng chống oxy hóa mạnh nhất hiện nay. Nguồn thu nhận ASX thường được sử dụng hiện nay là từ tảo *Haematococcus pluvialis*. Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành chiết xuất ASX từ tảo *Haematococcus pluvialis* trong dung môi dầu Sacha Inchi. Sau đó, đánh giá khả năng của ASX trong cảm ứng tăng sinh, bảo vệ nguyên bào sợi (NBS) da khỏi tác động H_2O_2 *in vitro* và bảo vệ da khỏi tác động của tia UV *in vivo*. Kết quả cho thấy, ASX được tách tốt trong dầu Sacha Inchi với nồng độ $225,54 \pm 21,56$ $\mu\text{g/ml}$. ASX nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$ không gây độc với NBS, kích thích NBS tăng sinh nhanh với mật độ $(6,05 \pm 0,24) \times 10^4$ tế bào/giếng ($n=3$) (cao gấp 1,44 lần so với đối chứng) và di cư nhanh vào vùng da tổn thương (sau 36 giờ) ($n=3$). ASX 1 $\mu\text{g/ml}$ bảo vệ NBS da khỏi tác động oxy hóa của H_2O_2 . So với nhóm đối chứng dương (NBS chỉ tiếp xúc với H_2O_2), các tế bào nhóm thí nghiệm (tiếp xúc ASX 1 $\mu\text{g/ml}$ trước, sau đó tiếp xúc H_2O_2) không biểu hiện dấu hiệu bị oxy hóa: diện tích nhân nhỏ ($259,6 \pm 29,1$ μm^2 so với $314,5 \pm 30,5$ μm^2 đối chứng dương), tỷ lệ tế bào pha G0/G1 thấp ($83,1 \pm 6,1\%$ so với $90,6 \pm 5,2\%$) và không biểu hiện β -galactosidase (đối chứng dương có biểu hiện). Đồng thời, ASX 200 $\mu\text{g/ml}$ bảo vệ da chuột khỏi tác nhân tia UV khi chiếu ở cường độ cao. Sau 4 tuần chiếu UV liên tục, chuột được thoa ASX mỗi ngày không biểu hiện các dấu hiệu lão hóa như: da nhăn, lớp biểu bì dày, xuất hiện các vùng elastosis. Qua nghiên cứu có thể kết luận: ASX thu nhận trong dầu Sacha Inchi kích thích tăng sinh NBS da tăng sinh và di chuyển; bảo vệ NBS da khỏi tác nhân gây oxy hóa H_2O_2 và bảo vệ da khỏi tác hại gây lão hóa của tia UV.

Từ khóa: astaxanthin, chống oxy hóa, *Haematococcus pluvialis*, lão hóa da, mô hình chuột lão hóa.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

ASX là chất thuộc nhóm xanthophyll, là một trong những chất chống oxy hóa hàng đầu hiện nay [1, 2]. ASX có cấu trúc phân tử là 3,3'-dihydroxy- β -carotene-4,4'-dione, bao gồm 2 vòng β -ionone ở 2 đầu và chuỗi polyene ở giữa [1, 2]. Cấu trúc đặc biệt này giúp ASX có khả năng chống oxy hóa mạnh và gắn kết vào màng sinh học để bảo vệ tế bào khỏi các gốc oxy hóa. Do đó, ASX được ứng dụng để chống oxy hóa, bệnh tim mạch, ung thư, tiểu đường... [3, 4].

Trong lĩnh vực mỹ phẩm, ASX được sử dụng theo đường uống để giúp trẻ hóa làn da, giúp da chống lại những tác nhân có hại từ môi trường. Da là cơ quan bao phủ bên ngoài cơ thể. Chức năng quan trọng nhất của da là bảo vệ cơ thể khỏi sự tiếp xúc trực tiếp với các tác nhân lý hóa sinh từ môi trường ngoài. Vì vậy, da thường xuyên tiếp xúc với các tác nhân bên ngoài như khói bụi, vi khuẩn... Một trong những tác nhân bên ngoài chính gây tổn hại và lão hóa da là tia UV tồn tại tự nhiên trong ánh sáng mặt trời. Dựa vào

độ dài bước sóng, tia UV được chia thành 3 loại: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), và UVC (200-280 nm) [5]. Các tia UV xâm nhập lớp biểu bì và trung bì của da, tạo ra các gốc tự do ROS. Các gốc tự do này phá hủy các phân tử protein chính của da như collagen, elastin và gây lão hóa hoặc chết thành phần tế bào chính của da như NBS, tế bào sừng [5-7]. Do đó, da tiếp xúc với tia UV nhiều sẽ trở nên khô, xuất hiện nhiều vết nứt, sạm màu... Để bảo vệ da khỏi tác hại của tia UV, người ta thường dùng các chất chống oxy hóa như ASX [8, 9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi hướng tới tạo ra sản phẩm ASX dạng thoa để tăng cường hiệu quả của ASX trong lĩnh vực mỹ phẩm.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Quy trình tách ASX

Tảo *Haematococcus pluvialis* chứa ASX được đông khô và bảo quản trong tủ -20°C cho tới khi sử dụng. Tảo đông khô được rã đông, nghiền bằng chày và tách chiết trong dung môi dầu Saccha Inchi theo quy trình sau: dầu được đông vào cốc và nung ở 80°C trong 5 phút trước khi bắt đầu.

*Tác giả liên hệ: Email: tomquan@hcmus.edu.vn

Determining the ability of astaxanthin to induce proliferation and skin protection from harmful environmental factors *in vitro* and *in vivo*

Minh Quan To*, Quang Dieu Tran, Nguyen Ai Trinh Ta, Thi Kieu Duyen Tran

University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city

Received 4 May 2020; accepted 2 August 2020

Abstract:

Astaxanthin (ASX) is a carotenoid having the strongest antioxidant capacity. *Haematococcus pluvialis* is the most commonly used source of ASX today. In this study, the authors obtained ASX from *H. pluvialis* by using Sacha Inchi oil. Then, the ability of ASX on stimulating proliferation of skin cells, protecting skin fibroblasts from H_2O_2 *in vitro*, and protecting mice skin from UV irradiation *in vivo* was tested. The results showed that ASX could be extracted in Sacha Inchi oil with a concentration of 225.54 ± 21.56 $\mu\text{g/ml}$. ASX with a concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$ was non-toxic to the fibroblasts, induced proliferation with a concentration of $(6.05 \pm 0.24) \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ ($n=3$) (1.44 times higher than that of the control), and quick migrated to the affected areas (after 36 hours). ASX 1 $\mu\text{g/ml}$ protected the fibroblasts from the oxidative stress of H_2O_2 . Comparing to the positive control (fibroblasts exposed to H_2O_2 only), the experimental group cells (induced by ASX 1 $\mu\text{g/ml}$ first, then exposed to H_2O_2) did not express signs of oxidative stress: small nuclear size (259.6 ± 29.1 μm^2 vs 314.5 ± 30.5 μm^2), low G0/G1 ratio ($83.1 \pm 6.1\%$ vs $90.6 \pm 5.2\%$) and didn't express β -galactosidase. Furthermore, ASX 200 $\mu\text{g/ml}$ protected mice skin from UV irradiation. After 4 weeks of continuous UV irradiation, mice skin applied with ASX every day did not express any aging signs such as wrinkles, thick epidermis, and solar elastosis. In conclusion, ASX extracted in Sacha Inchi oil stimulated proliferation and migration of fibroblast cells, and protected skin from oxidative radical H_2O_2 *in vitro* and UV irradiation *in vivo*.

Keywords: aging mouse model, antioxidants, astaxanthin, *H. pluvialis*, skin aging.

Classification number: 3.1

Sau 5 phút, tảo đã nghiền được cho vào cốc với nồng độ 10 mg sinh khối/ml, tiếp tục nung và khuấy dung dịch trong 60 phút. Dịch sau đó được ly tâm 3000 v/ph trong 10 phút để thu dịch nổi, lặp lại quy trình cho đến khi dịch không có màu đỏ. Nồng độ ASX được đánh giá bằng phương pháp HPLC (thí nghiệm được lặp lại 5 lần).

Thí nghiệm đánh giá tăng sinh tế bào *in vitro*

Tế bào 3T3 được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ 5×10^3 tế bào/giếng. Sau 24 giờ, hút bỏ môi trường cũ, thêm môi trường mới chứa ASX với các nồng độ lần lượt là 0 (nhóm đối chứng), 0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g/ml}$ (mỗi thí nghiệm tiến hành với 5 giếng). Thời gian thí nghiệm là 6 ngày. Tại mỗi mốc thời gian 2, 4, 6 ngày sau nuôi cấy, tiến hành thu nhận tế bào mỗi thí nghiệm (5 giếng/thí nghiệm) bằng Trypsin/EDTA và định lượng số lượng tế bào sống.

Thí nghiệm khảo sát sự kích thích lành vết thương *in vitro*

Tế bào 3T3 được cấy lên đĩa 24 giếng với mật độ 5×10^4 tế bào/giếng và ủ trong 24 giờ với môi trường. Sau 24 giờ, sử dụng dụng cụ để tạo vết rạch độ rộng 1 mm giữa đĩa tế bào. Sau đó, bổ sung môi trường nuôi có chứa ASX ở các nồng độ lần lượt là 0 (đối chứng); 0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g/ml}$ (mỗi nhóm được tiến hành với 6 giếng). Quan sát sự di cư tế bào vào vết rạch trong 18 giờ. Đĩa tế bào được mang đi ủ, kiểm tra và chụp hình mỗi 6 giờ dưới kính hiển vi.

Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của ASX khỏi tác nhân gây oxy hóa *in vitro*

Tế bào 3T3 được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ 5×10^3 /giếng. Sau 1 ngày, thay môi trường cũ bằng môi trường mới bổ sung ASX các nồng độ lần lượt là 0 (nhóm đối chứng), 1 $\mu\text{g/ml}$ (nhóm thí nghiệm) (mỗi nhóm tiến hành với 3 giếng). Sau 24 giờ, các giếng tế bào được xử lý với môi trường DMEM F12 5% FBS chứa H_2O_2 ở nồng độ 200 μM trong 2 giờ. Sau 1 ngày, tế bào được đánh giá bằng phương pháp nhuộm β -galactosidase và đánh giá diện tích tế bào bằng phương pháp nhuộm Hoechst, đánh giá bằng máy Cytell Cell.

Đánh giá khả năng ngăn ngừa lão hóa da của ASX trên mô hình chuột lão hóa

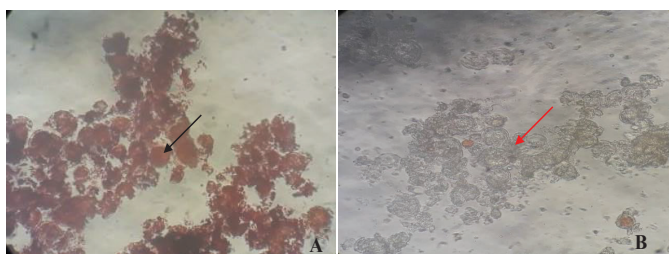
Chuột thí nghiệm *Mus musculus* var *Albino* gây lão hóa da bằng cách chiếu tia $\text{UVA}=360$ mJ/cm^2 , $\text{UVB}=60$ mJ/cm^2 mỗi ngày 60 phút và tiến hành liên tục trong 28 ngày (nhóm đối chứng dương, tiến hành với 3 con chuột). Đối với nhóm thí nghiệm (nhóm chuột vừa sử dụng ASX vừa chiếu UV để gây lão hóa), chuột vẫn được chiếu như trên nhưng được thoa ASX nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ mỗi ngày trước khi chiếu 15 giờ (3 con). Chuột bình thường được sử dụng làm đối chứng

âm. Lão hóa da được đánh giá dựa trên hình thái bên ngoài (đánh giá theo tiêu chuẩn 6 điểm của Rumjhum Agrawal năm 2010 [10]) và cấu trúc bên trong da thông qua phương pháp nhuộm HE sau 4 tuần.

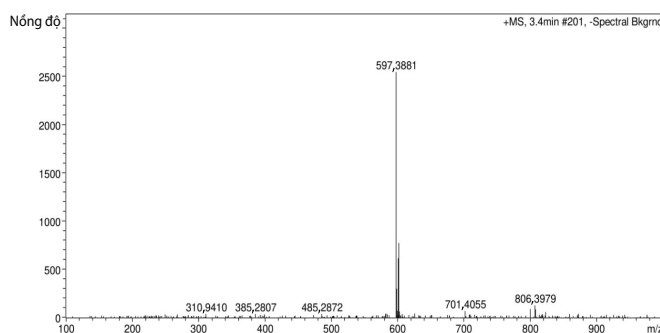
Kết quả nghiên cứu

Kết quả tách chiết ASX trong dung môi dầu thực vật

Kết quả tách chiết ASX được thể hiện trong hình 1 và 2. Sau khi cho tảo *H. pluvialis* vào dầu Saccha Inchi, dung dịch trở nên đỏ thẫm, xác tảo mất dần màu đỏ và trở thành không màu (hình 1). Kết quả phân tích HPLC cho thấy, nồng độ ASX trong dầu Saccha Inchi là $225,54 \pm 21,56$ $\mu\text{g/ml}$ ($n=5$). Như vậy, ASX được tách chiết tốt trong dầu Saccha Inchi (nồng độ gần tương đương với tách chiết ASX trong acetone là $237,25 \pm 16,46$ $\mu\text{g/ml}$).



Hình 1. Tảo *Haematococcus pluvialis* trước (A) và sau khi tách bằng dầu Saccha Inchi (B) (x200).



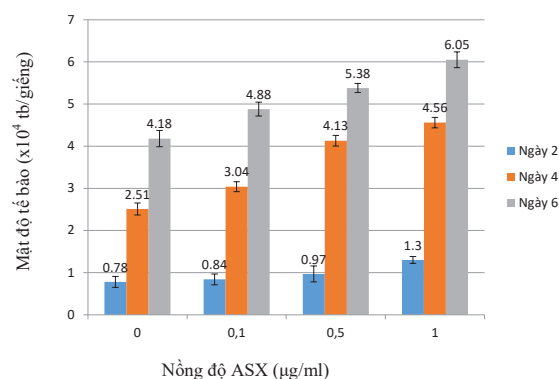
Hình 2. Kết quả đánh giá nồng độ ASX bằng HPLC.

Thí nghiệm đánh giá sự kích thích tăng sinh in vitro

Tế bào 3T3 được cấy lên các giếng với mật độ $0,5 \times 10^4$ tế bào/giếng, nuôi trong môi trường bổ sung ASX ở các nồng độ 0 (nhóm đối chứng); 0,1; 0,5 và 1 $\mu\text{g/ml}$ (mỗi nhóm 9 giếng). Kết quả cho thấy, ở tất cả các thí nghiệm, tế bào 3T3 đều tăng sinh trong 6 ngày (bảng 1, hình 3). Trong môi trường có chứa ASX, tế bào tăng trưởng nhanh hơn so với môi trường không có ASX; ở nồng độ ASX 1 $\mu\text{g/ml}$, tế bào tăng trưởng tốt nhất: tại ngày 6, mật độ tế bào (MĐTB) cao gấp 1,44 lần nhóm đối chứng và thời gian nhân đôi thấp hơn. Điều này chứng tỏ ASX nồng độ 0,1-1 $\mu\text{g/ml}$ không những không gây độc mà còn kích thích sự tăng sinh tế bào.

Bảng 1. Kết quả đánh giá sự tăng sinh tế bào trong môi trường chứa ASX.

Nồng độ ASX	0 $\mu\text{g/ml}$ (ĐC)	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
MĐTB ban đầu ($\times 10^4$ tb/giếng)	5000	5000	5000	5000
MĐTB ngày 6 ($\times 10^4$ tb/giếng)	$4,18 \pm 0,13$	$4,88 \pm 0,18$	$5,38 \pm 0,21$	$6,05 \pm 0,24$
Thời gian nhân đôi (giờ)	$47 \pm 1,46$	$43,8 \pm 1,61$	$42 \pm 1,63$	$40,2 \pm 1,59$
Số lần lặp lại (n)	5	5	5	5



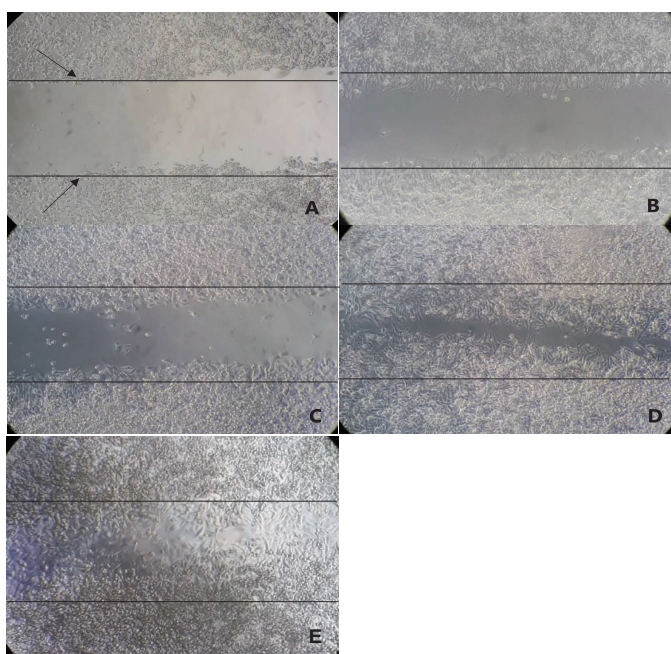
Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự tăng sinh tế bào sau 6 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm khảo sát sự kích thích lành vết thương in vitro

Thí nghiệm này quan sát sự di cư của tế bào trong môi trường chứa ASX nồng độ 0,1; 0,5; 1 và 0 $\mu\text{g/ml}$ (nhóm đối chứng) ($n=6$) vào vùng không có tế bào trong 36 giờ (bảng 2). Sau 36 giờ, hiện tượng tế bào di cư vào vết rách xuất hiện rõ ràng trong nhóm thí nghiệm bổ sung ASX 0,5 và 1 $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên, tế bào của nhóm ASX 1 $\mu\text{g/ml}$ cho kết quả di cư tốt nhất: tế bào bắt đầu di cư vào vết rách sau 6 giờ và lấp đầy hoàn toàn sau 36 giờ (hình 4).

Bảng 2. Kết quả đánh giá sự di cư tế bào trong môi trường chứa ASX.

Nồng độ ASX	0 $\mu\text{g/ml}$ (ĐC)	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Khoảng cách 2 mép tế bào (mm)	1	1	1	1
Di cư trung bình sau 36 giờ (mm) (tính từ mép tế bào ban đầu)	$0,13 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,04$	$0,77 \pm 0,12$	Lấp kín hoàn toàn
Số lần lặp lại (n)	6	6	6	6



Hình 4. Sự di cư tế bào giữa hai mép của vết rạch. (A) Trước khi bổ sung ASX, **(B)** Mẫu đối chứng (ASX 0), **(C)** Bổ sung ASX 0,1 µg/ml, **(D)** Bổ sung ASX 0,5 µg/ml, **(E)** Bổ sung ASX 1 µg/ml. Lằn tế bào ban đầu (mũi tên đen) (x200).

Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ tế bào của ASX khỏi tác nhân gây oxy hóa in vitro

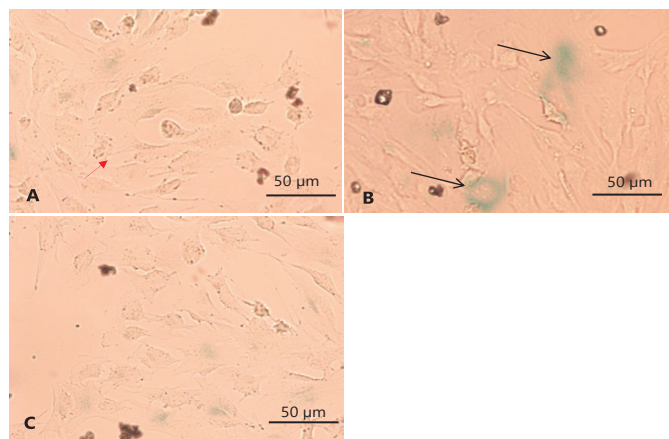
Thí nghiệm được chia làm 3 nhóm: nhóm đối chứng âm (ĐC âm - tế bào nuôi trong môi trường bình thường), nhóm đối chứng dương (ĐC dương - tế bào nuôi trong môi trường chứa 200 µM H₂O₂), nhóm thí nghiệm (nhóm đã ủ trước với ASX 1 µg/ml và sau đó nuôi trong môi trường 200 µM H₂O₂) (mỗi nhóm 6 giếng). Các chỉ tiêu đánh giá tỷ lệ G0/G1, diện tích nhân và sự biểu hiện β-galactosidase. Kết quả thí nghiệm được thể hiện tóm tắt trong bảng 3 và hình 5.

So với nhóm đối chứng âm, nhóm đối chứng dương có sự gia tăng tỷ lệ tế bào pha G0/G1 (độ tin cậy 95%), gia tăng diện tích nhân trung bình (độ tin cậy 95%) và biểu hiện β-galactosidase. Điều này chứng tỏ, xử lý với H₂O₂ (200 µM trong 2 giờ) đã tác động lên tế bào 3T3, làm tế bào xuất hiện những dấu hiệu lão hóa tế bào. Do đó, trong những nghiên cứu sau, quy trình xử lý H₂O₂ nồng độ 200 µM trong 2 giờ được sử dụng để tạo mô hình gây stress tế bào.

Bảng 3. Kết quả đánh giá khả năng bảo vệ tế bào khỏi gốc oxy hóa của ASX.

Mẫu tế bào	Tỷ lệ pha G0/G1 (%)	Diện tích nhân trung bình (µm ²)	Biểu hiện β-galactosidase
ĐC âm (n=6)	79,5±3,5	223,0±31,5	Không
ĐC dương (n=6)	90,6±5,2	314,5±30,5	Có
Thí nghiệm (n=6)	83,1±6,1	259,6±29,1	Không

Để chứng minh hiệu quả bảo vệ tế bào của ASX, tế bào được nuôi trong môi trường có ASX 1 µg/ml trước trong 24 giờ, sau đó loại bỏ môi trường và bổ sung môi trường có chứa H₂O₂ nồng độ 200 µM trong 2 giờ. Kết quả cho thấy, tế bào trong nhóm thí nghiệm có tỷ lệ G0/G1 và diện tích nhân nhỏ hơn đối chứng dương và không biểu hiện β-galactosidase. Điều đó chứng tỏ tác động của H₂O₂ lên tế bào đã bị hạn chế bởi ASX được hấp thụ từ môi trường nuôi cấy trước đó.



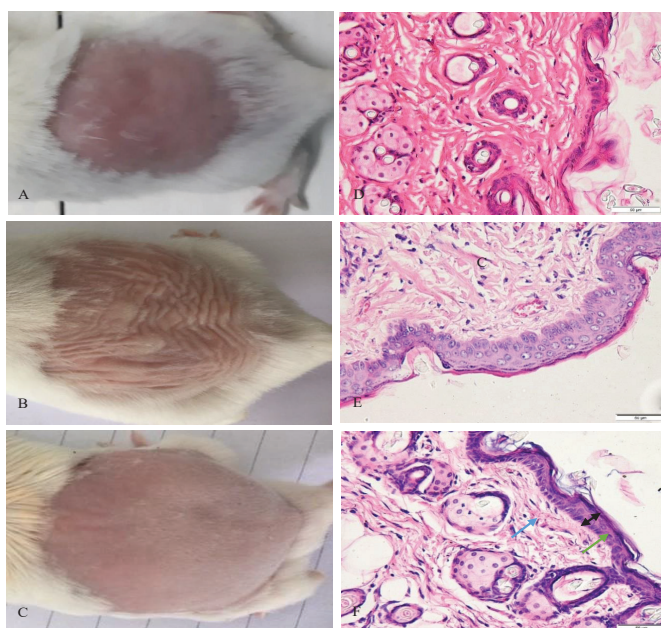
Hình 5. Tế bào nhuộm với thuốc nhuộm X-gal. (A) Đối chứng âm, **(B)** Đối chứng dương, **(C)** Nhóm thí nghiệm. Mũi tên đỏ: tế bào, mũi tên đen: vùng dương tính với β-galactosidase.

Kết quả đánh giá khả năng chống lão hóa da chuột

Thí nghiệm được chia thành 3 nhóm: đối chứng âm (chuột bình thường), đối chứng dương (chuột chiếu UV gây lão hóa da), chuột thí nghiệm (chuột thoa ASX trước 15 giờ, sau đó chiếu UV gây lão hóa da). Sau 4 tuần, tiến hành đánh giá hình dạng bên ngoài (đánh giá theo tiêu chuẩn 6 điểm của Rumjhum Agrawal năm 2010) và cấu trúc mô bên trong của da bằng phương pháp nhuộm mô học HE (hình 6 và bảng 4).

Đối với nhóm đối chứng âm, da chuột tương đối đồng nhất. Quan sát bên ngoài cho thấy da mịn, không có nốt sần, nốt sạm (hình 6A). Kết quả mô học (hình 6D) cho thấy lớp biểu bì mỏng, chứa 1-3 lớp tế bào, dày 14,22±2,28 µm, các tế bào xếp khít với nhau, nhân nhỏ. Lớp trung bì dày, sợi protein bắt màu tốt với thuốc nhuộm, không có hiện tượng sợi protein kết tụ.

Đối với nhóm đối chứng dương, sau 4 tuần chiếu UV liên tục, quan sát bên ngoài cho thấy tất cả chuột đều có hiện tượng da trở nên nhăn nheo, xuất hiện nhiều vết sần và nhiều đốm đậm màu (hình 6B). Kết quả nhuộm mô học (hình 6D) cho thấy lớp biểu bì trở nên dày hơn, chứa 5-7 lớp tế bào, dày 45,89±6,43 µm, các tế bào phân bố không theo quy tắc, nhân tế bào phình to, xuất hiện những tế bào nhân phân mảnh. Vùng trung bì, các sợi protein liên kết trở nên thưa hơn, ít bắt màu với thuốc nhuộm và xuất hiện sợi protein kết tụ thành sợi lớn.



Hình 6. Kết quả đánh giá hiệu quả chống tia UV của ASX. (A, B, C) Quan sát bằng mắt thường, (D, E, F) Nhuộm HE (x400), (A, D) Chuột đối chứng, (B, E) Chuột lão hóa do chiếu UV 28 ngày, (C, F) Chuột thoa ASX và chiếu UV 28 ngày.

Đối với nhóm thí nghiệm, quan sát bên ngoài cho thấy da chuột vẫn mịn, không có dấu hiệu trở nên nhăn nheo, không có nốt sần và nốt sạm màu (hình 6C). Cấu trúc mô học (hình 6F) cho thấy lớp biểu bì mỏng (1-4 lớp tế bào), dày $23,36 \pm 4,03 \mu\text{m}$, các tế bào xếp khít với nhau, nhân nhỏ tương tự như nhóm đối chứng âm. Vùng trung bì dày, các sợi protein đặc tương tự như đối chứng âm.

Từ những kết quả trên cho thấy, ASX đã bảo vệ da khỏi các tác động gây lão hóa của UV trong thời gian 4 tuần.

Bảng 4. Kết quả đánh giá hiệu quả ASX đối với chuột lão hóa do tia UV theo tiêu chuẩn Rumjhum Agrawal năm 2010.

	Nhóm ĐC âm	Nhóm ĐC dương	Nhóm thí nghiệm
Kết quả	Mức 0: 4 con	Mức 4: 2 con Mức 5: 2 con	Mức 1: 3 con Mức 2: 1 con

ĐC: đối chứng.

Bàn luận

ASX là một trong các chất chống oxy hóa hiệu quả nhất hiện nay. Với cấu trúc 2 đầu phân cực và vùng lõi không phân cực, ASX dễ dàng cố định vào màng của tế bào hoặc các bào quan trong tế bào, do đó ASX bảo vệ tế bào khỏi tác dụng của các gốc oxy hóa tạo ra từ bên trong và do môi trường bên ngoài. Hiện nay, ASX được sử dụng nhiều ở dạng thực phẩm, những nghiên cứu sử dụng ASX trong lĩnh vực mỹ phẩm dạng thoa vẫn chưa được chú trọng [11, 12].

Trong nghiên cứu này, ASX được tách chiết trong dung môi dầu thực vật để hướng tới ứng dụng làm mỹ phẩm dạng thoa. Dầu cây Sacha Inchi chứa nhiều vitamin E ($8,99 \pm 0,16 \text{ mg}/100 \text{ g}$) và tỷ lệ cân bằng giữa α -linolenic (50,8%) và linoleic (33,4%)

acids nên thích hợp làm nền dưỡng ẩm [13, 14]. Với mục đích hướng tới dạng thoa nên các chỉ tiêu sinh học quan trọng cần xác định là tác động của ASX lên tế bào da (đặc biệt là NBS), khả năng bảo vệ tế bào khỏi các tác nhân gây tổn thương như gốc oxy hóa (*in vitro*) và tia UV (*in vivo*). NBS là thành phần tế bào chính của lớp trung bì da. Trong lớp trung bì da, NBS tăng sinh và tổng hợp protein như collagen, elastin... để duy trì chức năng và tính chất cơ học của da. Khi có sự tổn thương trên da, NBS từ khu vực xung quanh di chuyển vào bên trong, tăng sinh và tổng hợp da mới [15]. Do đó, NBS luôn là đối tượng được sử dụng để khảo sát hoạt tính của hoạt chất. Phương pháp đánh giá tác động của ASX dựa theo tiêu chuẩn ISO 10993. NBS được cấy lên các giếng ban đầu với mật độ tương đương nhau và nuôi trong môi trường chứa ASX với nồng độ khác nhau, đối chứng là tế bào trong môi trường nuôi ban đầu. Nếu ASX gây độc cho da thì sẽ làm lượng tế bào giảm dần theo thời gian. Kết quả cho thấy, sự gia tăng nồng độ ASX đã làm rút ngắn thời gian nhân đôi tế bào và gia tăng mật độ tế bào tối đa. Điều này chứng tỏ ASX không gây độc mà còn kích thích tế bào tăng sinh. Ngoài ra, khả năng kích thích di cư tế bào của ASX cũng được khảo sát theo phương pháp wound closure assay [16]. Khi tạo vết rách trên vùng tế bào mật độ dày, tế bào có xu hướng di chuyển vào vết rách. Khi áp dụng trên đĩa nuôi NBS với các nồng độ ASX khác nhau, kết quả cho thấy sau 36 giờ, tế bào nuôi trong môi trường ASX 0,5 và 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ có sự di cư rõ rệt vào vùng tổn thương, trong khi tế bào trong đĩa đối chứng và đĩa nồng độ 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ không thấy rõ ràng sự di cư tế bào. Điều này chứng tỏ ASX hỗ trợ tốt cho sự di cư tế bào với nồng độ cao hơn 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tổng hợp kết quả 2 thí nghiệm trên cho thấy, ASX không gây độc với NBS, đồng thời kích thích tế bào tăng sinh và di cư.

Đối với các tác nhân bên ngoài tác động lên da thì tia UV trong ánh sáng mặt trời đóng vai trò quan trọng. Khi tiếp xúc với da, tia UV tạo ra các gốc tự do ROS, phá hủy protein trong da như collagen, elastin... và phá hủy tế bào tổng hợp protein như NBS [17]. Do đó, tế bào NBS trở nên kém tăng sinh, giảm chức năng, lượng protein trong da giảm dần về số lượng và chất lượng, dẫn tới da xuất hiện nhiều dấu hiệu lão hóa như: trở nên mỏng hơn, ít đàn hồi, nhiều vết nhăn... Hoạt chất chống oxy hóa đóng vai trò quan trọng ngăn cản sự lão hóa da do tác nhân bên ngoài. Ngoài khả năng chống oxy hóa tốt, ASX còn có khả năng bám dính vào màng tế bào, nhân, ty thể... [18]. Trong nghiên cứu này, tác nhân gây stress tế bào được sử dụng *in vitro* là H_2O_2 , *in vivo* là tia UV. H_2O_2 là một trong những gốc oxy hóa do tia UV tạo ra trong da. Ngoài ra, H_2O_2 là tác nhân gây oxy hóa mạnh thường được sử dụng trong các nghiên cứu chống lão hóa trên da. H_2O_2 tác động lên tế bào làm cho tế bào xuất hiện dấu hiệu lão hóa, như diện tích nhân to hơn, tỷ lệ quần thể tế bào pha G0/G1 tăng lên và đặc biệt là tế bào biểu hiện β -galactosidase (một marker phổ biến được sử dụng để đánh giá sự lão hóa tế bào) [19, 20]. Do đó, ASX được thử nghiệm bảo vệ tế bào trước tác dụng của H_2O_2 . Đầu tiên, ASX được bổ sung vào môi trường nuôi tế bào, sau 24 giờ, loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi, rửa lại bằng dung dịch đệm PBS nhiều lần, sau đó bổ sung môi trường nuôi mới có chứa H_2O_2 . Việc rửa tế bào nhiều lần (trước

khi bổ sung môi trường chứa H_2O_2) để loại bỏ hoàn toàn ASX còn tồn đọng trong môi trường nuôi trước đó. Điều này chứng tỏ, kết quả chống oxy hóa là do ASX đã hấp thu vào tế bào. Nếu không tiếp xúc trước với ASX thì khi tiếp xúc với H_2O_2 , diện tích nhân tế bào tăng lên, tỷ lệ tế bào nằm ở pha G0/G1 tăng lên và tế bào biểu hiện marker lão hóa β -galactosidase. Khi đã tiếp xúc với ASX, tác động của H_2O_2 lên tế bào giảm đi so với nhóm đối chứng dương, diện tích nhân giảm xuống, tỷ lệ tế bào pha G0/G1 tăng lên và tế bào không biểu hiện β -galactosidase. Kết quả thí nghiệm này cho thấy, ASX hấp thu vào tế bào đã hạn chế được tác động bất lợi của H_2O_2 lên NBS *in vitro*.

Thử nghiệm khả năng của ASX trong việc bảo vệ da khỏi tác động của tia UV được tiến hành trên mô hình chuột. Chuột Mus musculus được cạo lông và chiếu UV để gây lão hóa da. Khi bị chiếu tia UV, da chuột xuất hiện những dấu hiệu lão hóa: lớp trung bì da trở nên mỏng đi, da trở nên mất sự đàn hồi, xuất hiện hiện tượng elastosis; lớp biểu bì da dày hơn, xuất hiện nhiều nốt sạm da, vết sần trên bề mặt. Ngoài ra, xuất hiện vết nhăn trên bề mặt chính là dấu hiệu rõ ràng của sự lão hóa, quá trình lão hóa càng lâu thì vết nhăn càng lớn. Do đó, trong nghiên cứu, sự lão hóa da được quan sát theo 2 chỉ tiêu: hình dạng ngoài và cấu trúc mô học [21, 22]. Với hình dạng ngoài, da được đánh giá theo thang điểm 6 dựa theo sự xuất hiện nếp nhăn, số 0 tương ứng với da bình thường, số 6 tương ứng với ung thư da [10]. Với cấu trúc mô học, da được nhuộm bằng phương pháp nhuộm HE. Thí nghiệm được thiết kế nhằm đánh giá khả năng bảo vệ da khỏi tia UV theo mô hình dưỡng da ban đêm, do đó da chuột được thoa ASX trước khi chiếu UV 8 giờ, tiến hành liên tục trong 4 tuần. Kết quả thí nghiệm cho thấy, da chuột ban đầu mềm, mịn, không có lớp sần, vết sạm và vết nhăn da, về cấu trúc mô học thì có lớp biểu bì mỏng với 1-3 lớp tế bào, các tế bào xếp khít nhau, lớp trung bì liên kết chặt chẽ, không có hiện tượng elastosis, đánh giá mức độ 0. Sau khi chiếu UV trong 4 tuần, chuột xuất hiện nếp nhăn da ở mức độ 3-4 theo thang (xuất hiện vết nhăn da trung bình và nặng), xuất hiện lớp sần ở một vài vị trí da và xuất hiện vết sạm da nhỏ. Về cấu trúc mô học, lớp biểu bì trở nên dày hơn, tăng số lớp biểu bì, tế bào có biểu hiện phình to nhân như trong thử nghiệm *in vitro*, xuất hiện hiện tượng elastosis ở tất cả mẫu thí nghiệm. Điều này chứng tỏ, da chuột bị ảnh hưởng gây lão hóa do tia UV. Đối với nhóm bôi ASX, kết quả quan sát bên ngoài cho thấy da vẫn mềm, mịn, đàn hồi, xuất hiện một ít vết nhăn nông, khó thấy khi quan sát, đánh giá mức điểm 1-2, cấu trúc mô học gần như tương đương với mẫu da bình thường của chuột: biểu bì mỏng, ít lớp tế bào, lớp trung bì không có hiện tượng elastosis trong tất cả các mẫu thí nghiệm. Kết quả này cho thấy, ASX hạn chế tác động có hại da của tia UV đối với da chuột khi tiến hành thoa ASX trước 8 giờ. Như vậy, hướng sử dụng ASX làm sản phẩm dưỡng da ban đêm hoàn toàn có tính khả thi.

Kết luận

Thí nghiệm được tiến hành với mục đích đánh giá hiệu quả của ASX trong mỹ phẩm dưỡng da. Kết quả cho thấy, ASX không gây độc cho tế bào, kích thích NBS tăng sinh, bảo vệ tế bào khỏi gốc oxy hóa H_2O_2 *in vitro* và bảo vệ da khỏi tia UV *in vivo*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số C2018-18-20. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.R. Ambati, et al. (2014), "ASX: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review", *Mar. Drugs*, **12**(1), pp.128-152.
- [2] M.M. Shah, et al. (2016), "ASX-producing green microalga haematococcus pluvialis: from single cell to high value commercial products", *Front. Plant. Sci.*, **7**, DOI: 10.3389/fpls.2016.00531.
- [3] J. Li, et al. (2015), "ASX inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Inhibition of Nf-Kappab P65 and Wnt/beta-catenin in vitro", *Mar. Drugs*, **13**(10), pp.6064-6081.
- [4] J.Y. Wang, et al. (2015), "ASX protects steroidogenesis from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mouse Leydig cells", *Mar. Drugs*, **13**(3), pp.1375-1388.
- [5] M. Kim and H.J. Park (2016), "Molecular mechanisms of skin aging and rejuvenation", *Molecular Mechanisms of the Aging Process and Rejuvenation*, DOI: 10.5772/62983.
- [6] S. Bosset, et al. (2003), "Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities", *Br. J. Dermatol.*, **149**(4), pp.826-835.
- [7] J.H. Rabe, et al. (2006), "Photoaging: mechanisms and repair", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **55**(1), pp.1-19.
- [8] T. Komatsu, et al. (2017), "Preventive effect of dietary ASX on UVA-induced skin photoaging in hairless mice", *PLOS ONE*, **12**(2), DOI: 10.1371/journal.pone.0171178.
- [9] J. Meephansan, et al. (2017), "Effect of ASX on cutaneous wound healing", *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, **10**, pp.259-265.
- [10] R. Agrawal, I.P. Kaur (2010), "Inhibitory effect of encapsulated curcumin on ultraviolet-induced photoaging in mice", *Rejuvenation Research*, **13**, pp.397-410.
- [11] S. Davinelli, M. Nielsen, G. Scapagnini (2018), "ASX in skin health, repair, and disease: a comprehensive review", *Nutrients*, **10**(4), DOI: 10.3390/nu10040522.
- [12] I. Higuera-Ciupara, L. Félix-Valenzuela, F.M. Goycoolea (2006), "ASX: a review of its chemistry and applications", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**(2), pp.185-196.
- [13] L.F. Gutiérrez, L.M. Rosada, Á. Jiménez (2011), "Chemical composition of Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.) seeds and characteristics of their lipid fraction", *Grasas y Aceites*, **62**(1), DOI: 10.3989/gya044510.
- [14] A. Souza, et al. (2013), "Sacha inchi as potential source of essential fatty acids and tocopherols: multivariate study of nut and shell", *Acta Scientiarum - Technology*, **35**, pp.757-763.
- [15] H.E. desJardins-Park, D.S. Foster, M.T. Longaker (2018), "Fibroblasts and wound healing: an update", *Regenerative Medicine*, **13**(5), pp.491-495.
- [16] J.E.N. Jonkman, et al. (2014), "An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy", *Cell Adhesion & Migration*, **8**(5), pp.440-451.
- [17] M. Kulka (2013), *Mechanisms and Treatment of Photoaging and Photodamage*, DOI: 10.5772/56425.
- [18] R. Bosch, et al. (2015), "Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals", *Antioxidants (Basel)*, **4**(2), pp.248-268.
- [19] T. Kiyoshima, et al. (2012), "Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts", *Int. J. Mol. Med.*, **30**(5), pp.1007-1012.
- [20] J.J.P. Gille, H. Joenje (1992), "Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia", *Mutation Research/ DNAging*, **275**(3), pp.405-414.
- [21] L.H. Kligman (1996), "The hairless mouse model for photoaging", *Clinics in Dermatology*, **14**(2), pp.183-195.
- [22] Y. Fan, et al. (2015), "An experimental model design for photoaging", *Journal of Craniofacial Surgery*, **26**(6), pp.e467-e471.