

ẢNH HƯỞNG CỦA METHYLPARABEN ĐẾN KHẢ NĂNG SINH SẢN VÀ TUỔI THỌ TRÊN MÔ HÌNH RUỒI GIẤM THỰC NGHIỆM

Nguyễn Trọng Tuệ^{1,✉}, Dương Thị Thu Thuý², Trần Quốc Đạt¹

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Nhi Trung ương

Methylparaben là chất phụ gia với mục đích như bảo quản, tạo màu, nhuộm, giữ ẩm, làm đặc. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh được các paraben liên kết yếu với các thụ thể estrogen, có thể là một trong các nguyên nhân gây rối loạn nội tiết. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng mô hình ruồi giấm để đánh giá mức độ ảnh hưởng của methylparaben đến sức khỏe và khả năng sinh sản. Kết quả nghiên cứu cho thấy ruồi phơi nhiễm với methylparaben ở nồng độ 1% tuổi thọ giảm 13,8% ở con cái và 19,2% ở ruồi đực khi so với nhóm chứng không phơi nhiễm. Cũng với nồng độ methylparaben 0,1% làm giảm mạnh khả năng sinh sản đến 40,74% so với nhóm chứng. Thêm vào đó, xem xét mức độ biểu hiện gen của thụ thể EcR và ERR tại ba nồng độ methylparaben là 0,02%, 0,1% và 0,2% cho thấy EcR tăng từ ngày tuổi 10 đến ngày 30 trong khi ERR tăng ở ngày 10 và sau đó giảm mạnh tại 20 và 30 ngày tuổi so với nhóm chứng. Từ các kết quả cho thấy, methylparaben gây độc cho sức khỏe làm giảm tuổi thọ và tác động đến thụ thể hormon sinh sản trên mô hình ruồi giấm, và đây cũng là gợi ý cho việc mở rộng nghiên cứu cho đánh giá các chất phụ gia khác đối với sức khỏe con người.

Từ khóa: Methylparaben, ruồi giấm, gen EcR, ERR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một số hóa chất được sử dụng làm chất phụ gia được thêm vào trong quá trình chế biến trực tiếp hoặc quá trình đóng gói gián tiếp vào sản phẩm, một số trong chúng là những chất có hại cho sức khỏe.¹ Một trong những tác động tiêu cực đến sức khỏe của người tiêu dùng là khả năng gây rối loạn nội tiết, dị ứng, suy giảm hệ miễn dịch và khả năng gây ung thư.² Vào năm 2008, Darbre và cộng sự đã chứng minh được rằng paraben, một chất phụ gia được sử dụng từ hơn một thế kỷ trước là chất gây rối loạn nội tiết tiềm ẩn.³ Trong các nghiên cứu tế bào, người ta thấy các paraben liên kết yếu với các thụ thể estrogen.^{4,5} Đây có thể là một trong những lý do, các paraben có thể gây rối loạn

nội tiết. Mặc dù đã có nhiều dẫn xuất của paraben như isopropylparaben, isobutylparaben, phenylparaben, benzylparaben và pentylparaben hiện đã bị cấm sử dụng tại Việt Nam nhưng có một số dẫn xuất khác như methylparaben vẫn đang được sử dụng rộng rãi.

Mô hình ruồi giấm mang lại những giá trị to lớn trong nghiên cứu với rất nhiều ưu điểm như: vòng đời ngắn, sinh trưởng nhanh, bản đồ hệ gen đã được giải mã chi tiết. Cấu trúc và chức năng của hệ cơ, hệ thần kinh, hệ tiêu hoá... được bảo tồn giữa ruồi giấm và người. Do đó, độc tính tiềm tàng của các hóa chất khác nhau có thể được đánh giá ở từng giai đoạn phát triển. Ngoài ra, có thể ứng dụng mô hình này để nghiên cứu tác dụng của độc chất lên hành vi của ruồi giấm như nhịp sinh học, khả năng học hỏi và trí nhớ và đặc biệt là sinh sản. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của methylparaben đến khả năng sinh sản và sức khỏe trên mô hình ruồi giấm thực nghiệm.

Tác giả liên hệ: Nguyễn Trọng Tuệ

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: trongtue@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 19/10/2023

Ngày được chấp nhận: 09/11/2023

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Nghiên cứu sử dụng dòng ruồi giấm kiểu hoang dại Canton S thu thập từ trung tâm lưu trữ Kyoto (Kyoto Stock Center), Nhật Bản. Tất cả các thí nghiệm sử dụng ruồi đực và ruồi cái trưởng thành.

Ruồi giấm được nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản bao gồm 0,65% agarose, 10% glucose, 4% nấm men, 5% bột ngô và 3% bột cám gạo và trong điều kiện nhiệt độ 25°C, thời gian chiếu sáng chu kỳ 12 giờ sáng/ 12 giờ tối.

2. Phương pháp

Phương pháp đánh giá tuổi thọ ruồi giấm

Chọn ruồi đực và ruồi cái chưa giao phối, chia ruồi vào các nhóm thức ăn có nồng độ hóa chất thích hợp. Nhóm chứng và nhóm nghiên cứu (methylparaben lần lượt là 0,02%; 0,1%, 0,2%; 0,5%, 1%). Sử dụng 40 con/ 1 nồng độ với mật độ 20 con/1 ống. Phương pháp đánh giá tuổi thọ của ruồi giấm thông qua chỉ số thời gian chết 50% là thời gian một nửa số con trong quần thể chết đi.

Phương pháp đánh giá khả năng sinh sản

Khả năng sinh sản của ruồi giấm được đánh

giá bằng tổng số phôi ruồi có thể phát triển đến giai đoạn ruồi trưởng thành khi so sánh giữa những cặp ruồi bố mẹ ở nhóm chứng và nhóm nghiên cứu.

Phương pháp đánh giá biểu hiện gen thụ thể estrogen ERR và EcR

Gen *ERR* (*Estrogen-Related Receptor gene*) là gen thụ thể liên quan đến estrogen (ERR) có ở các động vật không xương sống như ruồi giấm, lưỡng cư, tương đồng với ER - thụ thể estrogen ở người. Gen *EcR* (*Ecdysone Receptor gene*) là gen thụ thể ecdysone (*EcR*) - thuộc nhóm siêu họ thụ thể hormon steroid được gọi là ecdysteroid. Chúng là các hormon đảm nhiệm chính cho quá trình biến đổi, phát triển và sinh sản.

Biểu hiện gen *ERR* và *EcR* tại từng thời điểm trong vòng đời của ruồi giấm khi tiếp xúc với methylparaben được bằng đánh giá bằng kỹ thuật realtime-PCR kết hợp phương pháp Delta-delta Ct của Livak để tính sự khác biệt. Gen nội kiểm được sử dụng là β -*tubulin*.⁶

- Phản ứng realtime PCR sử dụng các cặp mồi sau:⁵

<i>ERR</i> -F	5' -CCTGAAATCCTCGCCCTC-3'
<i>ERR</i> -R	5' -CCATTGCCGCCACTTGTA-3'
<i>EcR</i> -F	5' -AAGGAAGGTATATTGCGCGC-3'
<i>EcR</i> -R	5' -GGAGAACCAATGTGCGATGA-3'
β - <i>tubulin</i> -F	5'-AGTTCACCGCTATGTTCA-3'
β - <i>Tubulin</i> -R	5'-CGCAAAACTTGATCGAG-3'

Số liệu được ghi lại bằng Microsoft Excel và phân tích bằng phần mềm Graphpad Prism 7.0 sử dụng log-rank test.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên ruồi giấm và chưa có thử nghiệm trên các đối tượng khác. Nghiên cứu không vi phạm đạo đức nghiên cứu y học.

III. KẾT QUẢ

1. Ảnh hưởng của methylparaben lên tuổi thọ ruồi giấm

Ruồi giấm trưởng thành ở mỗi nhóm chứng và nhóm phơi nhiễm methylparaben, 40 ruồi giấm trưởng thành ở mỗi nhóm, 20 con/ống, nhiệt độ 25°C, độ ẩm 60% và thời gian chiếu

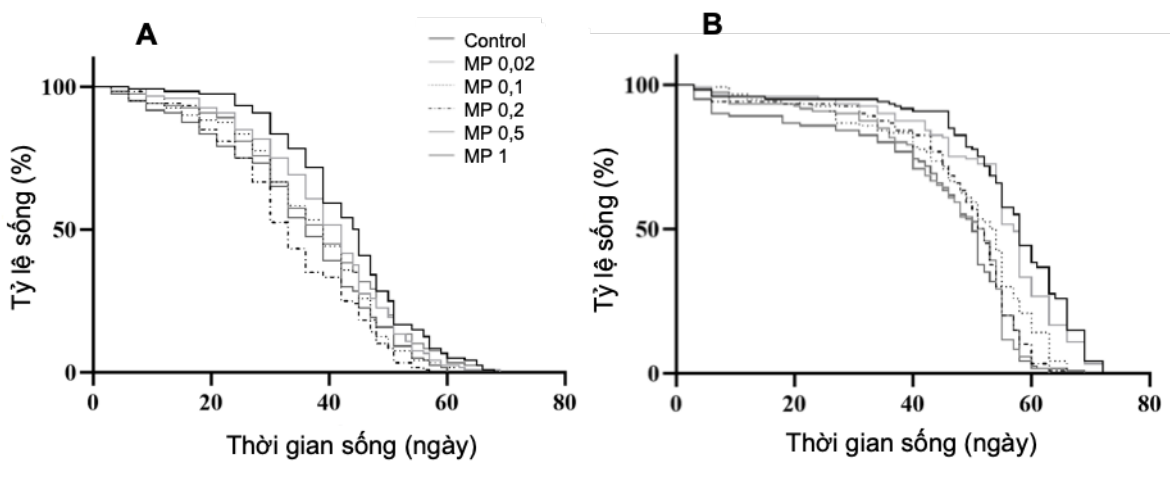
sáng 12h sáng: 12h tối. Ruồi liên tục được chuyển sang các ống thức ăn mới và ghi nhận số lượng ruồi chết 3 ngày 1 lần. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của methylparaben đến tuổi thọ của ruồi giấm được thể hiện ở Bảng 1, Biểu đồ 1.

Bảng 1. Kết quả xác định thời gian chết của ruồi giấm phơi nhiễm với methylparaben (MP) ở các nồng độ khác nhau (%)

MP (%)	Thời gian chết một nửa (ngày)	
	Ruồi cái (n = 40)	Ruồi đực (n = 40)
0	58	44.5
0,02	55*	42*
0,1	53****	39***
0,2	51.5****	33****
0,5	51.5****	39**
1,0	50****	36****

Phân tích thống kê sử dụng log-rank test

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$



Biểu đồ 1. Biểu đồ đánh giá tỉ lệ sống của ruồi đực (A) và ruồi cái (B) ở nhóm chứng (Control) và nhóm nghiên cứu MP

Theo Bảng 1 và Biểu đồ 1 ta có thể thấy được methylparaben làm giảm rõ rệt tuổi thọ của ruồi giấm ở cả hai giới. Với 5 nồng độ methylparaben trong thí nghiệm, nồng độ 0,02% có ít tác động lên thời gian sống của ruồi trên cả 2 giới. Trong khi đó, nồng độ gây ảnh hưởng mạnh nhất ở ruồi cái là 1%, còn ở ruồi đực là 0,2%.

2 Ảnh hưởng của methylparaben lên khả năng sinh sản của ruồi giấm

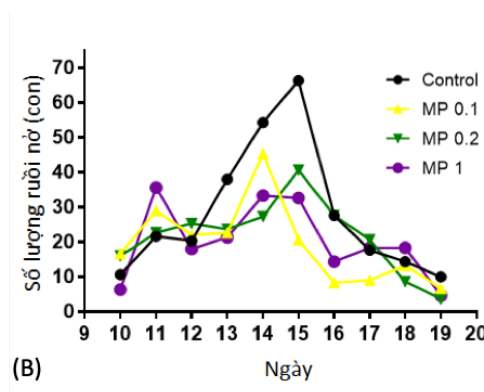
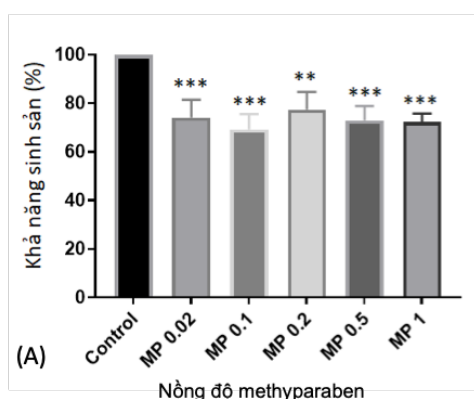
Để đánh giá sự thay đổi trong khả năng sinh sản của ruồi giấm khi tiêu thụ độc chất, chúng tôi tiến hành đếm số lượng ruồi nở ra từ các cặp bố mẹ ở nhóm chứng và nhóm nghiên cứu tại các thời điểm cố định trong khoảng thời gian 10 ngày liên tiếp. Số liệu được xử lý với Microsoft Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm GraphPab Prism 7.04 sử dụng Twoway ANOVA. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2, Biểu đồ 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của methylparaben lên khả năng sinh sản của ruồi giấm ở nhóm chứng và nhóm nghiên cứu

Nồng độ MP	Khả năng sinh sản (%)	Trung bình số ruồi nở trong 10 ngày	Thời gian nở trung bình (ngày)
0 %	100	281 ± 24,6	14,36 ± 0,66
0,02 %	74,14	208,7 ± 31,9 ***	13,63 ± 0,60
0,1 %	69,26	193,7 ± 7,4 ***	13,66 ± 0,68
0,2 %	77,39	216,3 ± 6,6 **	14,01 ± 0,65
0,5 %	72,95	204,7 ± 21,1 ***	14,08 ± 0,70
1%	72,4	203 ± 12,1 ***	14,12 ± 0,56

Phân tích thống kê sử dụng Twoway ANOVA

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001



Biểu đồ 2. Biểu đồ đánh giá khả năng sinh của ruồi giấm dưới tác dụng của methylparaben

(A) Mức độ thay đổi khả năng sinh sản được so sánh giữa nhóm chứng và nhóm nghiên cứu.

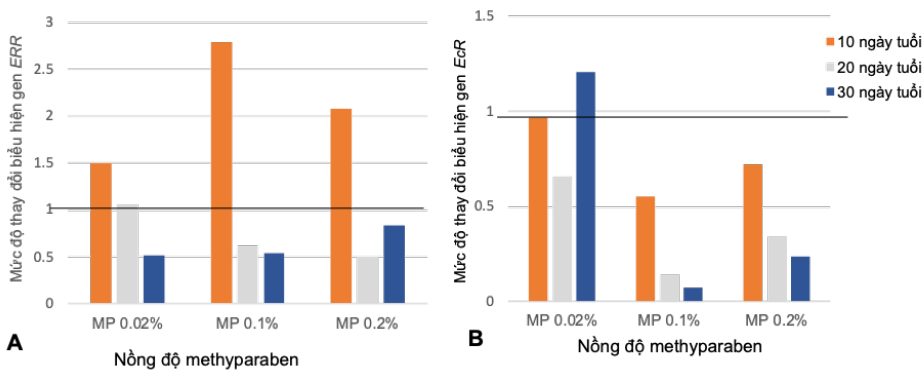
(B) Trung bình số ruồi nở theo ngày trong 10 ngày liên tiếp. Trục hoành thể hiện ngày tính từ khi cặp bố mẹ giao phối. Trục tung thể hiện số lượng ruồi nở (tính theo con)

(*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001)

Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng sinh sản (Bảng 2 và Biểu đồ 2) cho thấy, mặc dù tổng số ruồi nở ra trong 10 ngày liên tiếp ở nhóm nghiên cứu giảm so với nhóm chứng nhưng thời gian nở trung bình của hai nhóm này hầu như không có khác biệt. Trong năm nồng độ methylparaben, nồng độ có ít ảnh hưởng nhất là 0,2% làm giảm khả năng sinh sản của ruồi giấm xuống 77,39%. Trong khi đó, nồng độ methylparaben thấp hơn là 0,1% lại gây giảm khả năng sinh sản mạnh nhất (69,26%). Nhìn chung, methylparaben có thể làm suy giảm khoảng một phần tư khả năng sinh sản của ruồi giấm.

3 Kết quả đánh giá ảnh hưởng của methylparaben lên biểu hiện gen *ERR* và *EcR* ở ruồi giấm cái trưởng thành

Lựa chọn 10 ruồi cái trưởng thành vào thời điểm 10, 20 và 30 ngày tuổi để tách chiết RNA tổng số, sau đó tổng hợp cDNA và đánh giá biểu hiện gen *ERR* và *EcR* bằng phương pháp realtime PCR với cặp mồi *ERR*, *EcR* sử dụng gen β -*tubulin* làm gen nội chuẩn. Số liệu được tính toán bằng phương pháp $2^{-\Delta\Delta Ct}$ của Livak.⁶ Kết quả đánh giá ảnh hưởng của methylparaben đến biểu hiện gen *ERR* và *EcR* được thể hiện ở Biểu đồ 3 A và B.



Biểu đồ 3. Biểu đồ đánh giá mức độ thay đổi biểu hiện gen *ERR* (A) và *EcR* (B) dưới ảnh hưởng của methylparaben. Nhóm chứng được thể hiện bằng đường màu đen và biểu hiện gen coi như bằng 1 ở mọi trường hợp. Biểu hiện gen được tính toán với gen nội chuẩn là β -*tubulin*

Kết quả đánh giá biểu hiện gen *ERR* (Biểu đồ 3.A) cho thấy ở thời điểm 10 ngày tuổi mức độ biểu hiện gen tăng ở tất cả nồng độ, tăng mạnh nhất ở nồng độ methylparaben 0,1% với mức tăng gần 3 lần. Khi ruồi giấm được 20 đến 30 ngày tuổi thì biểu hiện gen có xu hướng giảm so với chứng.

Ngược lại với kết quả biểu hiện gen *ERR* ở ngày thứ 10, biểu hiện gen *EcR* ở cả ba nồng độ methylparaben đều giảm. Ở các thời điểm tiếp theo của 20 và 30 ngày tuổi mức độ giảm rõ rệt. Riêng nồng độ methylparaben 0,02% ở ngày thứ 30 ghi nhận thấy mức độ

biểu hiện gen *EcR* tăng so với nhóm chứng (Biểu đồ 3.B).

IV. BÀN LUẬN

Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy, việc tiếp xúc với methylparaben làm giảm đáng kể tuổi thọ của ruồi giấm. Một số nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra việc giảm tuổi thọ của ruồi khi tiếp xúc với các hợp chất paraben như ethyl- và methyl-paraben.⁷ Điều này có thể giải thích bởi khả năng làm suy giảm quá trình chống oxy hóa và tăng mức độ tổn thương lên các đại phân tử trong tế bào của paraben. Từ đó,

paraben và các hợp chất của chúng có thể phá hủy từ từ chức năng của các bào quan và thúc đẩy quá trình lão hóa dẫn đến hệ quả là giảm tuổi thọ của sinh vật.⁷

Các paraben được xếp vào nhóm các hóa chất gây rối loạn nội tiết (EDCs - The endocrine disrupting chemicals). Theo Oehmann và cộng sự, các EDC có thể can thiệp vào chức năng nội tiết ở động vật không có xương sống.⁸ Methylparaben là một EDC nên nó có thể làm mất cân bằng sản xuất hormone, làm gián đoạn các tín hiệu nội tiết và ảnh hưởng đến tuổi thọ ruồi giấm.

Khả năng sinh sản được tính bằng tổng số con ruồi nở ra trong 10 ngày. Kết quả cho thấy khi ruồi giấm được tiếp xúc với methylparaben có thể làm giảm khả năng sinh sản của ruồi giấm. Các ảnh hưởng này có thể là do sự mất cân bằng hormone ecdysteroid. Các ecdyson có vai trò thiết yếu trong việc điều chỉnh quá trình biến thái của ruồi giấm.⁹ Hormon này kích hoạt quá trình biến đổi chính trong cơ thể ruồi giấm và khi nồng độ hormone ecdysteroid tăng sẽ dẫn đến giảm sản xuất trứng. Ecdysteroid có dạng hoạt động chính là 20-E. Sự cân bằng hormone 20-E và hormon tăng trưởng làm cho quá trình tạo trứng ở ruồi giấm xảy ra bình thường. Methylparaben có thể bất chước ecdyson và liên kết được với EcR và làm trung gian cho một loạt phản ứng dây chuyền gây rối loạn cân bằng giữa 20-E và JH. Chính sự mất cân bằng này của 20-E và JH là nguyên nhân làm giảm khả năng sinh sản và tuổi thọ của ruồi giấm.¹⁰

Tương tự như methylparaben, bisphenol A (BPA) cũng là một EDC và nó được coi là một loại estrogen vì nó có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen *ERR* và ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của ruồi giấm thông qua sự gián đoạn tín hiệu nội tiết ở ruồi giấm.¹¹ Từ đó, chúng tôi cho rằng methylparaben có thể có tác dụng tương tự. Vì vậy chúng tôi đã thực

hiện kiểm tra mức độ biểu hiện gen *ERR* và *EcR* ở ruồi giấm khi phơi nhiễm với methylparaben. Methylparaben ở nồng độ 0,02%, 0,1% và 0,2% đều làm tăng mạnh mẽ biểu hiện của gen *ERR* ở ruồi 10 ngày tuổi sau đó giảm mạnh tại 20 và 30 ngày tuổi so với nhóm chứng. Trong khi đó, cũng ở 3 nồng độ này của methylparaben gen *EcR* lại giảm biểu hiện theo thời gian từ 10 đến 30 ngày tuổi. Planelló và cộng sự đã chứng minh được rằng BPA có thể ảnh hưởng đến biểu hiện gen *EcR*. Ngoài ra, ethylparaben có thể hoạt động như một ecdyson để điều chỉnh biểu hiện gen *EcR* - gen quy định thụ thể ecdyson. Nó có vai trò trong tuổi thọ và khả năng sinh sản của ruồi giấm.

V. KẾT LUẬN

Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy methylparaben có ảnh hưởng tiêu cực đến tuổi thọ và chức năng sinh sản trên mô hình ruồi giấm và đây cũng là một gợi ý có thể ứng dụng mô hình này để nghiên cứu độc tính của các chất hóa học ảnh hưởng đến sức khỏe sinh sản, ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của động vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nutrition C for FS and A. Color Additives in Foods. *FDA*. Published online July 6, 2023. Accessed October 30, 2023. <https://www.fda.gov/food/color-additives-information-consumers/color-additives-foods>.
2. Trasande L, Shaffer RM, Sathyanarayana S. Food Additives and Child Health. *Pediatrics*. 2018; 142(2): e20181410. doi:10.1542/peds.2018-1410.
3. Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol*. 2008; 28(5): 561-578. doi:10.1002/jat.1358.

4. Prusakiewicz JJ, Harville HM, Zhang Y, Ackermann C, Voorman RL. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology*. 2007; 232(3): 248-256. doi:10.1016/j.tox.2007.01.010.
5. Liu T, Li Y, Zhao X, Zhang M, Gu W. Ethylparaben affects lifespan, fecundity, and the expression levels of ERR, EcR and YPR in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 2014; 71:1-7. doi:10.1016/j.jinsphys.2014.09.008.
6. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
7. Chen Q, Pan C, Li Y, Zhang M, Gu W. The Combined Effect of Methyl- and Ethyl-Paraben on Lifespan and Preadult Development Period of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *J Insect Sci*. 2016; 16(1):15. doi:10.1093/jisesa/iev146.
8. Oehlmann J, Di Benedetto P, Tillmann M, Duft M, Oetken M, Schulte-Oehlmann U. Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. *Ecotoxicology*. 2007; 16(1): 29-43. doi:10.1007/s10646-006-0109-x.
9. Gálíková M, Klepsatel P, Senti G, Flatt T. Steroid hormone regulation of *C. elegans* and *Drosophila* aging and life history. *Exp Gerontol*. 2011; 46(2-3): 141-147. doi:10.1016/j.exger.2010.08.021.
10. Soller M, Bownes M, Kubli E. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Dev Biol*. 1999; 208(2): 337-351. doi:10.1006/dbio.1999.9210.
11. Weiner AK, Ramirez A, Zintel T, et al. Bisphenol A affects larval growth and advances the onset of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014; 101:7-13. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.12.008.

Summary

EFFECTS OF METHYLPARABEN ON FERTILITY AND LIFESPAN IN AN EXPERIMENTAL DROSOPHILA MELANOGASTER MODEL

Methylparaben is an additive used for thickening, moisturizing, emulsifying, coloring, and preservation. Previous research has shown that parabens have a limited affinity for estrogen receptors and suggest that this chemical may contribute to endocrine abnormalities. This study investigated the effects of methylparaben on fertility and health using a fruit fly model. Compared to unexposed controls, flies exposed to methylparaben at a concentration of 1% exhibited a shorter lifetime, with a 13.8% decrease in females and 19.2% in males. Additionally, 0.1% methylparaben concentration resulted in lower fertility by 40.74% compared to the control group. Further investigation of the gene expression of EcR and ERR at methylparaben concentrations of 0.02%, 0.1%, and 0.2% revealed that EcR increased from day 10 to day 30. In contrast, ERR increased initially at day ten and then decreased significantly at days 20 and 30 compared to the control group. These findings demonstrated that methylparaben had adverse effects on fruit flies, including shortened longevity and altered reproductive hormone receptors. Further research is needed to evaluate the implications of additives on human health.

Keywords: Methylparaben, *Drosophila melanogaster*, additive.