

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Minh

**NGHIÊN CỨU SỰ THAY ĐỔI TĂNG SINH VÀ CẤU
TRÚC KHUNG XƯƠNG TẾ BÀO GAN CHANG (CCL-13)
TRONG ĐIỀU KIỆN VI TRỌNG LỰC MÔ PHỎNG**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9420201

Tp. Hồ Chí Minh, Năm 2024

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. **Người hướng dẫn 1:** TS. Lê Thành Long, Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam
2. **Người hướng dẫn 2:** GS. TS. Hoàng Nghĩa Sơn, Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Thị Thương Huyền

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Hoài

Phản biện 3: PGS.TS. Nguyễn Trọng Hồng Phúc

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Trọng lực Trái đất ảnh hưởng đến chọn lọc tự nhiên bằng cách giới hạn kích thước của sinh vật ở một phạm vi chấp nhận được. Để chống lại trọng lực, các sinh vật sống cần phát triển các hệ thống hỗ trợ như cấu trúc vận động được hỗ trợ thích hợp, màng tế bào cứng và điều hòa dòng chất lỏng trong cơ thể. Các nghiên cứu của NASA cho thấy việc tiếp xúc với môi trường vi trọng lực đã gây ảnh hưởng xấu đến con người như teo cơ và suy giảm bộ xương, ngoài ra còn làm chậm chức năng hệ thống tim mạch, giảm sự sản xuất hồng cầu, rối loạn thăng bằng, rối loạn thị lực và thay đổi hệ thống miễn dịch

Nhiều thiết bị được phát triển và sử dụng trên Trái đất để mô phỏng các điều kiện vi trọng lực (SMG: Simulated microgravity) như hệ thống 2D-clinostat, hệ thống 3D-clinostat và máy định vị vị trí ngẫu nhiên (RPM).

Trong đó mô hình quay 3D (3-D clinostat) được sử dụng nhiều cho các nghiên cứu về điều kiện không trọng lực tác động lên các dòng tế bào khác nhau và hệ thống sống. Các nghiên cứu gây đây cho thấy vi trọng lực gây ra sự ức chế tăng sinh của một số dòng tế bào như tế bào tiền thân tạo máu của người, tế bào gốc trung mô tủy xương và tế bào gốc trung mô chuột.

Hơn nữa, sự tái tạo tubulin đã xảy ra trong các tế bào nội mô dưới vi trọng lực. Sự tổ chức lại F-actin gây ra để ức chế sự di chuyển của các tế bào gốc trung mô của chuột do vi trọng lực mô phỏng. Vi trọng lực mô phỏng cũng ảnh hưởng đến gan chuột bằng cách thay đổi sự trao đổi chất của Loureirin B và Sự biểu hiện của Cytochrome P450 chính.

Gan là một trong những cơ quan lớn nhất trong cơ thể con người. Nó đóng một vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa carbohydrate, protein và lipid. Tế bào gan chiếm khoảng 80% thể tích gan. Cho đến nay đã có rất nhiều nghiên cứu về các hoạt động và chức năng của tế bào gan. Hầu hết các nghiên cứu thường được thực hiện trên tế bào gan Chang, là

dòng tế bào đã được thương mại hoá và đã được nghiên cứu cho thấy có các đặc điểm sinh học và chức năng tương tự như các tế bào gan bình thường. Tuy nhiên, chp đến nay vẫn chưa có các nghiên cứu cụ thể về tác động của vi trọng lực mô phỏng lên sự tăng sinh và cấu trúc khung xương của tế bào gan người.

Từ những yêu cầu thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu thực hiện đề tài: ***“Nghiên cứu sự thay đổi tăng sinh và cấu trúc khung xương tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng”***, nhằm cung cấp dẫn chứng khoa học về mức độ ảnh hưởng của vi trọng lực mô phỏng lên sự thay đổi tăng sinh và cấu trúc khung xương của tế bào. Trên cơ sở đó các nhà khoa học có thể nghiên cứu sâu hơn để đưa ra các giải pháp khắc phục ảnh hưởng của vi trọng lực lên con người cũng như các loài sinh vật.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Đánh giá ảnh hưởng của vi trọng lực mô phỏng đến sự tăng sinh và tạo khung xương của tế bào gan Chang (CCL-13) dựa trên các đặc điểm như khả năng sống, chu kỳ tế bào, sự biểu hiện các gene điều hòa chu kỳ tế bào, sự thay đổi hình thái nhân, quá trình apoptosis và đặc biệt là sự tổ chức các bó vi ống và vi sợi bằng hệ thống clinostat 3-D.

3. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu tập trung vào việc đánh giá sự cảm ứng của tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng (Clinostat 3-D) với các nội dung:

- Đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào gan Chang (CCL-13)
- Xác định quá trình chết theo chương trình (apotosis) của tế bào CCL-13.
- Đánh giá sự biểu hiện các gene mã hóa cho protein hình thành cấu trúc bộ khung xương tế bào CCL-13.
- Đánh giá sự thay đổi cấu trúc bộ khung xương tế bào CCL-13.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về vi trọng lực

Khái niệm vi trọng lực. Các hệ thống vi trọng lực mô phỏng như clinostat 2-D, hệ thống buồng quay (RWV), máy định vị trí ngẫu nhiên (RPM), hệ thống clinostat 3-D. Các nghiên cứu ảnh hưởng của vi trọng lực lên hệ thống sống.

1.2. Tế bào gan Chang (CCL-13)

Sự ra đời của tế bào gan Chang. Dòng tế bào “Chang Liver” đã được lưu giữ tại ATCC (American Type Culture Collection) và được thương mại hoá với ký hiệu là CCL-13. Khái quát các nghiên cứu ứng dụng tế bào CCL-13 hiện nay.

1.3. Tổng quan về sự sinh trưởng tế bào

Khái quát về sự sinh trưởng của tế bào, chu kỳ tế bào và các cơ chế điều hoà. Những nghiên cứu ảnh hưởng của vi trọng lực đến sự sinh trưởng của tế bào.

1.4. Sự chết theo chương trình (apoptosis)

Khái niệm về sự chết theo chương trình của tế bào. Các con đường dẫn đến quá trình apoptosis của tế bào. Các nghiên cứu về tác động của vi trọng lực lên quá trình apoptosis của tế bào.

1.5. Bộ khung xương tế bào

Cấu trúc bộ khung xương của tế bào. Các tác động của môi trường vi trọng lực lên sự hình thành của các vi ống, vi sợi và hoạt động phân chia tế bào.

1.6. Các kỹ thuật đánh giá ảnh hưởng của vi trọng lực mô phỏng

Khái niệm và nguyên lý ứng dụng của các kỹ thuật hiện nay được sử dụng để đánh giá mức độ ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực mô phỏng trong nuôi cấy tế bào như kỹ thuật Western Blot, kỹ thuật Flow Cytometry, hệ thống Cytell, Kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch (ICC: Immunocytochemistry) và phương pháp Realtime-PCR.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

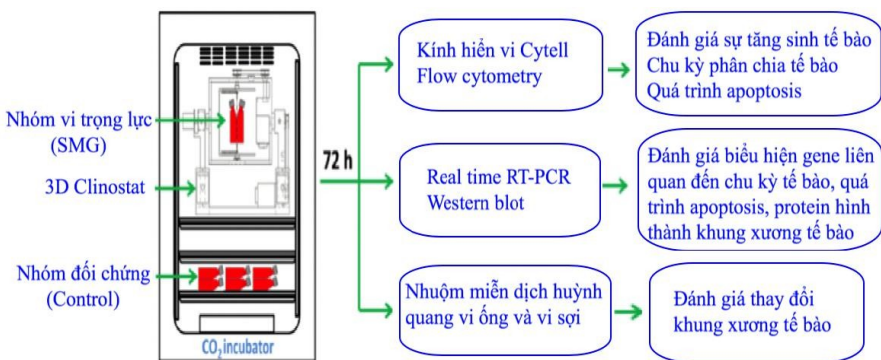
2.1. Vật liệu

- Tế bào gan Chang (CCL-13) được cung cấp bởi Công ty ATCC.

- Hệ thống máy clinostat 3-D tạo môi trường vi trọng lực mô phỏng được thiết kế và chế tạo trong đề tài: “Nghiên cứu đánh giá sự thay đổi trong cấu trúc bộ khung tế bào cơ thể sống trong điều kiện mô phỏng trạng thái vi trọng lực (simulated microgravity)”, thuộc Chương trình Khoa học công nghệ vũ trụ, mã số: VT-CB.15/18-20.

2.2. Phương pháp

Các nội dung nghiên cứu của đề tài được thực hiện với sơ đồ chung:



Hình 1. Sơ đồ mô hình thí nghiệm nghiên cứu chung

2.2.1. Nuôi cấy tế bào

Các tế bào CCL-13 được nuôi cấy trong DMEM/Ham's F-12 (DMEM-12-A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Đức) được bổ sung 15% FBS (FBS-HI-22B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Đức) và 1% Pen/Strep (15140-122, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Mỹ). Tế bào CCL-13 được chia làm 2 nhóm nuôi cấy. Nhóm mô phỏng vi trọng lực (SMG), tế bào CCL-13 được gieo vào bình T-25 và đĩa 96 giếng với mật độ xác định lần lượt là 1×10^5 tế bào/bình và 2×10^3 tế bào/giếng. Sau đó, các bình T-25 và đĩa 96 giếng được đổ đầy môi trường nuôi cấy một cách cẩn thận không tạo bọt để tránh chất lỏng bị cất. Các bình và đĩa được gắn vào

khung bên trong hệ thống Clinostat 3-D (MiGra-ITB, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam), sau đó đặt trong tủ ấm CO₂ (Sanyo MCO-18AIC, Sanyo Electric Co., Osaka, Nhật Bản) trong 72 giờ. Nhóm đối chứng (control) tế bào CCL-13 được xử lý ở mức 1 g trong cùng tủ ấm CO₂ trong 72 giờ.

2.2.2. Đo mật độ tế bào bằng Kính hiển vi Cytell

Các tế bào CCL-13 được nuôi cấy trong các đĩa 96 giếng (161093, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) với mật độ 2×10^3 tế bào/giếng trong 72 giờ và sau đó loại bỏ môi trường nuôi cấy. Các hạt nhân được nhuộm bằng Hoechst 33342 (14533, Sigma-Aldrich, Munich, Đức) trong 15 phút. Các tế bào được rửa ba lần bằng dung dịch muối đệm photphat (PBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Mỹ). Số lượng tế bào CCL-13 được xác định bằng Ứng dụng Cell Cycle của Kính hiển vi Cytell (GE Healthcare, Arlington Heights, IL, Mỹ).

2.2.3. Đánh giá mức độ tăng sinh của tế bào bằng thử nghiệm WST1

Tế bào CCL-13 được nuôi cấy trong các đĩa 96 giếng (161093, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Mỹ) với mật độ 2×10^3 tế bào/giếng trong 72 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và 100 μ L môi trường mới cộng với 10 μ L WST-1 (11644807001, Roche, Basel, Thụy Sĩ) được thêm vào từng giếng. Các tế bào được ủ trong 3,5 giờ ở 37 °C trong môi trường 5% CO₂. Mật độ quang (OD) được đo ở bước sóng 450nm bằng Đầu đọc vi bản đa chế độ GloMax® Explorer (Promega Corporation, Fitchburg, WI, Mỹ).

2.2.4. Phân tích chu kỳ tế bào bằng Flow Cytometry

Tế bào CCL-13 được nuôi cấy trong bình T-25 (160430, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) với mật độ 1×10^5 tế bào/bình trong 72 giờ. Phân tích bằng Flow Cytometry bằng FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (556547, BD Biosciences, San Jose, CA, Mỹ) máy BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, Mỹ). Để phân tích tiến trình

của chu kỳ tế bào, các tế bào CCL-13 được cố định với paraformaldehyd 4% (09154-85, Nacalai Tesque, Kyoto, Nhật Bản) trong 15 phút. Các tế bào CCL-13 được rửa hai lần bằng PBS lạnh và được huyền phù trong Binding Buffer 1X ở nồng độ 1×10^6 tế bào/mL. Các tế bào CCL-13 được nhuộm bằng 5 μ L PI (51-66211E, BD Biosciatics, San Jose, CA, USA). Phân tích chu kỳ tế bào được thực hiện bằng cách đo hàm lượng DNA của tế bào bằng hệ thống Flow Cytometry.

2.2.5. Đánh giá hình thái nhân

Các tế bào CCL-13 được xử lý bằng paraformaldehyd 4% trong PBS (Nacalai, Nhật Bản) trong 30 phút và được rửa ba lần bằng dung dịch PBS. Xử lý tế bào CCL-13 bằng Triton X-100 0,1% trong PBS ở 4°C qua đêm. Hoechst 33342 (14533, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được sử dụng để nhuộm nhân nơi tối trong 15 phút. Tế bào CCL-13 được rửa ba lần bằng PBS, mỗi lần 10 phút. Tiến trình của chu kỳ tế bào và cường độ hạt nhân được đo bằng Ứng dụng Cell Cycle của kính hiển vi Cytell (GE Healthcare, Hoa Kỳ). Để đánh giá đặc tính hạt nhân của tế bào CCL-13, giá trị hình dạng hạt nhân, thông số Diện tích hạt nhân (μm^2) được điều chỉnh thành 150 và thông số của Độ nhạy (%) được điều chỉnh thành 50 (theo hướng dẫn sử dụng kính hiển vi Cytell). Đồng thời, các thay đổi hình thái nhân của tế bào CCL-13 được đánh giá bằng kết quả đo chỉ số FSC (Forward Scatter) bằng phương pháp flow cytometry.

2.2.6. Phân tích RT-PCR

2.2.6.1. Tách chiết RNA tổng

Tế bào CCL-13 được tách bằng trypsin-EDTA 0,25% và chuyển vào eppendorf 1,5 ml. Tế bào được ly giải bằng 250 μ l dung dịch ly giải RLT và được vortex trong 30 giây. 350 μ l Ethanol 70% được cho vào eppendorf chứa mẫu và dung dịch được huyền phù hoá. Toàn bộ 700 μ l mẫu trên được chuyển vào cột RNeasy và đặt cột vào eppendorf 2 ml. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút 30 giây ở 4°C. Dịch ly tâm được loại bỏ và

700 μ l dung dịch RW1 được cho vào cột RNeasy. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút ở 4°C. Dịch ly tâm được loại bỏ và 500 μ l dung dịch RPE được cho vào cột RNeasy. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút 30 giây ở 4°C. Cột RNeasy được chuyển sang eppendorf mới. 50 μ l nước không chứa RNase được chuyển vào cột RNeasy. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút 30 giây ở 4°C. Cột RNeasy được loại bỏ, mẫu RNA tổng được bảo quản ở -80°C.

2.2.6.2. Phản ứng Real time RT-PCR

Sự biểu hiện các gene được định lượng bằng phương pháp Real-time qRT-PCR với kit PCR BIO 1-Step RT-PCR Kit (PCR Biosystems). Mỗi phản ứng PCR chứa 1 μ l RNA mẫu, 2 μ l môi, 10 μ l Mix Ro-Lox và 1 μ l RTase trong tổng thể tích 20 μ l. Chu trình nhiệt của phản ứng Real-time qRT-PCR: 1 chu kỳ ở 45°C (15 phút), 95°C (2 phút); 40 chu kỳ ở 95°C (10 giây), 62°C (15 giây). Đường cong tan chảy được phân tích dựa trên bước tiến hành 60°C đến 95°C với mỗi bước đọc là 0,5°C (30 giây). Các trình tự môi được sử dụng như sau:

- Trình tự môi của các gene liên quan đến chu kỳ tế bào:

CDK4-F: 5'-ATG GAC GTC TGT GCC ACA TC-3'
 và CDK4-R: 5'-GTG CCT TGT CCA GAT ATG TCC-3'; CDK6-F: 5'-
 TCT TCA TTC ACA CCG AGT AGT GC-3' và CDK6-R: 5'-TGA GGT
 TAG AGC CAT CTG GAA A-3'; Cyclin A-F: 5'-GCC ATT AGT TTA
 CCT GGA CCC AGA-3' và Cyclin A-R: 5'-CAC TGA CAT GGA AGA
 CAG GAA CCT-3'; CDK2-F: 5'-CAG GAG TTA CTT CTA TGC CTG
 A-3' và CDK2-R: 5'-TTC ATC CAG GGG AGG TAC AAC-3'; Cyclin
 B1-F: 5'-AAT GAA ATT CAG GTT GTT GCA GGA G-3' và Cyclin B1-
 R: 5'-CAT GGC AGT GAC ACC AAC CAG-3'; Cyclin D1-F: 5'-ATG
 TTC GTG GCC TCT AAG ATG A-3' và Cyclin D1-R: 5'-CAG GTT CCA
 CTT GAG CTT GTT C-3'; GAPDH-F: 5'-CAT GAG AAG TAT GAC

AAC AGC CT-3' và GAPDH-R: 5'-AGT CCT TTC CAC GAT ACC AAA GT-3'.

- Trình tự mỗi của các gene liên quan quá trình apoptosis của tế bào:

Bcl-2-F: 5'-TCT TCA TTC ACA CCG AGT AGT GC-3' và Bcl-2-R: 5'-TGA GGT TAG AGC CAT CTG GAA A-3'; Bax-F: 5'-CCA GGA GTT ACT TCT ATG CCT GA-3' và Bax-R: 5'-TTC ATC CAG GGG AGG TAC AAC-3'; GAPDH-F: 5'-CAT GAG AAG TAT GAC AAC AGC CT-3' và GAPDH-R: 5'-AGT CCT TTC CAC GAT ACC AAA GT-3'

- Trình tự mỗi các gene mã hóa vi ống, vi sợi:

α -Tubulin 3-F: 5'-CAT TGA AAA GTT GTG GTC TGA TCA-3' và α -Tubulin 3-R: 5'-GCT TGG GTC TGT AAC AAA GCA T-3'; β -Actin-F 5'-GAG CAC AGA GCC TCG CCT TT-3' và β -Actin-R 5'-AGA GGC GTA CAG GGA TAG CA-3'; GAPDH-F: 5'-TTA GCA CCC CTG GCC AAG G-3' và GAPDH-R: 5'-CTT ACT CCT TGG AGG CCA TG-3'.

2.2.7. Phân tích Western Blot

Đánh giá sự biểu hiện protein liên quan đến chu kì tế bào (Cyclin A1, Cyclin A2, CDK4, CDK6, CDK2, Cyclin D1), quá trình apoptosis (Bcl-2, Bax) và các protein tham gia cấu trúc bộ khung xương của tế bào (α -tubulin 3, β -actin) bằng phương pháp Western Blot. Đồng thời sử dụng protein GAPDH làm đối chứng. Các bước thực hiện bao gồm: ly giải protein, điện di SDS-PAGE, chuyển màng PVDF, khóa màng, ủ kháng thể sơ cấp, ủ kháng thể thứ cấp, hiện phim.

Tế bào CCL-13 được thu thập từ bình T-25 và xử lý với LDS Sample Buffer 4X (ab119196, Abcam, Mỹ) ở 70°C trong 10 phút để thu nhận protein tổng số. Protein thu được từ các mẫu được chuyển với lượng bằng nhau vào các giếng của Precast Gel SDS-PAGE 4-12% (ab139596, Abcam, Mỹ) để phân tách các protein với hiệu điện thế không đổi 50V trong 2 giờ (ab119197, Abcam, United States). Protein được chuyển sang màng PVDF (ab133411, Abcam, Mỹ), được kẹp bởi một lớp giấy lọc Extra Thick Blot

Paper (1703966, Bio-Rad, Mỹ) và một lớp bột biển ở mỗi bên và đặt cố định vào cassette. Cassette này được đặt vào bể điện di chứa buffer TBST sao cho mặt gel nằm ở phía cực âm (cathode) và màng PVDF nằm phía cực dương (anode), và được điện di trong 2 giờ ở 50 V. Màng PVDF sau đó được khóa màng qua đêm ở 4°C trong Blocking Buffer (ab126587, Abcam, Mỹ). Màng được ủ với kháng thể chính trong đệm kẹp qua đêm ở 4°C. Kháng thể Anti-Cyclin A1 + Cyclin A2 (ab185619, Abcam, Mỹ), kháng thể Anti-Cdk4 (ab137675, Abcam, Mỹ), kháng thể Anti-Cyclin D1 (ab40754, Abcam, Cambridge, MA, Mỹ), kháng thể Anti-Cdk6 (ab124821, Abcam, Mỹ) được sử dụng ở độ pha loãng 1:5000. Kháng thể Anti-Bax (ab53154, Abcam, Cambridge, MA, Mỹ) và kháng thể Anti-Bcl-2 (ab196495, Abcam, Cambridge, MA, Mỹ) được sử dụng ở độ pha loãng 1:5000. Kháng thể Anti- β -Actin (ab8226, Abcam, Mỹ) và kháng thể Anti- α -Tubulin 3 (ab52866, Abcam, Mỹ) được sử dụng ở độ pha loãng 1:10000. Kháng thể Anti-GAPDH (ab181602, Abcam, Hoa Kỳ) được sử dụng làm đối chứng ở độ pha loãng 1:10000. Màng được rửa ba lần bằng TBST, mỗi lần 10 phút. Tiếp tục ủ màng lai với kháng thể thứ cấp có gắn enzyme horseradish peroxidase trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Xử lý màng lai đã được cố định bằng ECL Western Blotting Substrate Kit (ab65623, Abcam, Mỹ). Hình ảnh được thực hiện bằng phim X-quang.

2.2.8. Nhuộm vi ống

Tế bào CCL-13 được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^3 tế bào/giếng. Môi trường nuôi cấy được thêm vào 395 μ l/giếng. Vi ống được nhuộm bằng 2 μ l SiR-Tubulin (CY-SC002, Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA) với nồng độ 50 nM cho mỗi giếng. Phủ parafilm lên các giếng. Cấu trúc của các bó vi ống được đánh giá dưới kính hiển vi Cytell (GE Healthcare, Chicago, IL, Hoa Kỳ).

2.2.9. Nhuộm vi sợi

Tế bào CCL-13 được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^3 tế bào/giếng. CCL-13 được cố định bằng paraformaldehyde 4% (Nacalai Tesque, Kyoto, Nhật Bản) trong 30 phút, sau đó được ngâm với Triton X-100 0,1% (Merck, Darmstadt, Đức) qua đêm ở 4°C. Phalloidin CruzFluor™ 488 Conjugate (sc-363791, Santa Cruz Biotechnology, United States) được sử dụng để nhuộm sợi actin trong 1 giờ. Cấu trúc của các bó vi sợi được đánh giá dưới kính hiển vi Cytell (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

2.2.10. Phân tích thống kê

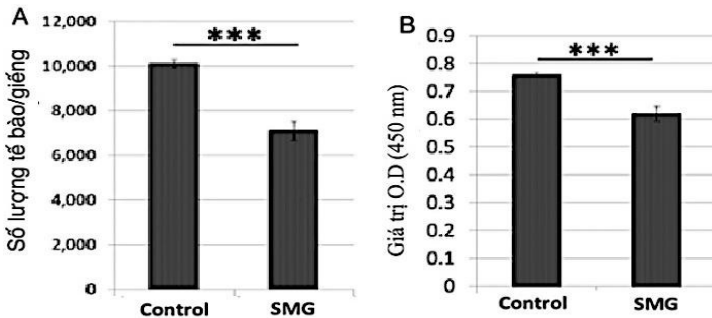
Các số liệu kết quả nghiên cứu được phân tích bằng phần mềm Sigma Plot (SYSTAT Software, Mỹ). Kết quả đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp One-way ANOVA, trong đó $p \leq 0,05$ được xem là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng tăng sinh của tế bào CCL-13 dưới tác động của SMG

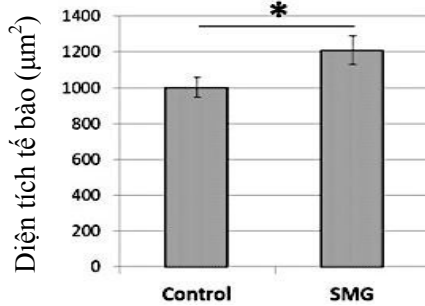
3.1.1. Sự thay đổi mật độ tế bào CCL-13

Số lượng tế bào được xác định bằng chương trình Cell Cycle App của hệ thống kính hiển vi huỳnh quang Cytell. Kết quả phân tích trong hình 3.1A cho thấy số lượng tế bào CCL-13 trung bình mỗi giếng ở môi trường vi trọng lực là 7092 ± 432 tế bào/giếng và thấp hơn nhiều so với số lượng tế bào trong môi trường đối chứng là 10101 ± 171 tế bào/giếng ($p \leq 0,005$). Khả năng tăng sinh của tế bào CCL-13 được đánh giá bằng thử nghiệm với kit WST-1. Kết quả phân tích giá trị độ hấp thụ của tế bào CCL-13 cho thấy giá trị OD của nhóm đối chứng là $0,76 \pm 0,01$, cao hơn so với nhóm tế bào gan CCL-13 được cảm ứng điều kiện vi trọng lực mô phỏng ($0,62 \pm 0,03$) (Hình 3.1B). Kết quả này cho thấy sự tăng sinh của tế bào CCL-13 từ nhóm SMG thấp hơn nhóm đối chứng.



Hình 3.1. Khả năng tăng sinh của tế bào CCL-13 (n=12). (A) Số lượng tế bào CCL-13 được xác định bằng kính hiển vi Cytell. (B) Khả năng tăng sinh của tế bào CCL-13 được đánh giá bằng WST-1. *** P < 0.001.

Các tế bào gan Chang (CCL-13) trong nhóm SMG có diện tích lớn hơn các tế bào trong nhóm đối chứng (lần lượt là $1209,00 \pm 81,12 \mu\text{m}^2$ so với $1000,42 \pm 56,14 \mu\text{m}^2$) (Hình 3.2). Những kết quả này cho thấy trong điều kiện SMG khả năng tăng sinh của tế bào CCL-13 giảm. Đồng thời, diện tích tế bào CCL-13 trong điều kiện SMG lớn hơn so với nhóm đối chứng.

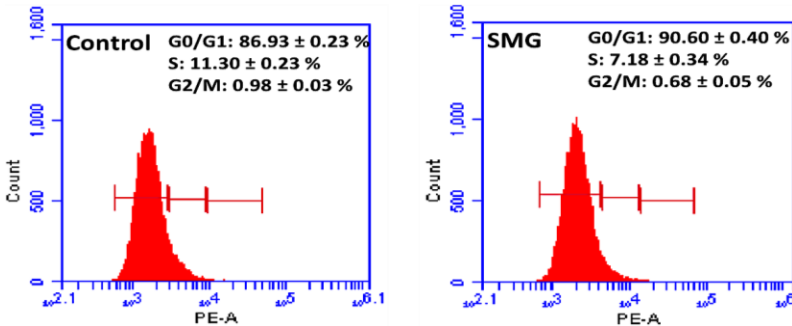


Hình 3.2. Diện tích tế bào CCL-13 trong 2 điều kiện nuôi cấy. * $p < 0,05$

3.1.2. Ảnh hưởng vi trọng lực đến chu kỳ tế bào CCL-13

3.1.2.1. Kết quả phân tích flow cytometry

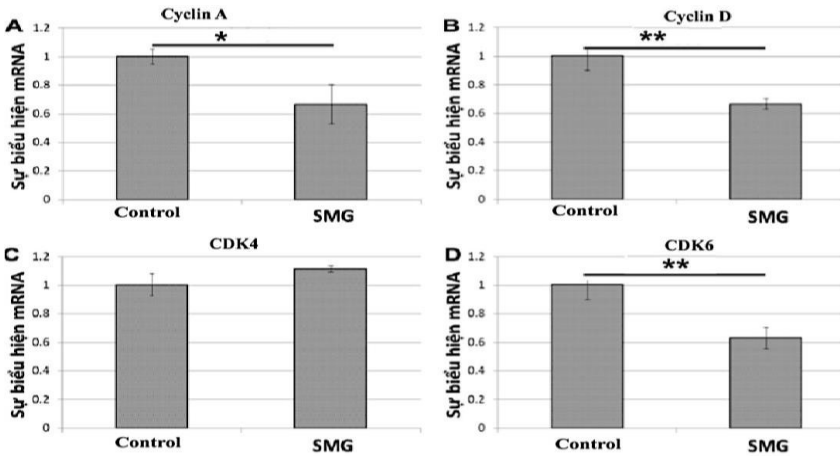
Hình 3.3 cho thấy tỉ lệ pha G0/G1 của tế bào thuộc nhóm SMG cao hơn tế bào ở nhóm đối chứng ($90,60 \pm 0,40\%$ so với $86,93 \pm 0,23\%$). Tỉ lệ pha S và pha G2/M của nhóm đối chứng lại cao hơn so với nhóm SMG. Tế bào ở nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng có xu hướng kéo dài chu kỳ tế bào trong pha nghỉ.



Hình 3.3. Chu kỳ tế bào CCL-13 phân tích bằng flow cytometry (n=12)

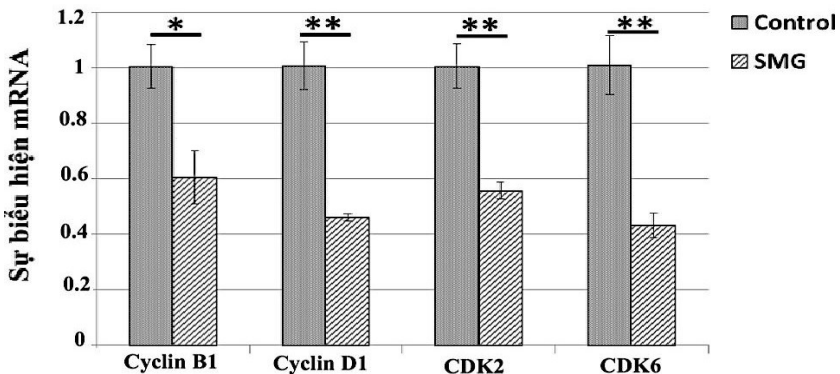
3.1.2.2. Biểu hiện phiên mã các gene điều hòa chính chu kỳ tế bào

Phân tích Realtime PCR cho thấy tế bào CCL-13 trong nhóm SMG có sự giảm biểu hiện mRNA của các gene Cyclin A (Hình 3.4A), gene Cyclin D (Hình 3.4B) và gene CDK6 (Hình 3.4D) so với các tế bào của nhóm đối chứng. Tuy nhiên, biểu hiện mRNA của gene CDK4 lại không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa hai nhóm thí nghiệm (Hình 3.4C).



Hình 3.4. Kết quả phân tích các gene điều hòa chính chu kỳ tế bào. A: gene Cyclin A; B: gene Cyclin D; C: gene CDK4; D: gene CDK6. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

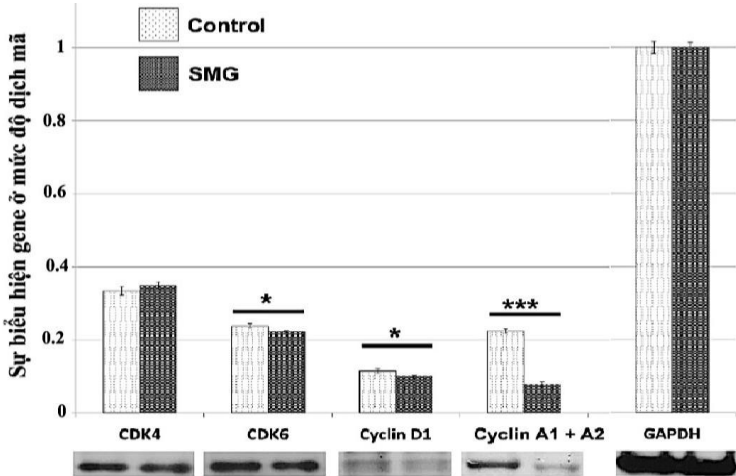
So với nhóm đối chứng, các tế bào CCL-13 của nhóm SMG đã giảm mức biểu hiện phiên mã của các gene Cyclin B1 và Cyclin D1 (Hình 3.5). Đồng thời, sự biểu hiện phiên mã của các gene CDK2 và CDK6 trong nhóm SMG cũng thấp hơn so với nhóm đối chứng. Những kết quả này cho thấy trong điều kiện SMG đã giảm sự biểu hiện phiên mã của các gene điều hòa chu kỳ tế bào CCL-13.



Hình 3.5. So sánh biểu hiện phiên mã các gene liên quan đến chu kỳ tế bào trong nhóm SMG và nhóm đối. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

3.1.2.3. Biểu hiện dịch mã các gene điều hòa chính chu kỳ tế bào

Kết quả Western blot cho thấy các tế bào CCL-13 của nhóm đối chứng có biểu hiện protein Cyclin A1 và A2, Cyclin D1 và CDK 6 cao hơn các tế bào trong nhóm SMG. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về biểu hiện gene CDK4 giữa 2 nhóm thí nghiệm (Hình 3.6).

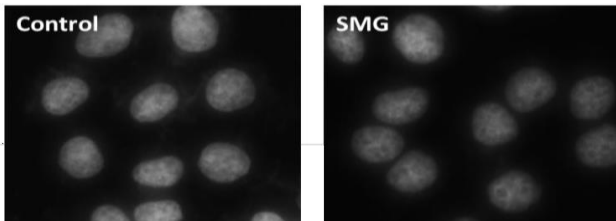


Hình 3.6. Phân tích Western blot về các protein điều hòa chu kỳ tế bào CCL-13 (n = 3). *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05

3.2. Ảnh hưởng của SMG lên quá trình apoptosis của tế bào CCL-13

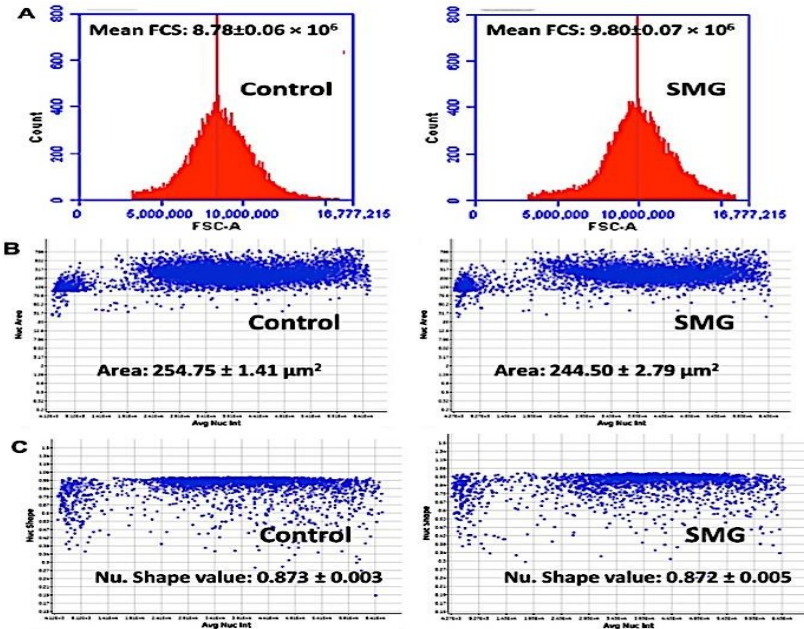
3.2.1. Thay đổi hình dạng và cường độ hạt nhân của tế bào CCL-13

Nhân tế bào CCL-13 ở nhóm control và nhóm SMG đều có hình thái bình thường, không có sự cô đặc nhiễm sắc chất, phân mảnh nhân (Hình 3.7). Điều này cho thấy apoptosis không xảy ra ở các tế bào được phân tích.



Hình 3.7. Hình thái nhân tế bào CCL-13 ở 2 nhóm thí nghiệm

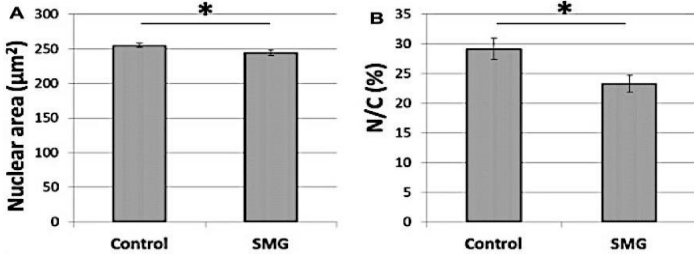
Kết quả phân tích giá trị FSC của các tế bào CCL-13 trong nhóm SMG cao hơn trong nhóm đối chứng (lần lượt là $9,80 \times 10^6$ so với $8,78 \times 10^6$) (Hình 3.8A), chứng tỏ đường kính các tế bào trong nhóm SMG lớn hơn trong nhóm đối chứng. Nhưng ngược lại diện tích nhân của tế bào CCL-13 thuộc nhóm SMG ($244,50 \pm 2,79 \mu\text{m}^2$) lại nhỏ hơn nhóm đối chứng ($254,75 \pm 1,41 \mu\text{m}^2$) (Hình 3.8B). Điều này cho thấy điều kiện SMG làm giảm diện tích nhân tế bào CCL-13. Khi Giá trị hình dạng nhân bằng 1, nhân có hình dạng tròn và toàn vẹn, khi giá trị này càng nhỏ hơn 1 thì mức độ tròn và toàn vẹn của nhân giảm dần. Kết quả phân tích có giá trị hình dạng nhân của tế bào CCL-13 thuộc nhóm đối chứng là $0,873 \pm 0,003$ còn nhóm SMG giảm là $0,872 \pm 0,005$ (Hình 3.8C), nhưng kết quả không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa hai nhóm, chứng tỏ điều kiện SMG không ảnh hưởng tới giá trị hình dạng và mức toàn vẹn của nhân tế bào CCL-13.



Hình 3.8. Kết quả phân tích tế bào và hình thái nhân tế bào CCL-13.

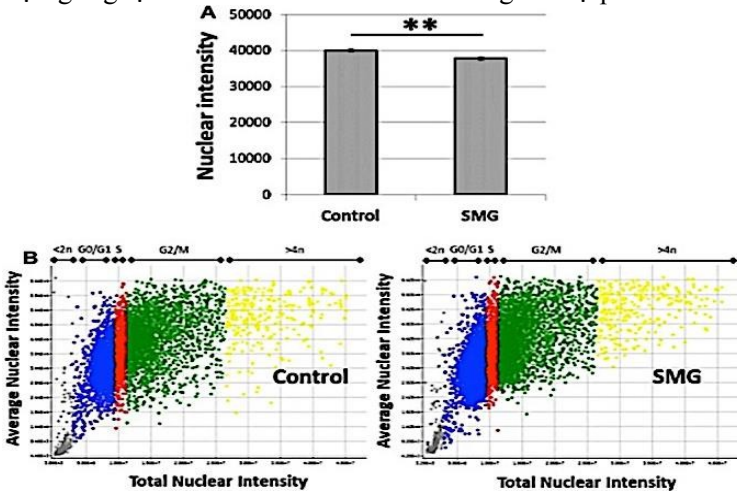
A: Giá trị FCS của tế bào, B: Diện tích nhân, C: Giá trị hình thái nhân

Vùng nhân các tế bào CCL-13 nhóm SMG ($244,45 \pm 3,80 \mu\text{m}^2$) nhỏ hơn so với nhóm đối chứng ($254,75 \pm 2,95 \mu\text{m}^2$) (Hình 3.9A). Điều này làm giảm tỉ lệ hạt nhân/tế bào chất trong các tế bào CCL-13 ở nhóm SMG ($23,29 \pm 1,46\%$) so với nhóm đối chứng ($29,15 \pm 1,80\%$) (Hình 3.9B).



Hình 3.9. Diện tích hạt nhân CCL-13 (A) và tỉ lệ hạt nhân / tế bào chất trong các tế bào CCL-13 (B). * $p < 0,05$.

Hình 3.10 cho thấy trong điều kiện SMG cường độ hạt nhân của tế bào CCL-13 (37766 ± 458) thấp hơn trong nhóm đối chứng (39985 ± 366). Kết quả là sự ngưng tụ chất nhiễm sắc ít hơn đã làm giảm sự phân chia tế bào.

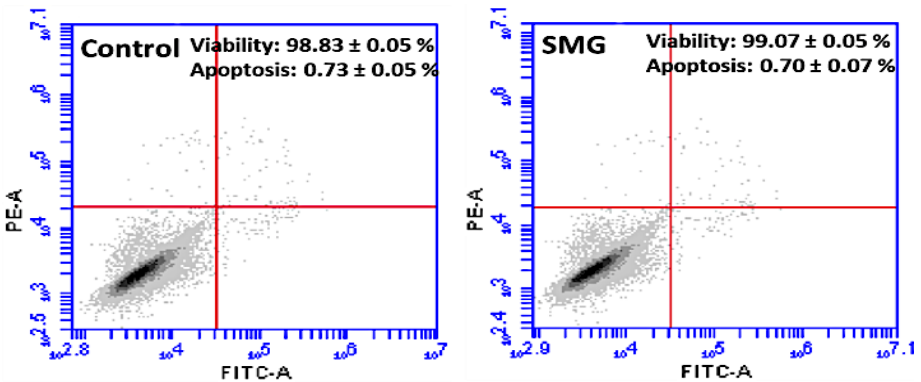


Hình 3.10. Cường độ hạt nhân (A) và phân bố cường độ hạt nhân CCL-13 (B). Màu xám: % hạt nhân $< 2n$; màu xanh: % hạt nhân trong pha G0/G1; màu đỏ: % hạt nhân trong pha S; màu lục: % hạt nhân trong pha G2/M và màu vàng: % hạt nhân $> 4n$. ** $p < 0,01$

3.2.2. Ảnh hưởng của vi trọng lực lên quá trình apoptosis

3.2.2.1. Tỷ lệ tế bào đi vào con đường apoptosis

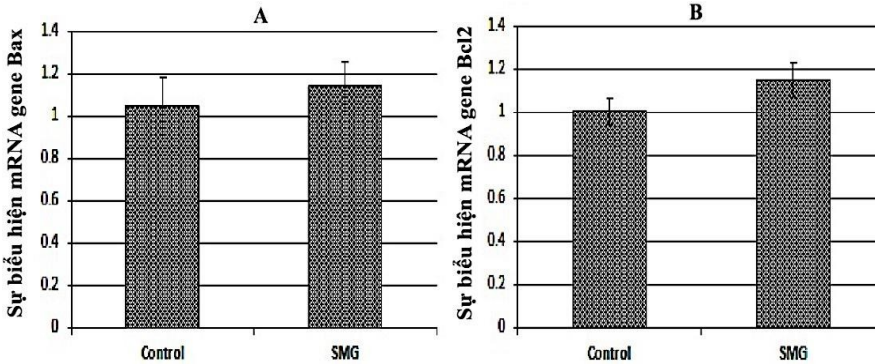
Kết quả phân tích cho thấy tỉ lệ tế bào CCL-13 sống trong nhóm đối chứng là $98,83 \pm 0,05 \%$. Trong khi đó tỉ lệ tế bào CCL-13 sống trong nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng là $99,07 \pm 0,05 \%$. Tuy nhiên không có sự khác biệt về mật độ thống kê trong tỉ lệ tế bào sống giữa hai nhóm này. Điều đó cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng không tác động lên sức sống của tế bào CCL-13 (Hình 3.11). Ngoài ra, kết quả phân tích cho thấy tỉ lệ tế bào CCL-13 bị apoptosis trong nhóm đối chứng là $0,73 \pm 0,05\%$ cao hơn trong nhóm SMG là $0,70 \pm 0,07\%$. Tuy nhiên cũng không có sự khác biệt về mật độ thống kê trong tỉ lệ tế bào bị apoptosis giữa hai nhóm này. Điều đó cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng không tác động lên sự chết theo chương trình của tế bào CCL-13.



Hình 3.11. Kết quả phân tích flow cytometry về tỉ lệ sống và tỉ lệ tế bào đi vào con đường apoptosis

3.2.2.2. Biểu hiện mức phiên mã các gene liên quan đến apoptosis

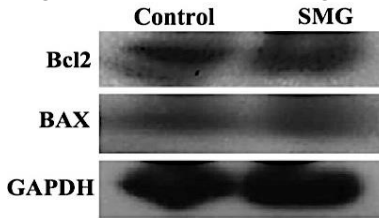
Gene Bcl-2 và Bax đóng vai trò quan trọng trong việc cân bằng tỉ lệ apoptosis của tế bào. Kết quả phân tích Realtime RT-PCR cho thấy không có sự khác biệt trong biểu hiện của gene Bax và gene Bcl-2 ở mức phiên mã của tế bào CCL-13 giữa hai nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng (Hình 3.12).



Hình 3.12. Sự biểu hiện mRNA gene Bax (A) và gene Bcl2 (B)

3.2.2.3. Biểu hiện mức độ dịch mã của các gene Bcl-2 và Bax

Kết quả Western blot không có sự khác biệt về biểu hiện protein Bcl-2 và Bax của tế bào CCL-13 giữa hai nhóm đối chứng và SMG.



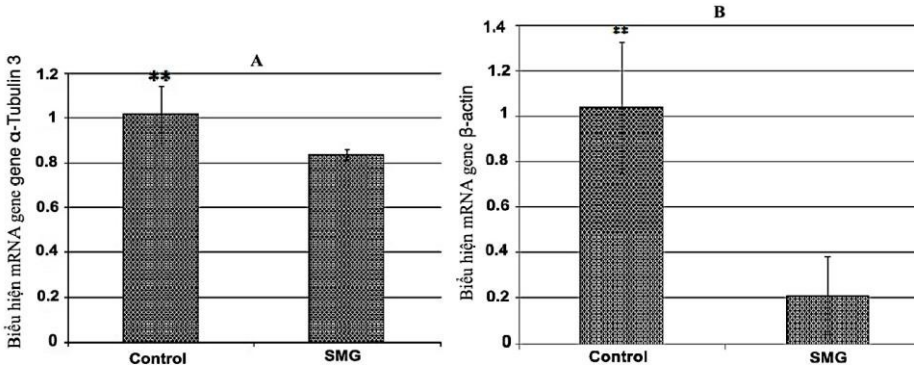
Hình 3.13. Kết quả phân tích protein Bax và Bcl-2

3.3. Thay đổi cấu trúc khung xương tế CCL-13 trong điều kiện SMG

3.3.1. Biểu hiện các gene liên quan cấu trúc khung xương tế bào

3.3.1.1. Biểu hiện mức phiên mã của gene α -tubulin 3 và gene β -actin

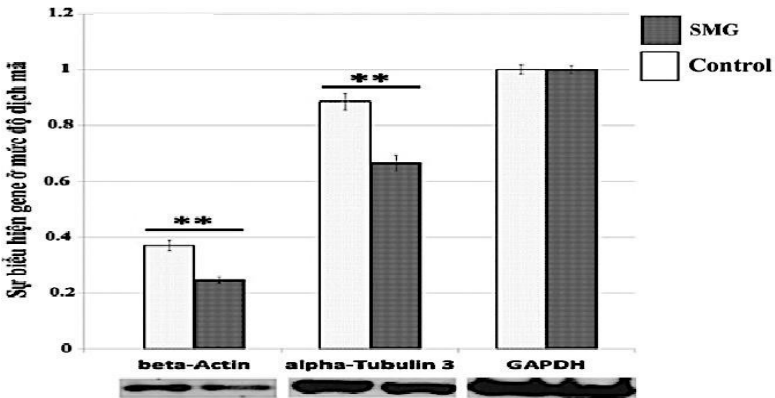
Trong điều kiện SMG, tế bào CCL-13 giảm biểu hiện gene α -Tubulin 3 là 18% so với nhóm đối chứng (Hình 3.14A). Đồng thời, Kết quả phân tích real time RT-PCR cho thấy tế bào CCL-13 giảm biểu hiện β -actin trong điều kiện SMG. Mức độ giảm β -Actin diễn ra mạnh, tế bào CCL-13 giảm biểu hiện β -Actin tới 80% (Hình 3.14B). Điều này cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng giảm biểu hiện gene α -Tubulin 3, β -Actin ở mức phiên mã và làm thay đổi cấu trúc khung xương tế bào CLL-13 một cách rõ rệt.



Hình 3.14. Biểu hiện mRNA gene α -Tubulin 3 (A) và β -actin (B). ** $P < 0.001$

3.3.1.2. Biểu hiện các protein của β -Actin và α -Tubulin 3

Trong điều kiện SMG, tế bào CCL-13 có sự giảm biểu hiện các protein β -Actin và α -Tubulin 3 nhiều hơn so với nhóm đối chứng (Hình 3.15). Kết quả này củng cố thêm cho kết quả phân tích Realtime RT-PCR. Sự biểu hiện của các genen α -Tubulin 3 và β -Actin của tế bào CCL-13 giảm ở cả mức phiên mã và dịch mã trong điều kiện SMG. Điều này ảnh hưởng tới thành phần, hàm lượng tubulin, actin, từ đó làm thay đổi cấu trúc vi ống, vi sợi cũng như sự phân bố các vi ống, vi sợi trong tế bào CCL-13.

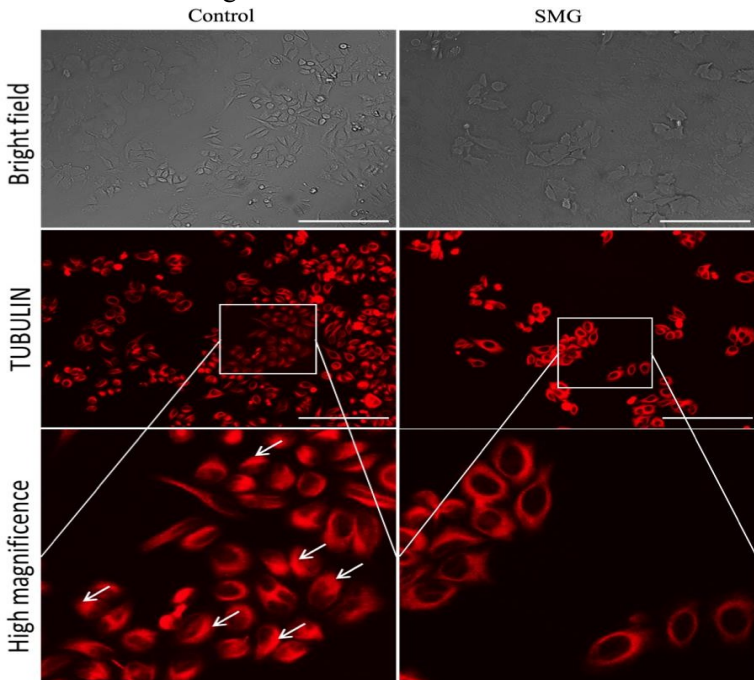


Hình 3.15. Biểu hiện protein α -Tubulin và β -actin. ** $P < 0.001$

3.3.2. Thay đổi cấu trúc khung xương tế bào CCL-13

3.3.2.1. Sự thay đổi cấu trúc vi ống của tế bào CCL-13

Hình 3.16 cho thấy các vi ống trong nhóm đối chứng phân bố với mật độ dày hơn so với nhóm SMG. Các tế bào CCL-13 ở nhóm đối chứng có hình thái giống tế bào biểu mô gan và các bó vi ống của chúng phân bố song song dọc theo chiều dài của tế bào. Sự phân bố này không quan sát thấy trong các tế bào ở nhóm SMG, thay vào đó là sự phân bố đan xen của các bó vi ống trong tế bào chất. Kết quả nhuộm protein Tubulin cho thấy trong điều kiện SMG, các tế bào CCL-13 mở rộng ra thành hình tròn thay vì kéo dài. Ngoài ra, các bó vi ống phân bố tập trung lệch nhân ở tế bào CCL-13 trong nhóm đối chứng, trong khi đó hệ thống vi ống được phân bố đều ở tế bào CCL-13 trong nhóm SMG.

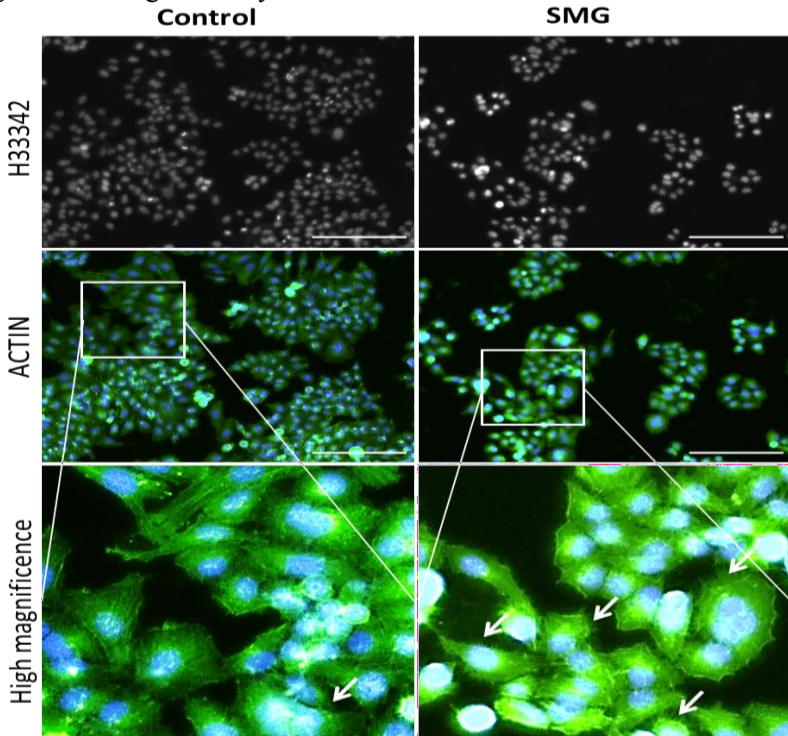


Hình 3.16. Kết quả nhuộm protein Tubulin cấu thành nên vi ống của tế bào CCL-13, thước đo = 223.64 μm

3.3.2.2. Sự thay đổi cấu trúc vi sợi của tế bào CCL-13

Kết quả nhuộm vi sợi actin ở Hình 3.17 cho thấy tế bào CCL-13 ở nhóm đối chứng có sự phân bố song song các bó vi sợi và kéo dài qua chiều dài tế

bào. Trong nhóm SMG, vi sợi actin hiển thị với mật độ thấp hơn. Kết quả cho thấy tế bào CCL-13 trong môi trường vi trọng lực có xu hướng mở rộng ra hình dạng tròn thay vì kéo dài.

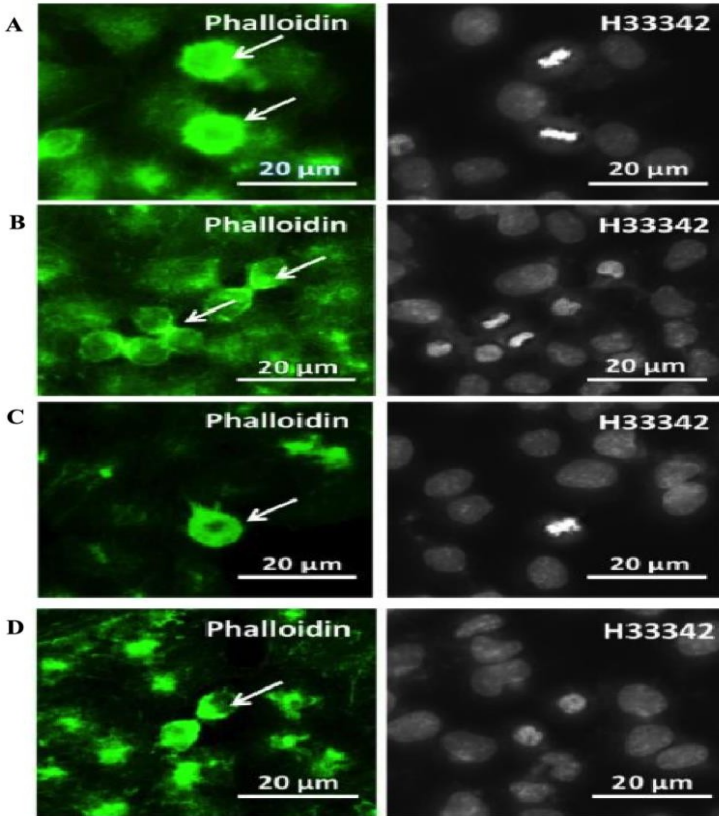


Hình 3.17. Kết quả nhuộm protein Actin cấu thành nên vi sợi actin của tế bào CCL-13, thước đo = 223.64 μm

3.3.2.3. Thay đổi cấu trúc khung xương tế bào CCL-13 khi phân bào

Các tế bào CCL-13 ở nhóm đối chứng tròn với hình dạng đỉnh trong quá trình nguyên phân và để lộ sự xuất hiện nhiều các vi nhung mao (Hình 3.18A). Trong bước cuối cùng của quá trình phân chia tế bào, các tế bào CCL-13 thể hiện sự hình thành vòng co bóp, tạo ra lực co thắt để tách một tế bào thành hai tế bào chị em (Hình 3.18B). Sự xuất hiện của vi nhung mao cũng được phát hiện trong các tế bào CCL-13 từ nhóm SMG trong quá trình nguyên phân (Hình 3.18C) cũng như sự hình thành vòng co bóp trong

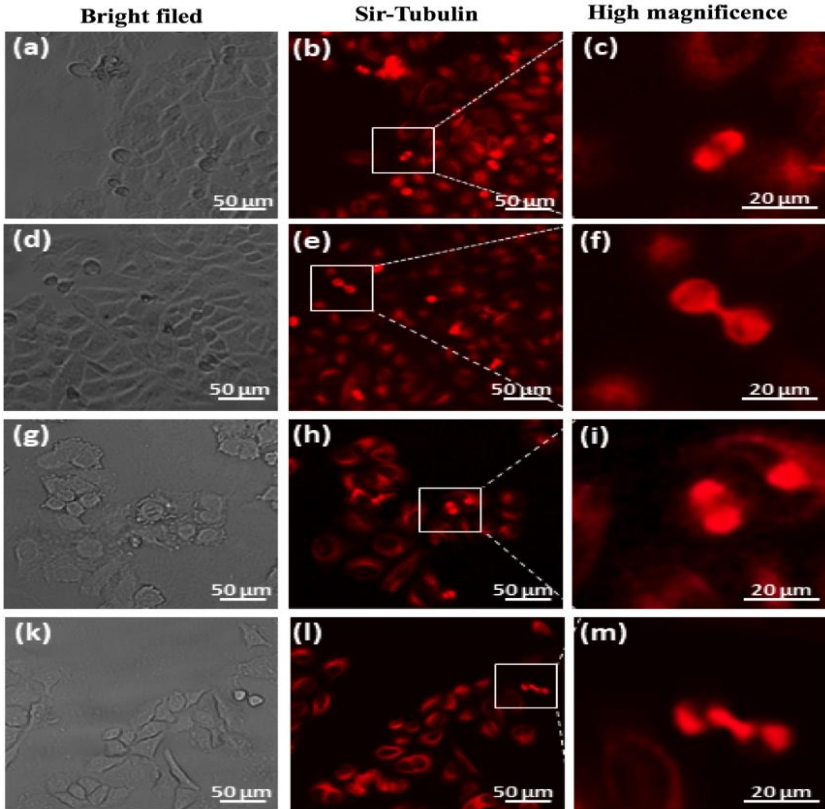
quá trình phân bào (Hình 3.18D). Tuy nhiên, các tế bào CCL-13 được xử lý bằng SMG cho thấy cường độ vi sợi trong các cấu trúc này thấp hơn so với các tế bào đối chứng.



Hình 3.18. Nhuộm vi sợi các tế bào CCL-13: (A, B) Sự xuất hiện của vòng và vi nhung mao trong các tế bào CCL-13 đối chứng; (C, D) Sự xuất hiện vòng và vi nhung mao trong các tế bào CCL-13 nhóm SMG. Các vi chất và hạt nhân lần lượt được thay thế bằng Phalloidin (màu xanh lá cây) và H33342

Nhuộm vi ống các tế bào CCL-13 trong nhóm đối chứng và nhóm SMG cho thấy sự hình thành trục chính bình thường trong quá trình nguyên phân (Hình 3.19a-c, Hình 3.19g-i). Trong quá trình phân bào, các tế bào CCL-13

đối chứng hiển thị cấu trúc bình thường của các vi ống trục chính cực (Hình 3.19d-f) trong khi dạng bất thường của cấu trúc này được phát hiện trong các tế bào CCL-13 nhóm SMG (Hình 3.19k-m). Kết quả cho thấy SMG đã ảnh hưởng đến sự hình thành cấu trúc của các vi ống trục chính cực trong quá trình phân chia tế bào.



Hình 3.19. Nhuộm vi ống của các tế bào CCL-13: (a-c và d-f) Sự xuất hiện của trục xoay trong các tế bào CCL-13 đối chứng; (g-i và k-m) Sự xuất hiện của trục chính trong các ô CCL-13 trong nhóm SMG.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Kết quả cho thấy các tế bào CCL-13 từ nhóm đối chứng và nhóm SMG biểu hiện hình dạng giống biểu mô điển hình. SMG làm giảm sự tăng sinh tế bào CCL-13 bằng cách tăng số lượng tế bào CCL-13 trong pha G0/G1. Việc dừng pha chu kỳ tế bào là do sự điều hòa giảm của các protein liên quan đến chu kỳ tế bào như Cyclin A, Cyclin B1, Cyclin D1 và kinase phụ thuộc Cyclin (CDK2 và CDK6). Những thay đổi trong chu kỳ tế bào của các tế bào CCL-13 bị ảnh hưởng bởi tình trạng SMG, điều này được thể hiện ở sự gia tăng tỷ lệ tế bào ở pha G0/G1 và sự giảm ở pha S và pha G2/M. Hơn nữa, biểu hiện dịch mã của Cyclin b1, Cyclin d1, CDK2 và CDK6 của CCL-13 cũng giảm trong nhóm SMG so với nhóm đối chứng.

Các tế bào CCL-13 của cả hai nhóm đều có hình thái hạt nhân bình thường và không có sự phân mảnh, ngưng tụ. Diện tích tế bào tiếp xúc với SMG tăng trong khi diện tích nhân của chúng lại giảm. Tỷ lệ apoptosis của tế bào CCL-13 giữa hai nhóm thử nghiệm là tương tự nhau. Đồng thời, sự biểu hiện của gene Bcl-2 và Bax (điều hòa quá trình apoptosis) cũng không có sự khác biệt thống kê ở cả nhóm SMG và nhóm đối chứng.

Các tế bào CCL-13 tiếp xúc với SMG cũng thể hiện sự điều hòa giảm của các gene α -tubulin 3 và beta-actin gây ra sự tái tổ chức bộ xương tế bào. Trong môi trường vi trọng lực, vi sợi actin và vi ống hiển thị với mật độ thấp hơn, cường độ giảm và tế bào có xu hướng mở rộng ra hình dạng tròn. Hơn nữa, những thay đổi trong cấu trúc của vòng co bóp và các vi ống trục chính cực do SMG gây ra đã ảnh hưởng quan trọng đến quá trình phân chia tế bào.

Kiến nghị

Nghiên cứu cần thực hiện trên nhiều dòng tế bào hơn và thử nghiệm với nhiều mốc thời gian hơn để làm rõ cơ chế tác động của điều kiện vi trọng lực mô phỏng lên sự sinh trưởng của tế bào.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Chi Nguyen Quynh Ho ^{1,2,†}, **Minh Thi Tran** ^{2,3,†}, Chung Chinh Doan ^{1,2}, Son Nghia Hoang ^{1,2}, Diem Hong Tran ⁴ and Long Thanh Le ^{1,2,*}. Simulated Microgravity Inhibits the Proliferation of Chang Liver Cells by Attenuation of the Major Cell Cycle Regulators and Cytoskeletal Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 4550. <https://doi.org/10.3390/ijms22094550>.

2. Minh Thi Tran ^{1,2}, Chung Chinh Doan ^{2,3}, Son Nghia Hoang ^{2,3}, Cang Ngoc Ly ³, Mai Thi Phuong Nguyen ⁴, Quan Minh To ⁵, Nhung Hai Truong ⁵, Chi Nguyen Quynh Ho ^{2,3,*} and Long Thanh Le ^{2,3,*}. The changes in the cell division of Chang liver cells induced by simulated microgravity. *Appl. Sci.* 2023, 13, x. <https://doi.org/10.3390/xxxx>