

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THỊ TRÚC QUỲNH

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN NUÔI CẤY
LÊN KHẢ NĂNG TĂNG SINH CỦA TẾ BÀO 3T3 TRONG
ĐIỀU KIỆN VI TRỌNG LỰC MÔ PHỎNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGUYỄN THỊ TRÚC QUỲNH

SINH HỌC THỰC NGHIỆM

2024

Thành phố Hồ Chí Minh - Năm 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Trúc Quỳnh

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN NUÔI CẤY LÊN
KHẢ NĂNG TĂNG SINH CỦA TẾ BÀO 3T3 TRONG ĐIỀU KIỆN VI
TRỌNG LỰC MÔ PHỎNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC
Ngành: SINH HỌC THỰC NGHIỆM
Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Lê Thành Long".

TS. LÊ THÀNH LONG

Thành phố Hồ Chí Minh - Năm 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực, nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

NGƯỜI CAM ĐOAN**NGUYỄN THỊ TRÚC QUỲNH**

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu và thực hiện luận văn tốt nghiệp vừa qua, em đã nhận được sự giúp đỡ tận tình, ý kiến đóng góp, sự quan tâm, hỗ trợ của Quý Thầy, Cô Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, cơ quan, gia đình, bạn bè. Do đó, em xin chân thành cảm ơn đến:

Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo, Quý Thầy, Cô Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình, quan tâm, hỗ trợ, giúp đỡ truyền thụ kiến thức trong thời gian học tập và nghiên cứu.

Các Thầy, Cô thuộc ngành Sinh học Thực nghiệm, Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giảng dạy giúp đỡ, hướng dẫn, hỗ trợ kiến thức trong quá trình học tập và nghiên cứu trong thời gian vừa qua.

GS.TS. Hoàng Nghĩa Sơn – Viện trưởng Viện Sinh học Nhiệt đới đã tạo điều kiện tốt nhất cho em trong suốt thời gian thực hiện đề tài tại Viện Sinh học Nhiệt đới.

TS. Lê Thành Long đã luôn tận tình hướng dẫn em thực hiện luận văn, tạo điều kiện tốt nhất về cả vật chất lẫn tinh thần cho em nghiên cứu, tham khảo và sử dụng số liệu trong đề tài này để hoàn thành luận văn.

Ba Mẹ và gia đình vì đã luôn là chỗ dựa tinh thần cho con, động viên con luôn cố gắng phấn đấu không ngừng trong sự nghiệp học tập của mình.

Chị Út Thảo vì đã luôn bên cạnh, hỗ trợ và động viên em, đồng thời luôn tạo điều kiện cho em có thời gian học tập cũng như nghiên cứu để hoàn thành đề tài này.

Anh Minh, bạn Đức Huy, em Như cùng các bạn thực tập tại Viện Sinh học Nhiệt đới, bạn Hải Vy, bạn Trâm đã cùng cộng tác và hỗ trợ giúp đỡ em hoàn thành tốt luận văn này.

Trân trọng!

Tác giả luận văn
Nguyễn Thị Trúc Quỳnh



MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	II
DANH MỤC HÌNH ẢNH, BIỂU ĐỒ	I
DANH MỤC BẢNG	II
MỞ ĐẦU	1
Mục tiêu nghiên cứu.....	2
Nội dung nghiên cứu	2
Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài	2
Những đóng góp của luận văn	2
NỘI DUNG	3
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Sinh học không gian	3
1.1.1. Mục tiêu nghiên cứu của sinh học không gian.....	3
1.1.2. Các lĩnh vực của sinh học không gian	4
1.2. Vi trọng lực	5
1.2.1. Khái niệm vi trọng lực	5
1.2.2. Vi trọng lực mô phỏng	6
1.2.3. Các hệ thống mô phỏng vi trọng lực.....	6
1.2.3.1. 3D-Clinostat	7
1.2.3.2. Buồng quay.....	8
1.2.3.3. Máy định vị ngẫu nhiên.....	9
1.3. Tế bào 3T3.....	10
1.4. Sự sinh trưởng của tế bào.....	11
1.4.1. Sự tăng sinh tế bào	11
1.4.2. Chu kỳ tế bào.....	12
1.4.3. Các yếu tố điều hòa chu kỳ tế bào.....	14
1.4.4. Sức sống của tế bào	17
1.5. Những nghiên cứu về vi trọng lực lên sự tăng sinh tế bào	18
1.5.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước	18
1.5.2. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	19
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. Vật liệu nghiên cứu	21
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	21
2.1.2. Dụng cụ và thiết bị	21
2.1.3. Hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng	22

2.1.4.	Hóa chất.....	23
2.2.	Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.2.1.	Nội dung nghiên cứu	26
2.2.1.1.	Nội dung nghiên cứu 1	26
2.2.1.2.	Nội dung nghiên cứu 2	26
2.2.2.	Phương pháp nghiên cứu.....	26
2.2.2.1.	Nuôi cấy tế bào.....	26
a.	Giải đông tế bào	26
b.	Phương pháp cấy chuyền	27
2.2.2.2.	Thử nghiệm vi trọng lực mô phỏng	28
a.	Đánh giá mật độ tế bào bằng phương pháp WST-1	30
b.	Đánh giá số lượng tế bào, nhân và chu kỳ tế bào qua phân tích bằng kính hiển vi Cytell	31
c.	Phương pháp Western Blot	31
2.2.2.3.	Phương pháp đánh giá sức sống tế bào	34
2.2.2.4.	Phương pháp Flow Cytometry	34
	Phương pháp thống kê.....	35
	Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	36
3.1.	Nội dung 1: Đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy dưới điều kiện vi trọng lực mô phỏng lên sự tăng sinh của tế bào 3T3	36
3.1.1.	Sự thay đổi mật độ tế bào	36
3.1.2.	Đánh giá sự thay đổi hình thái nhân tế bào	40
3.1.3.	Đánh giá sự thay đổi của chu kỳ tế bào.....	43
3.1.4.	Đánh giá sự thay đổi biểu hiện các protein liên quan đến chu kỳ tế bào	46
3.2.	Nội dung 2: Đánh giá sức sống của tế bào	48
	Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	52
4.1.	Kết luận.....	52
4.2.	Kiến nghị	52
	DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	53
	DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	54
	PHỤ LỤC	a

DANH MỤC HÌNH ẢNH, BIỂU ĐỒ

Hình 1.1. Mô hình 3D-Clinostat Gravity Controller Gravite	7
Hình 1.2. Mô hình buồng quay (RWV)	8
Hình 1.3. Mô hình máy định vị ngẫu nhiên (RPM)	9
Hình 1.4. Tế bào 3T3 khi ở mật độ nuôi cấy cao và mật độ nuôi cấy thấp ...	10
Hình 1.5. Chu kỳ tế bào	12
Hình 1.6. Vai trò của Cyclin và CDK trong chu kỳ tế bào	16
Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu	25
Hình 2.2. Đĩa 96 giếng chứa tế bào 3T3 trong thử nghiệm vi trọng lực.....	28
Hình 2.3. Bình nuôi tế bào 3T3 T25 trong thử nghiệm vi trọng lực.....	29
Hình 2.4. Chuẩn bị mẫu cho cảm ứng SMG.....	30
Hình 2.5. Điện di SDS-PAGE.....	32
Hình 2.6. Phương pháp chuyển màng PVDF.....	33
Hình 3.1. Hình thái tế bào 3T3 trong quá trình nuôi cấy in vitro ở hai nhóm thí nghiệm.....	37
Hình 3.2. Số lượng tế bào được phân tích bằng Cell cycle App của kính hiển vi huỳnh quang Cytell.	38
Hình 3.3. Giá trị OD của tế bào 3T3 ở hai nhóm thí nghiệm..	39
Hình 3.4. Biểu đồ thể hiện diện tích nhân giữa hai nhóm tế bào trong thời gian khảo sát.....	41
Hình 3.5. Biểu đồ thể hiện giá trị hình dạng nhân tế bào của nhóm đối chứng và nhóm SMG qua các thời gian khảo sát.....	41
Hình 3.6. Biểu đồ thể hiện phần trăm số lượng tế bào qua các pha trong các khoảng thời gian khảo sát.....	44
Hình 3.7. Sự biểu hiện các protein liên quan đến chu kỳ tế bào 3T3 ở hai nhóm thí nghiệm được phân tích bằng Western blot..	46
Hình 3.8 Biểu đồ thể hiện phần trăm tỷ lệ tế bào sống và tế bào chết- Apoptosis trong các khoảng thời gian khảo sát.....	48
Hình 3.9. Phân tích apoptosis bằng flow cytometry	50

DANH MỤC CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

CDK	Cyclin-dependent kinases
DNA	Deoxyribonucleic acid
HMSCs	Human mesenchymal stem cells
NASA	National Aeronautics and Space Administration
RB	Retinoblastoma
SMG	Simulated microgravity
UV	Ultraviolet
3T3	Dòng tế bào nguyên bào sợi phôi chuột
OD	Optical Density
CDC	Cell Division Cycle
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
FBS	Fetal bovine serum
MDM2	Mouse double minute 2
MEFs	Mouse embryonic Fibroblasts
NASA	National Aeronautics and Space Administration
PBS	Phosphate buffered saline
RWV	Rotating wall vessel
taSMG	Vi trọng lực mô phỏng theo trung bình thời gian
ĐC	Nhóm đối chứng
RPM	Random positioning machine
TBST	Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20

III

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Một số thiết bị chính sử dụng trong đề tài.....	21
Bảng 2.2. Một số dụng cụ chính sử dụng trong đề tài	22
Bảng 2.3. Hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng (Gravite)	22
Bảng 2.4. Một số hóa chất chính trong đề tài	23
Bảng 3.1. Tỷ lệ các pha tế bào sau cảm ứng SMG (%) ở các khoảng thời gian khảo sát	45

MỞ ĐẦU

Trọng lực đóng vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và phát triển của các sinh vật [1]. Các sinh vật sống trên Trái Đất đã tiến hóa và phát triển qua hàng nghìn năm, từ cấu trúc mô đến tế bào đến các đặc điểm hình thái để thích ứng với điều kiện sống môi trường [2]. Do đó, sự thay đổi trọng lực theo bất kỳ hướng nào cũng có thể dẫn đến những thay đổi đáng kể trong cơ thể [3]. Những tác động của vi trọng lực lên cơ thể con người có thể được nhìn thấy rõ ràng sau khi các phi hành gia trở về từ Trái đất.

Hiện nay, việc thực hiện các nghiên cứu về vi trọng lực trực tiếp ngoài không gian khá tốn kém. Do đó, để giảm thiểu chi phí cũng như để nghiên cứu sâu hơn các tác động của điều kiện vi trọng lực hay siêu trọng lực trên các sinh vật sống hay đối tượng sống trên Trái Đất được thực hiện dễ dàng hơn, các nhà khoa học đã phát minh ra các hệ thống mô phỏng vi trọng lực ở quy mô phòng thí nghiệm như mô hình buồng quay (RWV), mô hình 3D-Clinostat Gravity Controller Gravite, mô hình máy định vị ngẫu nhiên (RPM)... [4-7]

3T3 là dòng tế bào nguyên bào sợi phôi chuột thường được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh học tế bào, sinh học phân tử, và nghiên cứu ung thư, giúp cung cấp thông tin về các quá trình sinh lý và bệnh lý [8]. Tại Việt Nam, tình hình nghiên cứu về vi trọng lực còn khá hạn chế. Gần đây, nhóm nghiên cứu của tác giả Lê Thành Long tại Viện Sinh học Nhiệt đới cũng đã thực hiện khảo sát về những thay đổi hình thái của tế bào 3T3 trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng [8]. Tuy nhiên, nghiên cứu này vẫn chưa khảo sát được sự khác nhau giữa tế bào 3T3 khi nuôi cấy trong môi trường vi trọng lực trong thời gian dài. Vì vậy, đề tài "***Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng tăng sinh của tế bào 3T3 trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng***" được thực hiện bằng thiết bị mô phỏng môi trường vi trọng lực 3D-Clinostat nhằm khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng tăng sinh và sức sống của tế bào 3T3 trong môi trường vi trọng lực mô phỏng.

Mục tiêu nghiên cứu

Đánh giá sự ảnh hưởng của thời gian lên khả năng tăng sinh và sức sống của tế bào nguyên bào sợi chuột trong điều kiện nuôi cấy vi trọng lực.

Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy dưới điều kiện vi trọng lực mô phỏng lên sự tăng sinh của tế bào 3T3

Nội dung 2: Đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy dưới điều kiện vi trọng lực mô phỏng lên sức sống của tế bào 3T3

Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài

Đề tài cung cấp những kết quả giúp làm rõ sự ảnh hưởng thời gian nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực lên tế bào sống,

Góp phần là cơ sở khoa học, tài liệu tham khảo cho những nghiên cứu xa hơn về tế bào, mô, ...trong điều kiện vi trọng lực trong thời gian dài, từ đó giúp con người hiểu hơn về tác động của vi trọng lực lên cơ thể sống.

Những đóng góp của luận văn

Đề tài góp phần là cơ sở khoa học, tài liệu tham khảo cho những nghiên cứu xa hơn về tế bào, mô, ...trong điều kiện vi trọng lực trong thời gian dài.

Đưa ra được những đánh giá và so sánh về sự sống và sự tăng sinh của tế bào trong môi trường vi trọng lực ở các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau.

NỘI DUNG

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Sinh học không gian

1.1.1. Mục tiêu nghiên cứu của sinh học không gian

Trong quá trình đẩy mạnh việc khám phá vũ trụ, sinh học không gian đã trở thành một trong các lĩnh vực quan trọng. Các nghiên cứu sinh học không gian bao gồm nhiều lĩnh vực khác nhau, từ việc mô phỏng điều kiện không gian trên mặt đất để phân tích phản ứng của sinh vật đến việc thực hiện các thí nghiệm trong các phòng thí nghiệm không gian. Những thí nghiệm này tập trung vào việc nghiên cứu và quan sát sự điều chỉnh và khả năng thích nghi của sinh vật với điều kiện không gian, quá trình biến dưỡng, tăng trưởng và phát triển, khả năng đáp ứng với stress, chỉnh sửa tổn thương và bảo vệ trong điều kiện vi trọng lực, phóng xạ không gian ở các cấp độ sinh học từ phân tử đến cơ thể sinh vật. Từ đó làm tiền đề để đưa ra được những cách thức bảo vệ sức khỏe của phi hành gia, sinh học không gian nhằm đảm bảo sự an toàn và thành công trong các nhiệm vụ không gian dài hạn [1].

Sinh học không gian cơ bản (Fundamental Space Biology) là lĩnh vực nghiên cứu sinh học không gian, tập trung vào việc tìm hiểu các nguyên lý cơ bản và cơ chế sinh học khi sinh vật sống trong các điều kiện không gian [4,7]. Các mục tiêu nghiên cứu chính của sinh học không gian cơ bản bao gồm:

- Hiểu rõ tác động của vi trọng lực lên sinh học: Sử dụng trọng lực, vi trọng lực và các đặc tính khác của môi trường không gian để nghiên cứu và đánh giá sự tác động của môi trường không gian lên cơ thể sống, đặc biệt là trên con người.
- Thích nghi và phát triển trong môi trường không gian: nghiên cứu này giúp chúng ta chuẩn bị cho việc duy trì sự sống lâu dài trong các nhiệm vụ không gian dài hạn, đồng thời cung cấp thông tin cần thiết để cải thiện các biện pháp hỗ trợ sinh vật trong các chuyến bay vũ trụ.
- Hỗ trợ các hoạt động của NASA liên quan đến y sinh học: cung cấp các thông tin và dữ liệu cần thiết để hỗ trợ các nghiên cứu và hoạt động của NASA trong lĩnh vực y sinh học, bao gồm việc phát triển các công nghệ và phương pháp mới để bảo vệ sức khỏe của phi hành gia.

- Nghiên cứu về sinh học tiến hóa và nguồn gốc sự sống: nghiên cứu các câu hỏi về sự tiến hóa và nguồn gốc sự sống trong các môi trường khắc nghiệt, và liệu sự sống có thể tồn tại và phát triển ở những nơi khác ngoài Trái Đất.
- Ứng dụng vào cuộc sống trên Trái Đất: ứng dụng các kiến thức, đóng góp vào nền y học và sinh học trên Trái Đất để cải thiện vị thế quốc gia, giáo dục, chất lượng cuộc sống tại nơi đây.

1.1.2. Các lĩnh vực của sinh học không gian

Để đạt được các mục tiêu trong nghiên cứu sinh học không gian, cần phải hiểu rõ các yếu tố cơ bản ảnh hưởng đến chức năng và cấu trúc sinh học trong môi trường không gian. Cụ thể, cần xác định các lực như vi trọng lực và bức xạ vũ trụ, đồng thời nghiên cứu vai trò của các gen và cấu trúc tế bào trong việc cảm nhận và phản ứng với các yếu tố này. Việc này giúp hiểu rõ hơn về mức độ ảnh hưởng của trọng lực và bức xạ đến các thành phần sinh học như tế bào, cơ quan, và toàn cơ thể. Cũng cần nghiên cứu cách các loài động vật, thực vật và các giới sinh vật khác cảm ứng và thích nghi với trọng lực, cũng như vai trò của trọng lực trong việc hình thành cấu trúc, chức năng và tương tác của hệ sinh thái hành tinh trong không gian [7]. Những nghiên cứu trên các loài sinh vật đa dạng giúp cung cấp cái nhìn sâu sắc về cách thức các sinh vật khác nhau phản ứng và thích nghi với môi trường không gian, từ đó hỗ trợ các nhiệm vụ không gian dài hạn và các ứng dụng trong sinh học trên Trái Đất. Những nghiên cứu này thường được thực hiện trong các điều kiện mô phỏng trọng lực từ vi trọng lực cho đến siêu trọng lực [1, 2]. Các loài sinh vật như vi khuẩn, ruồi giấm, nấm men, các loài gặm nhấm, và các loại thực vật như cây cải, lúa mì, đậu xanh, v.v. được lựa chọn để thực hiện các thí nghiệm này.

Sinh học không gian cơ bản bao gồm nhiều lĩnh vực nghiên cứu khác nhau, mỗi lĩnh vực tập trung vào một khía cạnh cụ thể của ảnh hưởng không gian đối với sinh vật:

- Cấu trúc phân tử và tương tác vật lý: lĩnh vực này tập trung vào việc nghiên cứu các ảnh hưởng vật lý của môi trường không gian đối với tế bào và sinh vật.
- Sinh học phân tử và tế bào: nghiên cứu này nhằm hiểu rõ các cơ chế phân tử liên quan đến sự phản ứng của tế bào và sinh vật với điều kiện không gian, từ đó giúp giải mã các thay đổi sinh học khi thiếu trọng lực.

- Sinh học phát triển: nghiên cứu sự ảnh hưởng của trọng lực đối với sự phát triển và chức năng sinh lý, cũng như khả năng sinh sản và phát triển của phôi thai. Nghiên cứu cũng xem xét cơ chế tác động lên các thế hệ tiếp theo, bao gồm theo dõi hành vi, tuổi thọ và sự lão hóa của sinh vật.
- Sinh học tiến hóa: nghiên cứu nhằm hiểu rõ các cơ chế tiến hóa trong môi trường không gian và khả năng thích nghi của sinh vật đối với các điều kiện khắc nghiệt.
- Sinh thái học trọng lực: tìm hiểu ảnh hưởng của trọng lực lên cấu trúc, chức năng và sự ổn định của hệ sinh thái bao gồm sự tương tác giữa các loài, sự tuần hoàn chất dinh dưỡng, và cách mà các hệ sinh thái có thể được duy trì trong không gian.

1.2. Vi trọng lực

1.2.1. Khái niệm vi trọng lực

Trong không gian, phi hành gia không thể di chuyển theo cách thông thường như trên Trái Đất; thay vào đó, họ lơ lửng trong không gian do hiện tượng vi trọng lực (microgravity). Vi trọng lực là tình trạng mà trọng lực tác động lên một vật rất nhỏ (từ $10^{-3}G$ đến $10^{-6}G$, nghĩa là khoảng 10^{-3} đến 10^{-6} trọng lực bình thường) hoặc theo định nghĩa của Cơ quan Hàng không và Vũ trụ Hoa Kỳ NASA, vi trọng lực là điều kiện mà trong đó vật thể trở nên gần như mất trọng lực [3]. Từ “vi” trong vi trọng lực có nghĩa là rất nhỏ. Vi trọng lực xảy ra khi lực kéo của trọng lực trở nên yếu đi. Trong môi trường này, các vật nặng có thể được di chuyển chỉ bằng một ngón tay do trọng lực yếu đi đáng kể.

Vi trọng lực ảnh hưởng đến cơ thể con người theo nhiều cách [4]. Cơ và xương có thể trở nên yếu hơn nếu không có trọng lực [5]. Các phi hành gia sống trên trạm vũ trụ hay du hành đến sao Hỏa sẽ phải dành nhiều tháng trong môi trường vi trọng lực. Các nghiên cứu về tác động của vi trọng lực là cần thiết để giữ cho các phi hành gia an toàn và khỏe mạnh. Ngoài ra, nhiều hiện tượng sẽ diễn ra khác đi trong môi trường vi trọng lực. Không có lực hấp dẫn, ngọn lửa sẽ trở nên tròn hơn, tinh thể phát triển tốt hơn [6], hình dạng của chúng sẽ hoàn hảo hơn. Do đó, có thể thấy điều kiện vi trọng lực sẽ giúp con người thực hiện được nhiều nghiên cứu khó có thể thực hiện được khi ở trên Trái Đất.

1.2.2. Vi trọng lực mô phỏng

Hiện nay có nhiều thiết bị được sử dụng có thể mô phỏng các trạng thái trọng lực khác nhau. Đầu tiên là clinostat cổ điển (là một thiết bị sử dụng quá trình xoay vòng để chống lại tác động của trọng lực), thiết bị này được phát triển đầu tiên vào cuối thế kỉ 19 bởi nhà khoa học Julius von Sachs [7]. Từ đó tới nay, nhiều thiết bị khác đã được tạo ra nhằm mô phỏng trạng thái không trọng lực, chúng có thể phân tán ngẫu nhiên sự định hướng của trọng lực Trái Đất lên đối tượng nghiên cứu, mà đối tượng này không cảm nhận được sự gia tăng trọng lực (trong các hệ thống clinostat) hay sự bù đắp trọng lực (trong hệ thống nâng từ) [8]. Ngoài ra, một hệ thống khác mô phỏng trạng thái không trọng lực là “tháp rơi” (drop-tower), hệ thống này cung cấp các điều kiện rơi tự do thật trên mặt đất, nhưng quá trình này chỉ diễn ra trong vài giây, nó phụ thuộc vào khối lượng và kích cỡ của đối tượng nghiên cứu [9]. Tuy nhiên các hệ thống mô phỏng trên không thể cung cấp điều kiện không trọng lực thật bởi chúng luôn bị tác động bởi yếu tố khác liên quan đến kĩ thuật như sự tăng gia tốc ly tâm, sự rung lắc, hay sự phân tán các lực.

Một hệ thống mô phỏng không thể làm giảm vector trọng lực Trái Đất, nhưng nó có thể thay đổi ảnh hưởng của vector trọng lực lên một hệ thống sinh học [10]. Do đó, một máy mô phỏng không thể tạo ra vi trọng lực thật sự, thay vào đó nó có khả năng cung cấp “điều kiện không trọng lực chức năng” (functional weightlessness). Để tránh sự nhầm lẫn và cung cấp một nền tảng cơ bản về vi trọng lực, thuật ngữ “vi trọng lực mô phỏng” (simulated microgravity - SMG) được áp dụng đối với các thí nghiệm sử dụng hệ thống mô phỏng, bao gồm các thông số tạo ra sự mô phỏng (kích thước và hình dạng buồng chứa mẫu, chế độ hoạt động, tốc độ quay hay đường kính ống) [11]. Ngoài ra, thuật ngữ “vi trọng lực” còn được sử dụng trong các điều kiện vi trọng lực thực sự trên trạm ISS (International Space Station) hay các chuyến bay parabol. Hơn nữa, thuật ngữ “vi trọng lực” còn được sử dụng để chỉ các mức độ G khác nhau, từ khoảng 10^{-2} G cho tới 10^{-6} G [12].

1.2.3. Các hệ thống mô phỏng vi trọng lực.

Các thí nghiệm trong môi trường vi trọng lực để thực hiện có thể được thực hiện thông qua các chuyến bay vũ trụ. Việc tiếp xúc với môi trường vi trọng lực đã được chứng minh là có gây ảnh hưởng xấu đến sinh vật. Tác dụng phụ

đáng kể của việc không trọng lượng trong thời gian dài bao gồm các triệu chứng teo cơ và suy xương [13], thay đổi sản xuất hồng cầu [14] và thay đổi hệ thống miễn dịch [15]. Hiện tượng vi trọng lực làm giảm khối lượng cơ thể, kéo dài telomere, mất ổn định bộ gen, thay đổi quá trình trao đổi chất [16]. Tuy nhiên, việc thực hiện các thí nghiệm này gặp rất nhiều khó khăn do cơ hội bay rất khan hiếm và chi phí phát triển trang thiết bị rất cao [17]. Từ đó, các hệ thống mô phỏng vi trọng lực đã được phát triển và áp dụng nhằm khảo sát và nghiên cứu những thay đổi về cấu trúc, chức năng, sự tăng sinh của các tế bào động vật. Chúng được sử dụng để đánh giá mức độ nhạy cảm với trọng lực của hệ thống sinh học. Cho đến nay, hệ thống 3D-Clinostat và máy định vị ngẫu nhiên (RPM) là hệ thống phổ biến nhất được sử dụng cho nghiên cứu tế bào động vật [17-19].

1.2.3.1. 3D-Clinostat

Vi trọng lực mô phỏng theo trung bình thời gian (taSMG) được đề xuất như một phương pháp thay thế và đã được xác thực về hiệu quả sinh học với trạm không gian ISS. Những nghiên cứu trước đây trên các dòng tế bào khác nhau đã cho thấy kết quả tương tự giữa taSMG và vi trọng lực thực. taSMG thế hệ kế tiếp được gọi là 3D-Clinostat. Thiết bị này gồm có hai khung với trục quay vuông góc với nhau được truyền động bằng hai motor với vận tốc cố định. Đối tượng thí nghiệm được đặt vào khung trong, là nơi tạo ra vi trọng lực mô phỏng trung bình theo thời gian (Xem Hình 1.1).

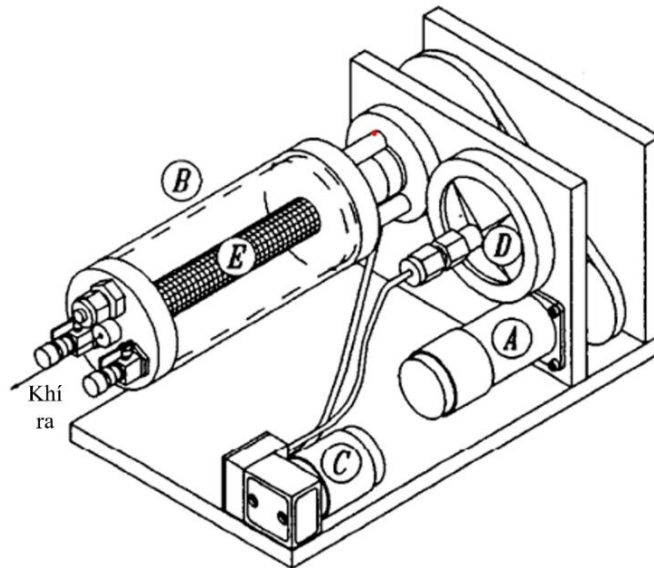


Hình 1.1. Mô hình 3D-Clinostat Gravity Controller Gravite (Cơ quan Hàng không và Vũ trụ Hoa Kỳ - NASA)

3D-Clinostat có thể gây ra những thay đổi trong đường truyền tín hiệu tế bào, những thay đổi sinh học trong chuyển hóa tế bào dưới ảnh hưởng của trọng lực nhất định [19]. Các nghiên cứu ứng dụng hệ thống 3D-Clinostat ngày càng được sử dụng nhiều hơn, điển hình là nghiên cứu của Kim và cộng sự năm 2017 trên dòng tế bào lympho, các nghiên cứu của Furukawa và cộng sự, Otsuka và cộng sự, Imura và cộng sự năm 2018 trên các dòng tế bào myoblast chuột và tế bào gốc trung mô tủy xương [16, 20-22].

1.2.3.2. Buồng quay

Buồng quay (Rotating wall vessel, viết tắt RWV) hay hệ thống bioreactor quay (được phát triển bởi NASA) được thiết kế để nuôi cấy tế bào và các sinh vật thủy sinh như trứng hay phôi cá [23, 24]. Buồng quay thực hiện chức năng dựa trên hai nguyên tắc quan trọng: bộ phận quay và màng silicone cung cấp oxy.). Khi buồng quay, chất lỏng bên trong quay theo đến khi cùng vận tốc với tốc độ của buồng quay. Lúc này, môi trường nuôi cấy quay quanh trục ngang vuông góc với trọng lực, tế bào sẽ lơ lửng trong môi trường nuôi cấy. Buồng quay ngang này giúp mô phỏng được một số đặc điểm của vi trọng lực, giảm tối thiểu nhiễu loạn gây ra bởi cánh khuấy thông thường [25]. (Xem Hình 1.3)



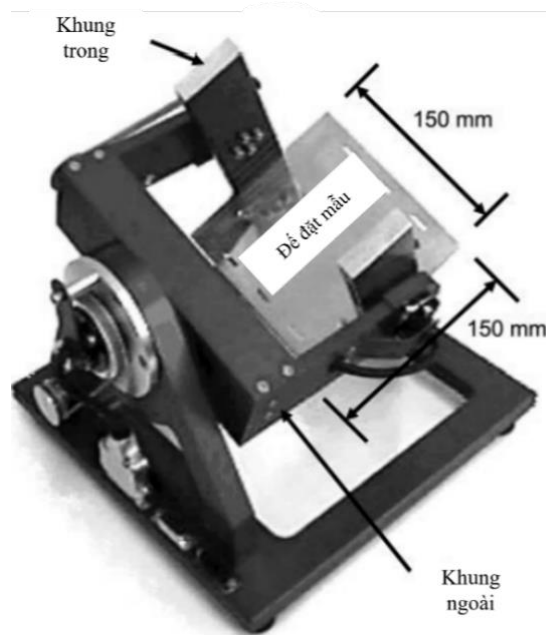
Hình 1.2. Mô hình buồng quay (RWV). A: Motor, B: Buồng quay, C: bơm khí, D: Màng lọc 0.22 μ m, E: màng cung cấp oxy [25]

Buồng quay tế bào phù hợp với các nghiên cứu trên các sinh vật thủy sinh hoặc tế bào nuôi cấy huyền phù. Các nghiên cứu trên động vật thủy sinh áp dụng hệ thống này bao gồm nghiên cứu của Moorman và cộng sự năm 1999 [24], Li

và cộng sự năm 2011 trên phôi cá ngựa vằn [23] nghiên cứu của Brungs và cộng sự năm 2011 trên phôi cá kiếm [25]. Ứng dụng của buồng quay trong nuôi cấy tế bào động vật ít hơn, tuy nhiên vẫn có một số nghiên cứu được thực hiện như nghiên cứu của Granet và cộng sự năm 1998 trên tế bào xương, nghiên cứu của Radtke và cộng sự năm 2012 trên tế bào biểu mô [26, 27].

1.2.3.3. Máy định vị ngẫu nhiên

Máy định vị ngẫu nhiên (Random positioning machine – RPM) là thiết bị tạo ra liên tục sự thay đổi ngẫu nhiên vector định hướng của trọng lực lên mẫu thí nghiệm (mẫu sinh học). Nhờ đó máy định vị ngẫu nhiên có thể sinh ra hiệu ứng tương đương với vi trọng lực thực do sự thay đổi liên tục của vector trọng lực lên mẫu nhanh hơn so với thời gian đáp ứng với trọng lực cả mẫu vật [28]. Cấu tạo gồm có hai khung quay độc lập với nhau với tốc độ ngẫu nhiên, khung ngoài quay chủ động còn khung trong quay thụ động, do đó liên tục tạo ra vị trí tác động của vector trọng lực ngẫu nhiên lên mẫu thí nghiệm (Xem Hình 1.4).



Hình 1.3. Mô hình máy định vị ngẫu nhiên (RPM) [28]

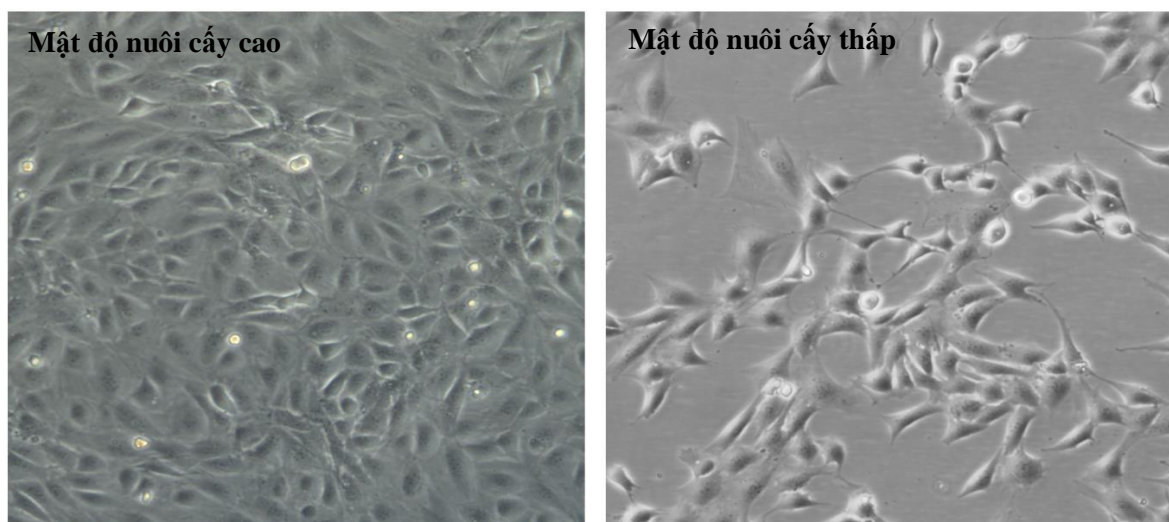
Hệ thống máy RPM chủ yếu được sử dụng trên các đối tượng tế bào động vật có vú. Năm 2013, Aleshcheva và cộng sự đã sử dụng hệ thống này để nghiên cứu các tác động của vi trọng lực lên nguyên bào xương [29]. Các nhóm nghiên cứu của Sokolovskaya và Benavides Damm vào năm 2014 đã tạo môi trường vi trọng lực mô phỏng bằng hệ thống RMP để nghiên cứu trên dòng tế bào nội mô người và nguyên bào cơ vân chuột [30, 31]. Năm 2016, Cazzaniga và cộng sự

cũng sử dụng hệ thống này để thí nghiệm lên tế bào gốc xương [32]. Tuy nhiên, hệ thống RMP vẫn chưa được ứng dụng nhiều do cơ chế vận hành, cũng như cách đặt mẫu trong hệ thống để cho các lực phân tán đồng đều vẫn cần được nghiên cứu và phát triển thêm

1.3. Tế bào 3T3

Tế bào 3T3 là dòng tế bào của nguyên bào sợi phôi chuột. Dòng tế bào 3T3 ban đầu (3T3-*Swiss albino*) được phát triển vào năm 1962 bởi hai nhà khoa học lúc đó đang làm việc tại Khoa Bệnh lý của Trường Y thuộc Đại học New York, George Todaro và Howard Green. Todaro và Green ban đầu lấy tế bào 3T3 từ mô phôi chuột *Swiss albino*. Sau đó, với tư cách là nhà nghiên cứu chính tại Viện Ung thư Quốc gia ở Bethesda, Maryland, Todaro đã lặp lại quy trình phân lập từ phôi chuột NIH Swiss với các sinh viên của mình và thành lập dòng tế bào NIH-3T3 [33].

Tế bào nguyên bào sợi chuột 3T3 mang đặc điểm của tế bào nguyên bào sợi, tế bào bám dính, hình thoi hoặc chữ nhật, có nhân dẹt hình bầu dục [34, 35]. Một trong những đặc điểm nổi bật của tế bào 3T3 là khả năng thích nghi về mặt hình thái, thay đổi đáng kể theo mật độ (độ phủ) tế bào khi nuôi cấy [34].



Hình 1.4. Tế bào 3T3 khi ở mật độ nuôi cấy cao và mật độ nuôi cấy thấp [6]

3T3 là dòng tế bào nguyên bào sợi phôi chuột thường được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh học và y tế cho nhiều mục đích khác nhau, bao gồm nghiên cứu hành vi của tế bào (như tăng trưởng, phân chia và biệt hóa), hiểu về sinh học ung thư và cơ chế chuyển đổi tế bào, nghiên cứu biểu hiện và điều hòa gen, và khám phá và phát triển thuốc. Do đặc tính dễ nuôi cấy và chuyển gen

3T3 là một trong các dòng tế bào lý tưởng để nghiên cứu tác động của việc biểu hiện quá mức hoặc làm im lặng gen [34, 36, 37].

Bảng 1. Một số nghiên cứu về sự tăng sinh của tế bào 3T3 hiện nay

Tên tác giả	Tên nghiên cứu	TLTK
GU, Jieyu, et al.	Glycopolymer-grafted nanoparticles as glycosaminoglycan mimics with cell proliferation and anti-tumor metastasis activities	[38]
MORI, Masaya, et al.	Desert Hedgehog Down-regulation Mediates Inhibition of Proliferation by γ -Glutamylcyclotransferase Knockdown in Murine Glioblastoma Stem Cells	[39]
Jaffal, Sahar	Effects of Pgf2 α On P-Erk1/2 Mapk Activation, Proliferation and Formation of Trans-Endothelial Tunnels in Swiss 3t3 Fibroblast Cells	[40]
LE, Khanh-Thien, et al.	Facilely preparing carboxymethyl chitosan/hydroxyethyl cellulose hydrogel films for protective and sustained release of fibroblast growth factor 2 to accelerate dermal tissue repair	[41]
Hoang Nghia Son, et al	Effects of simulated microgravity on the morphology of mouse embryonic fibroblasts (MEFs)	[42]
TRAN, Minh Thi, et al.	Morphological Changes of 3T3 Cells under Simulated Microgravity	[8]

1.4. Sự sinh trưởng của tế bào

1.4.1. Sự tăng sinh tế bào

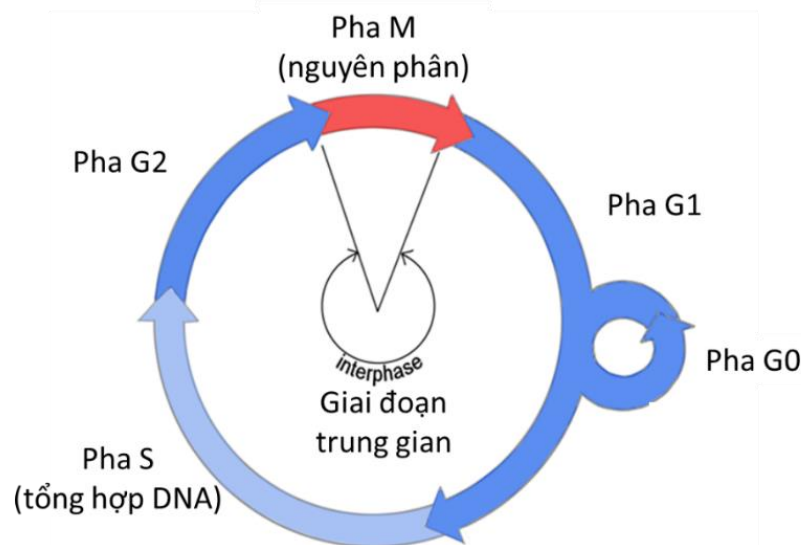
Sinh trưởng và phát triển là quá trình không thể thiếu và diễn ra liên tục ở mọi sinh vật trên hành tinh. Quá trình này dựa vào sự tăng trưởng và phân chia liên tục của các tế bào, hay còn gọi là sự phát triển và tăng sinh tế bào. Các tế bào có khả năng thực hiện các chức năng chuyên biệt và sinh sản ra các thế hệ tế bào mới. Trong quá trình sinh sản, phân chia tế bào, hàng loạt các quá trình sinh hoá nội bào diễn ra, mục đích nhằm duy trì sự tồn tại và sinh trưởng, phát triển của sinh vật [43]. Sự sinh trưởng của tế bào được chia thành các giai đoạn gọi là chu kỳ tế bào [44].

1.4.2. Chu kỳ tế bào

Chu kỳ tế bào, hay chu kỳ phân chia tế bào, là chuỗi các giai đoạn mà một tế bào trải qua để phân chia thành hai tế bào con (Hình 1.5). Các giai đoạn này bao gồm quá trình tự sao chép DNA và các bào quan, sau đó là phân tách tế bào chất và các thành phần khác thành hai tế bào con thông qua quá trình phân chia tế bào [44].

Chu kỳ tế bào ở tế bào nhân thực được chia thành bốn giai đoạn chính: pha G1, pha S (tổng hợp), pha G2 và pha M (bao gồm nguyên phân và phân bào).

Pha M gồm hai quá trình gắn bó chặt chẽ: nguyên phân và giảm phân, trong đó nhân và tế bào phân chia thành hai tế bào con. Phân chia tế bào chỉ chiếm khoảng 5% vòng đời của mỗi tế bào, trong khi 95% còn lại là giai đoạn trung gian (interphase), bao gồm các pha G1, pha S và pha G2. Ngoài ra, một số tế bào đặc thù có thể đi vào trạng thái không hoạt động gọi là pha G0, nơi tế bào ngừng phân chia tạm thời hoặc vĩnh viễn [44].



Hình 1.5. Chu kỳ tế bào

Giai đoạn trung gian: Là một chuỗi các thay đổi diễn ra trong một tế bào mới được hình thành và nhân của nó trước khi nó có khả năng phân chia trở lại. Đây cũng được gọi là giai đoạn chuẩn bị hoặc giai đoạn trước nguyên phân (intermitosis).

Pha G1 được biết đến như là giai đoạn tăng trưởng đầu tiên hay khoảng nghỉ sau nguyên phân của tế bào. Đây là pha đầu tiên của giai đoạn trung gian, kéo

dài từ cuối pha M trước đó cho đến khi bắt đầu tổng hợp DNA. Pha G1 cũng được gọi là giai đoạn tăng trưởng. Trong giai đoạn này, các hoạt động sinh tổng hợp của tế bào được tăng tốc sau khi bị chậm lại đáng kể trong pha M. Trong pha G1, tế bào có ba lựa chọn: tiếp tục chu kỳ tế bào và đi vào pha S, ngừng chu kỳ tế bào và đi vào pha G0 để bắt đầu quá trình biệt hóa, hoặc dừng lại ở pha G1 và có thể đi vào G0 hoặc bắt đầu chu kỳ tế bào sau đó. Để chuyển sang pha S, tế bào phải đi qua một điểm kiểm tra (checkpoint). Điểm kiểm tra này còn được gọi là điểm hạn chế hay điểm bắt đầu, và được điều hòa bởi các protein G1/S cyclins. Thông tin truyền qua điểm kiểm tra G1 sẽ thúc đẩy tế bào phân chia [45].

Quá trình tổng hợp DNA của tế bào được diễn ra ở pha S. Khi quá trình này hoàn thành, NST được sao chép và lượng DNA trong tế bào được nhân đôi, mặc dù số lượng nhiễm sắc thể không thay đổi. Tuy nhiên, trong giai đoạn này khả năng phiên mã RNA và tổng hợp protein rất thấp, ngoại trừ sản xuất protein histone chủ yếu xảy ra trong pha S [46, 47].

Pha G2 xảy ra sau khi sao chép DNA và là giai đoạn tổng hợp protein và tăng trưởng tế bào nhanh chóng để chuẩn bị cho nguyên phân. Trong giai đoạn này, các vi ống bắt đầu tổ chức lại để tạo thành thoi vô sắc. Trước khi tiến hành giai đoạn phân bào, các tế bào phải được kiểm tra tại điểm kiểm tra G2 xem có bất kỳ tổn thương DNA nào trong nhiễm sắc thể hay không. Điểm kiểm tra G2 chủ yếu được điều chỉnh bởi protein khối u p53. Nếu DNA bị hỏng, p53 sẽ sửa chữa DNA hoặc kích hoạt quá trình tự hủy của tế bào (apoptosis). Nếu p53 bị rối loạn chức năng hoặc bị đột biến, các tế bào có DNA bị hỏng có thể tiếp tục qua chu kỳ tế bào, dẫn đến sự phát triển của ung thư [25].

Nguyên phân và phân bào: Bước vào quá trình nguyên phân, một tế bào phân chia các NST trong nhân thành hai NST giống hệt nhau [45]. Trong quá trình nguyên phân, các cặp NST ngưng tụ và gắn vào các thoi vô sắc. Những thoi vô sắc này kéo các NST chị em sang các mặt đối diện của tế bào [46]. Quá trình phân chia hạt nhân diễn ra trong pha M tương đối ngắn nhưng khá phức tạp và được quy định chặt chẽ. Các chuỗi sự kiện diễn ra trong quá trình này được chia làm năm giai đoạn nhỏ và xảy ra tuần tự: 18 prophase (kỳ đầu), prometaphase (kỳ trước giữa), metaphase (kỳ giữa), anaphase (kỳ sau), telophase (kỳ cuối).

Quá trình phân bào xảy ra ngay sau quá trình nguyên phân. Quá trình này bao gồm phân chia nhân, tế bào chất, phân chia các bào quan và màng tế bào thành hai tế bào chứa các phần gần bằng nhau. Nguyên phân và phân bào cùng nhau xác định sự phân chia tế bào mẹ thành hai tế bào con, giống hệt nhau về mặt di truyền và với tế bào mẹ. Quá trình này chiếm khoảng 10% thời lượng chu kỳ tế bào. (3). Pha nghỉ (G0) Pha G0 là giai đoạn nghỉ trong đó tế bào đã rời khỏi chu kỳ và đã ngừng phân chia. Chu kỳ tế bào bắt đầu với giai đoạn này. Các tế bào không tăng sinh (không phân chia) trong sinh vật nhân thực đa bào thường đi vào trạng thái G0 không hoạt động từ G1 và có thể vẫn hoạt động trong thời gian dài, có thể là vô thời hạn (thường là trường hợp đối với tế bào thần kinh). Một số tế bào bước vào giai đoạn G0 bán vĩnh viễn và được coi là sau giảm phân, ví dụ, một số tế bào gan, thận và dạ dày. Nhiều tế bào không vào được pha G0 và tiếp tục phân chia trong suốt cuộc đời của sinh vật, ví dụ, các tế bào biểu mô.

Từ ‘hậu phân bào’ đôi khi được sử dụng để chỉ cả tế bào không hoạt động và tế bào. Lão hóa tế bào xảy ra để đáp ứng với tổn thương DNA và căng thẳng bên ngoài và đưa và giữ các tế bào ở tại pha G1. Lão hóa tế bào có thể làm cho các tế bào ở các thế hệ sau không thể sống được; là một sự thay thế sinh hóa cho sự tự hủy của một tế bào bị hư hỏng bởi apoptosis

Quá trình chuyển giao giữa các giai đoạn của chu kỳ tế bào được kiểm soát bởi một bộ máy điều hòa được bảo tồn, không chỉ điều phối các giai đoạn của chu kỳ tế bào mà còn liên kết chu kỳ tế bào với các tín hiệu ngoại bào nhằm kiểm soát sự tăng sinh tế bào [44].

1.4.3. Các yếu tố điều hòa chu kỳ tế bào

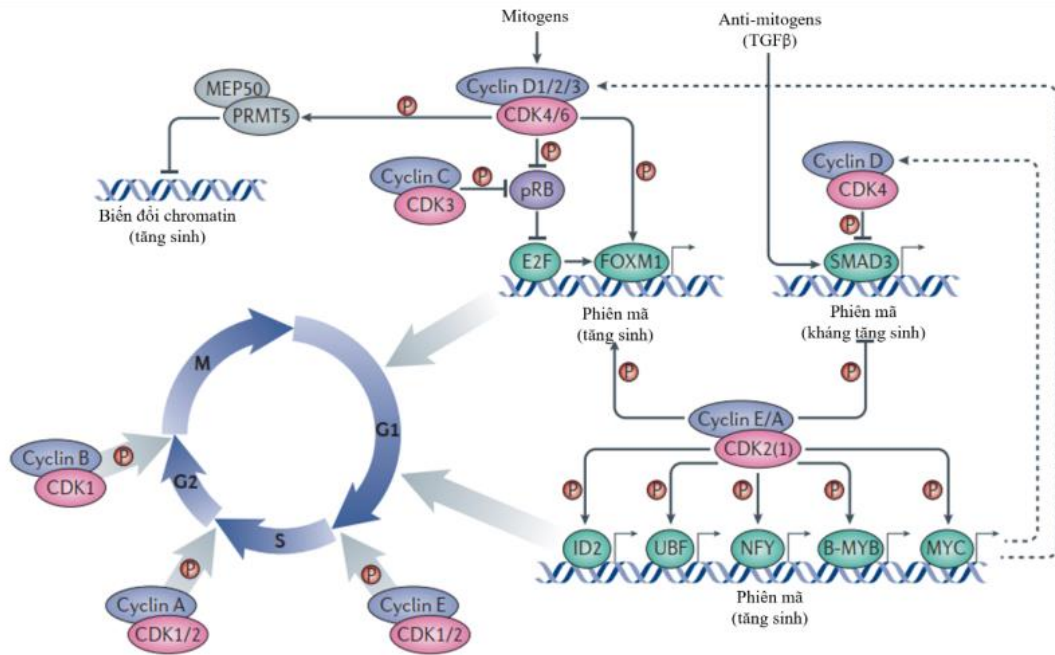
Mỗi giai đoạn của chu trình tế bào được quản lý chặt chẽ bởi các điểm kiểm tra quan trọng, được đặt gần cuối pha G1, tại giai đoạn chuyển tiếp G2/M và gần cuối giai đoạn metaphase trong quá trình nguyên phân (pha M). Các điểm kiểm tra này là cơ chế giám sát đảm bảo rằng các tế bào con được tạo ra là bản sao chính xác của tế bào mẹ với số lượng nhiễm sắc thể đúng và không có đột biến. Tại điểm kiểm tra G1, các điều kiện cần thiết cho sự tiến triển trong chu kỳ tế bào được đánh giá. Tế bào thường vượt qua điểm kiểm tra này nếu có kích thước phù hợp, đủ năng lượng và không có DNA bị hỏng. Điểm kiểm tra G2 chủ yếu đảm bảo rằng việc sao chép tất cả các nhiễm sắc thể đã hoàn tất và không có đột

biến hoặc tổn thương DNA chưa được sửa chữa. Đồng thời, kích thước tế bào và khả năng dự trữ protein cũng được kiểm tra tại điểm kiểm tra này. Điểm kiểm tra thoi vô sắc/M đảm bảo rằng tất cả các nhiễm sắc thể chị em đã gắn đúng vào thoi vô sắc và mỗi tế bào có số lượng nhiễm sắc thể chính xác [48].

Tế bào bình thường phụ thuộc vào kích thích ngoại bào (yếu tố phân chia hoặc nhân tố tăng trưởng) để đưa tế bào ra khỏi pha G0 vào G1 sớm. Tế bào đáp ứng với kích thích bên ngoài, tương tác thông qua hoạt động phosphoryl hóa thác đổ nội bào, bởi sự tăng điều hòa biểu hiện của kinase phụ thuộc cyclin (CDK) [49]. Cyclin liên kết với CDK thực hiện chức năng suốt các giai đoạn khác nhau trong chu kỳ tế bào. Để đáp ứng với các tín hiệu tăng trưởng hoặc phân chia, tế bào ra khỏi pha G0 và qua pha G1. Khi không có tín hiệu phân bào, tế bào có thể trải qua quá trình biệt hóa, apoptosis, hoặc đi vào lại pha G0. Chu kỳ bắt đầu ở G1 với sự tăng biểu hiện của cyclin D (D1, D2, D3). Cyclin D liên kết với CDK4 và CDK6, sự hình thành phức hợp cyclin / CDK dẫn đến quá trình phosphoryl hóa và hoạt hóa các CDK. Sau đó, các CDK được kích hoạt sẽ phosphoryl hóa protein retinoblastoma (RB). Protein RB có vai trò quan trọng trong việc điều hòa sự tiến triển của G1 thông qua điểm giới hạn - trong trường hợp bị tổn thương DNA, chu kỳ tế bào có thể bị hoãn hoặc bị chặn đứng hoàn toàn.

❖ Cyclin-CDKs trong điều hòa chu kỳ tế bào

Điều hòa chu kỳ tế bào là một quá trình thiết yếu đảm bảo sự sống và cái chết của tế bào thông qua các cơ chế nhận diện và sửa chữa lỗi di truyền. cũng như ngăn ngừa sự phân bào không kiểm soát. Cyclins và CDKs (cyclin-dependent kinases) là hai nhóm phân tử đóng vai trò chính trong việc điều hòa chu kỳ tế bào [50]. CDK là một loại enzyme kinase chịu trách nhiệm phosphoryl hóa các protein đích, qua đó điều khiển hay kích thích các chức năng quan trọng trong chu kỳ tế bào và sắp xếp lại các cơ sở vật chất giúp tế bào chuyển sang pha tiếp theo của chu kỳ. Tuy nhiên, CDK chỉ hoạt động khi kết hợp với cyclin để tạo thành một phức hợp. Cyclin đóng vai trò như một yếu tố điều hòa, trong khi CDK là thành phần xúc tác. Sự kết hợp giữa cyclin và CDK thực hiện chức năng điều khiển suốt các giai đoạn khác nhau trong chu kỳ tế bào [51]. Các cyclin và Cdk đóng vai trò quan trọng trong việc phân chia tế bào, thúc đẩy sự phát triển tế bào và giữ các phần quan trọng trong tiến trình chu kỳ tế bào [50].



Hình 1.6. Vai trò của Cyclin và CDK trong chu kỳ tế bào [52]

Sự hình thành phức hợp Cyclin D-CDK4/6 trong đáp ứng với kích thích phân bào là điểm khởi đầu trong chu kỳ tế bào. Phức hợp này phosphoryl hóa và bất hoạt pRb, bằng cách này giải phóng sự ức chế của nó với các nhân tố phiên mã E2F. E2F kích thích sự biểu hiện của nhiều gen trong chu kỳ tế bào.

CDK6 là một thành viên thuộc họ CDKs, đóng vai trò quan trọng trong quá trình tiến triển pha G1 và chuyển giao pha S/G1 [53]. Trong chu kỳ tế bào, CDK4 và CDK6 kết hợp với Cyclin D để tạo ra các phức hợp thúc đẩy quá trình chuyển từ pha G1 sang pha S [54]. Sự chuyển đổi này đóng một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sự tăng sinh tế bào, bảo vệ tế bào khỏi tăng sinh mất kiểm soát bằng cách kích hoạt biểu hiện quá mức CDK6 [55]. Ức chế CDK4/6 gây ra sự suy giảm tăng sinh tế bào [53-55].

Cyclin A là một protein nắm vai trò khá quan trọng nhờ khả năng tác động đến nhiều giai đoạn trong chu kỳ tế bào [56]. Cyclin A có thể kích hoạt hai CDK khác nhau và hoạt động trong cả pha S và nguyên phân. Cyclin A có thể gắn kết và kích hoạt cả hai loại CDK riêng biệt là CDK1 và CDK2 [57]. Liên kết giữa Cyclin A và CDK1 cần thiết cho quá trình chuyển giao từ pha G2 sang pha M trong khi đó liên kết giữa Cyclin A và CDK2 kích hoạt tế bào đi vào pha S [52, 56-59]. Cyclin A ở người bao gồm hai loại là Cyclin A1, thường biểu hiện ở các tế bào gốc phôi và Cyclin A2, biểu hiện trong các tế bào soma [52, 59].

CDK2 là enzyme đóng vai trò thiết yếu trong quá trình tổng hợp DNA của chu kỳ tế bào [52, 60]. Ngoài liên kết với Cyclin A, CDK2 còn có thể gắn với Cyclin E và kích hoạt quá trình chuyển giao từ pha G1 sang pha S [60].

1.4.4. Sức sống của tế bào

Sức sống tế bào (hay còn gọi là hoạt động sống của tế bào) là khả năng của tế bào trong việc duy trì các chức năng sinh lý, bao gồm trao đổi chất, sinh sản, phản ứng với môi trường và tự phục hồi. Trong khi thay đổi số lượng tế bào là thước đo tuyệt đối về sự tăng sinh tế bào, hoạt động trao đổi chất lại là thước đo sức sống của tế bào.

Hoạt động trao đổi chất của tế bào bao gồm các phản ứng hóa học xảy ra trong tế bào sống, cho phép tế bào sản xuất năng lượng cần thiết cho sự sống còn và duy trì của chúng [61]. Hoạt động trao đổi chất của tế bào có liên quan chặt chẽ đến quá trình điều hòa sự chết theo chương trình của tế bào thông qua ty thể, đóng vai trò là nền tảng chung cho quá trình chuyển hóa và apoptosis [62]. Các tế bào không nhận đủ chất dinh dưỡng trước tiên sẽ làm giảm quá trình chuyển hóa sau đó sẽ đi vào pha nghỉ chu kỳ tế bào. Nếu quá trình chuyển hóa tế bào tiếp tục không đáp ứng đủ nhu cầu của tế bào, quá trình apoptosis nội sinh qua trung gian ty thể sẽ xảy ra [62]. Con đường apoptosis nội sinh gắn chặt với ty thể, vì công trình nghiên cứu quan trọng của Wang và các đồng nghiệp đã chỉ ra rằng quá trình kích hoạt con đường này phụ thuộc vào protein ty thể cytochrome c [63].

❖ Sự chết theo chương trình của tế bào

Sự chết của tế bào theo chương trình hay còn gọi là quá trình “Apoptosis”, quá trình chết của tế bào đã được lập trình sẵn (programmed cell death - PCD). Các quá trình phản ứng sinh hoá xảy ra làm thay đổi hình thái tế bào, làm tế bào biến dạng và chết. Hình dạng tế bào thay đổi như màng tế bào có nhiều chỗ phồng lên, nhiều vùng lõm vào và bị mất làm tế bào bị bất đối xứng. Đồng thời, tế bào bị co rút lại, nhân tế bào bị phân chia thành từng mảnh nhỏ, NST bị co lại và DNA trong nhiễm sắc thể bị cắt nhỏ thành nhiều đoạn khác nhau [64].

Apoptosis là một quá trình diễn ra một cách bình thường trong quá trình phát triển, và tăng trưởng tế bào. Apoptosis xảy ra như một cơ chế bảo vệ trong các phản ứng miễn dịch hoặc khi các tế bào bị tổn thương do các tác nhân độc hại. Quá trình apoptosis diễn ra theo trình tự và được kiểm soát một cách chặt

chế. Khi tế bào nhận được tín hiệu kích thích từ các yếu tố bên trong tế bào (stress) hoặc bên ngoài tế bào thông qua các thụ thể bề mặt, quá trình Apoptosis bắt đầu diễn ra. Quá trình này được đặc trưng bởi sự biến đổi hình thái của tế bào: Tế bào co rút, màng sinh chất phồng ra, phân mảnh DNA (karyorrhexis), ngưng tụ chromatin (pyknosis), nén chặt bào quan, phá vỡ nhân, tế bào chất bị phân mảnh hoặc ngưng tụ và hình thành các “thể apoptotic”. Mỗi thể apoptotic chứa các thành phần tế bào đã bị phân mảnh, bao gồm DNA, protein, và các bào quan [65]. Cuối cùng, các thể apoptotic được nhận diện và tiêu hóa bởi các tế bào miễn dịch hoặc tế bào lân cận, giúp loại bỏ chúng mà không gây ra phản ứng viêm [65, 66].

Số lượng tế bào apoptosis trong quần thể có thể được xác định hình thái tế bào bằng cách nhuộm các tế bào bằng thuốc nhuộm DNA huỳnh quang như Hoechst, DAPI và quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang, nhuộm Annexin V, hoặc kiểm tra sự hiện diện của caspase (là một protease được tạo ra trong tế bào dưới dạng cystein protease). Do đó những thay đổi về mặt hình thái nhân tế bào có liên quan rõ rệt trong quá trình apoptosis.

1.5. Những nghiên cứu về vi trọng lực lên sự tăng sinh tế bào

1.5.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước

Tế bào cần phải phân chia để phát triển, và sự phân chia tế bào là yếu tố thiết yếu cho sự tăng sinh tế bào. Vi trọng lực mô phỏng có thể ảnh hưởng đến sự tăng sinh tế bào theo nhiều cách khác nhau, tùy thuộc vào loại hệ thống mô phỏng và dòng tế bào được sử dụng. Nghiên cứu của Yuge và cộng sự đã quan sát thấy sự tăng sinh trong các tế bào gốc trung mô tủy xương người khi được đặt trong môi trường vi trọng lực tạo ra bởi hệ thống 3D-Clinostat [67]. Ngược lại, nghiên cứu gần đây của Ratushnyy và cộng sự không phát hiện sự khác biệt về sự tăng sinh giữa các tế bào trung mô có nguồn gốc từ mô mỡ trong nhóm đối chứng (1G) và nhóm vi trọng lực do máy định vị ngẫu nhiên (RPM) tạo ra [68].

Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng vi trọng lực có thể gây ức chế sự tăng sinh của nhiều dòng tế bào. Ví dụ, nghiên cứu của Touchstone và cộng sự năm 2019 cho thấy tế bào gốc trung mô chuột giảm sự tăng sinh khi được đặt trong điều kiện vi trọng lực tạo ra bởi hệ thống clinostat 1D [69]. Tương tự, các tế bào gốc tạo máu ở người cũng giảm khả năng tăng sinh trong điều kiện

vi trọng lực, theo bởi Plett và cộng sự [70]. Môi trường vi trọng lực mô phỏng từ trục quay trọng lực cũng cho thấy sự ức chế sự tăng sinh và biệt hóa của tế bào gốc trung mô tủy xương.

Dòng tế bào 3T3, một dòng tế bào của các nguyên bào sợi phôi chuột, thường được sử dụng để đánh giá mức độ phát triển phản ứng với sự thay đổi môi trường vì các đặc tính nhạy cảm của nó liên quan đến sự phát triển. Điều kiện SMG đã được chứng minh là làm giảm sự apoptosis trong các nguyên bào sợi thai của chuột [71]. Công trình của Yan et al. (2015) cho thấy SMG có thể thay đổi sự biểu hiện mRNA của các gen nhịp sinh học và tạo ra sự thay đổi trong biểu hiện Per1 và Per2, do đó làm thay đổi nhịp sinh học của tế bào 3T3 [72]. Vì các nguyên bào sợi rất nhạy cảm với SMG, Zhou et al. (2023) đã chỉ ra tầm quan trọng tiềm năng của con đường tín hiệu TGF- β 1/Smad3 trong việc kiểm soát quá trình làm lành vết thương [73]. Theo một nghiên cứu gần đây, các tác động chính của trọng lực thay đổi lên cấu trúc của các nguyên bào sợi và sự chậm trễ trong di chuyển của chúng bao gồm các thay đổi trong chức năng của các nguyên bào sợi liên quan đến quá trình làm lành vết thương [74].

1.5.2. Tình hình nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam hiện nay nghiên cứu về vi trọng lực còn khá hạn chế. Năm 2020, nhóm nghiên cứu của tác giả Lê Thành Long tại Viện Sinh học Nhiệt đới đã thực hiện khảo sát ảnh hưởng của vi trọng lực mô phỏng lên một số đối tượng tế bào động vật. Nhận thấy tác động của SMG lên hình thái nguyên bào sợi phôi chuột (MEFs), diện tích tế bào giảm so với đối chứng kèm theo giảm đường kính các bó sợi actin, cường độ nhân tăng trong khi hình dạng nhân không có sự thay đổi đáng kể, giảm tỉ lệ tế bào pha G0/G1 trong khi tế bào pha S và pha G2/M tăng [75]. Kết quả tương tự cũng thu được trên đối tượng tế bào gốc trung mô người (hMSCs), kèm theo sự ức chế tăng trưởng tế bào và giảm biểu hiện các gen liên quan chu kỳ tế bào [76, 77]. SMG làm giảm tăng sinh tế bào, giảm diện tích và cường độ nhân, tỷ lệ các pha tế bào thay đổi theo hướng bất giữ chu kỳ tế bào ở pha G0/G1, giảm điều hòa các gen liên quan tổng hợp khung xương tế bào [78, 79]. Năm 2023, nhóm tiếp thông qua các đặc điểm hình thái của tế bào và nhân, sự thay đổi của vi sợi và vi ống, và những thay đổi trong quá trình tiến triển chu kỳ tế bào. Nhận thấy SMG làm giảm diện tích nhân và hình dạng nhân và tăng đường kính tế bào 3T3, ngoài ra SMG đưa các tế bào 3T3 vào pha

ngiht bằng cách giảm các gen chính liên quan đến chu kỳ tế bào, điều này cũng ảnh hưởng đến sự hình thành các cấu trúc bộ khung tế bào như vi sợi và vi ống [80]. Nhóm nghiên cứu của tác giả Dương Tấn Nhựt ở Viện nghiên cứu khoa học Tây Nguyên có những đánh giá tác động của vi trọng lực mô phỏng (SMG) lên hình thái tế bào 3T3 với đối tượng thực vật. Qua đó nhận thấy SMG ức chế sinh trưởng và phát triển của rễ cây sâm Bồ Chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz), tuy nhiên làm tăng tỉ lệ nảy mầm và chuyển hóa các hợp chất thứ cấp như Coumarin, Saponin ở cây Diệp Hạ Châu (*Phyllanthus amarus*) [81, 82]. Năm 2024, Lê Thành Long và cộng sự tại Viện Sinh học Nhiệt đới cũng đã thực hiện khảo sát về những thay đổi về hình thái của tế bào 3T3 trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng [8]. Sự thay đổi mật độ, diễn tiến của chu kỳ tế bào và các yếu tố điều hòa chu kỳ trong thời gian dài vẫn chưa được làm rõ. Do đó, nghiên cứu hiện tại đánh giá ảnh hưởng của thời gian trong môi trường vi trọng lực mô phỏng đối với sự tăng sinh và sức sống của tế bào 3T3, đặc biệt là trong quá trình phát triển chu kỳ tế bào và biểu hiện của các protein điều hòa chu kỳ tế bào.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Dòng tế bào nguyên bào sợi chuột 3T3 được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu của đề tài. Dòng tế bào này được cung cấp bởi hãng ATCC (NIH/3T3-CRL-1658)

2.1.2. Dụng cụ và thiết bị

Các thiết bị và dụng cụ được sử dụng trong đề tài được liệt kê ở Bảng 2.1 và Bảng 2.2

Bảng 2.1. Một số thiết bị chính sử dụng trong đề tài

STT	Tên thiết bị	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
1	Kính hiển vi quang học	Meiji	Nhật
2	Máy ly tâm	Hettich	Đức
3	Tủ ấm 37oC nuôi tế bào	Sanyo	Nhật
4	Máy Vortex VX100	Labnet	Đức
5	Máy PCR	Agilent	Mỹ
6	Máy Realtime PCR Piko Thermo	Thermo Scientific	Mỹ
7	Tủ lạnh	Sanyo	Nhật
8	Máy chụp hình tế bào Cytell™	GE Healthcare	Mỹ
9	Hệ thống điện di Western blot	GE Healthcare	Mỹ
10	Flow cytometer	BD Bioscience	Mỹ
11	Tủ -80oC	Panasonic	Nhật
12	Tủ -30oC	Panasonic	Nhật
13	Bể ổn nhiệt	Memmert	Đức
14	Máy quang phổ GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader	Promega	Mỹ
15	Máy BD Accuri C6 flow cytometer	BD Biosciences	Mỹ
16	Hệ thống vi trọng lực mô phỏng 3D-Clinostat	Santa Clara, CA	Mỹ

17	Buồng đếm Neubauer	Hirschmann	Đức
----	--------------------	------------	-----


Bảng 2.2. Một số dụng cụ chính sử dụng trong đề tài



STT	Tên dụng cụ	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
1	Beaker (50 ml, 100, 250 ml)	Schott	Đức
2	Erlen (100 ml, 250 ml)	Schott	Đức
3	Ống ly tâm 15 ml	Corning	Mỹ
4	Micropipette (100-1000 μ l, 10-100 μ l, 5-50 μ l)	Nychiro	Nhật
5	Eppendorf (1500 và 2000 μ l)	Eppendorf	Đức
6	Đầu cân 20 μ l, 100 μ l, 1000 μ l	Eppendorf	Đức
7	Bình nuôi T25	Thermo Scientific	Mỹ
8	Đĩa 96 giếng	Thermo Scientific	Mỹ
9	Ống đông lạnh	Corning	Mỹ
10	Parafilm M PM996	Alcan	Mỹ

2.1.3. Hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng

Hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng Gravite® (As one international, Inc, Santa Clara, CA, Mỹ) là một thiết bị đa hướng để mô phỏng điều kiện vi trọng lực mô phỏng với khả năng theo dõi theo thời gian thực, bằng cách xoay hai trục có kiểm soát để tạo nên điều kiện vi trọng lực mô phỏng (Bảng 2.3)

Bảng 2.3. Hệ thống tạo vi trọng lực mô phỏng Gravite® (As one international, Inc, Santa Clara, CA, Mỹ)

Hình ảnh	Chức năng	Thông số kỹ thuật
	Hệ thống chính	Kích thước (RxSxC): 425x420x445 (mm) Nặng: 13,5Kg Nguồn cung cấp: 120V/60Hz

	<p>Hệ thống điều khiển</p>	<p>Cài đặt các thông số để điều khiển và hiển thị thông tin liên quan đến vòng quay của hệ thống chính.</p> <p>Gồm 4 chương trình:</p> <p>Chương trình A: x4 vòng/ phút</p> <p>Chương trình B: x3 vòng/ phút</p> <p>Chương trình C: x2 vòng/ phút</p> <p>Chương trình D: x 1 vòng / phút</p>
	<p>Bộ phận giữ mẫu</p>	<p>Các kiểu giữ mẫu:</p> <p>Kiểu A sử dụng cho 6 bình T25 mỗi bên</p> <p>Kiểu B sử dụng cho 2 bình T75 mỗi bên và đĩa nuôi cấy 96 giếng</p>

2.1.4. Hóa chất

Môi trường và hóa chất được sử dụng trong đề tài được liệt kê ở bảng 2.4.

Bảng 2.4. Một số hóa chất chính trong đề tài

STT	Tên hóa chất	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
1	DMEM/Ham's F-12 with L-Glutamine	Capricorn Scientific	Đức
2	Fetal bovine serum (FBS)	Capricorn Scientific	Đức
3	Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), 100x	Capricorn Scientific	Đức
4	WST-1 Assay Reagent - Cell Proliferation (ready to use)	Abcam	Đức
5	Phosphate buffered saline (PBS)	Capricorn Scientific	Đức
6	Triton™ X-100	Sigma-Aldrich	Mỹ
7	Hoechst 33342	Sigma-Aldrich	Đức
8	Optiblot LDS Sample Buffer	Abcam	Mỹ
9	Precast Gel SDS-PAGE 4-12 %	Abcam	Mỹ
10	Optiblot SDS Run Buffer	Abcam	Mỹ

11	Low Fluorescence Western Membrane (PVDF)	Abcam	Mỹ
12	10X Blocking Buffer	Abcam	Mỹ
13	Extra Thick Blot Paper	Biorad	Mỹ
14	AUTOMATIC X-RAY kit	Fujifilm	Fujifilm
15	Paraformandehyde 4%	Merk	Đức
16	Ethanol (cồn)	Merk	Đức
17	TBST	Abcam	Anh
18	Tris-HCl	Sigma-Aldrich	Mỹ
19	Tris base	Sigma-Aldrich	Mỹ
20	NaCl	Sigma-Aldrich	Mỹ
21	FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences	Mỹ
22	ECL Western Blotting Substrate Kit	Abcam	Anh
23	CL-Xposure Film	Thermo Scientific	Mỹ
24	Các kháng thể (Anti-Cyclin A1/A2 anti-Cyclin D1, anti-cdk2 , anti-Cdk4, anti-Cdk6, Anti-GAPDH và Goat Anti-Rabbit IgG)	Abcam	Mỹ

• **Cách pha hóa chất:**

❖ **Môi trường nuôi cấy tế bào (100ml):** Thành phần bao gồm:

Tên hóa chất	Hàm Lượng/Nồng độ cần pha	Thể tích bổ sung
DMEM/Ham's F-12 with L-Glutamine	1X	84ml
Fetal bovine serum (FBS)	15%	15ml
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), 100x	1%	1ml

- Chuẩn bị pipet và cá từ, Beaker 250ml sạch
- Bổ sung các thành phần với thể tích như trên vào Beaker.
- Dùng pipet huyền phù đều và lọc qua lại với màng lọc 0.22 μ m, tiệt trùng.
- Chia môi trường đã lọc vào ống ly tâm 50ml và bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C.

❖ **Dung dịch TBST (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20) (1L)**

- a. Pha dung dịch TBS (Tris-buffered saline) 10X (1L), thành phần bao gồm:

- 24 g Tris-HCl (khối lượng phân tử: 157.6 g)
 - 5.6 g Tris base (khối lượng phân tử: 121.1 g)
 - 88 g NaCl (khối lượng phân tử: 58.4 g)
 - Hòa tan các thành phần trên trong 900 mL nước cất.
- b. Pha dung dịch TBST (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20) (1L), thành phần bao gồm:
- 100 mL of TBS 10x
 - 1 mL Tween 20*
 - Hòa tan các thành phần trên trong 900 mL nước cất.

*Tween 20 rất nhớt và dễ dính vào các đầu tip. Do đó, thao tác cẩn thận để bổ sung đúng khối lượng Tween 20 vào đệm Tris buffer

❖ **Dung dịch Blocking Buffer 1X (10ml), thành phần bao gồm**

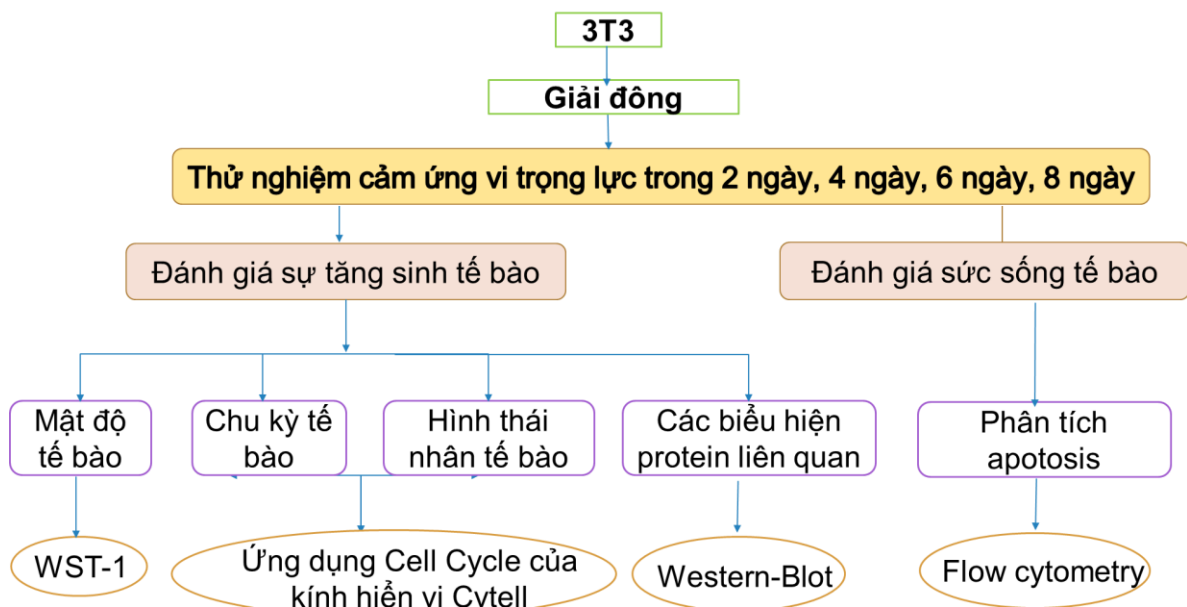
Pha 1mL 10X blocking buffer hòa tan vào 9ml PBS 1X. Kết quả thu được là 10ml Blocking buffer 1X sẵn sàng sử dụng.

❖ **Dung dịch Annexin V Binding Buffer 1X (10ml), thành phần bao gồm**

Pha 1mL 10X Annexin V Binding Buffer hòa tan vào 9ml nước cất. Kết quả thu được 10ml dung dịch Annexin V Binding Buffer ready-to-use

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các nội dung nghiên cứu được tóm tắt theo sơ đồ sau:



Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu

2.2.1. Nội dung nghiên cứu

Đề tài tập trung vào việc đánh giá sự cảm ứng của tế bào 3T3 trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat) trong các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau (2 ngày, 4 ngày, 6 ngày và 8 ngày) với các nội dung sau:

2.2.1.1. Nội dung nghiên cứu 1

Đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào 3T3 qua các thời gian nuôi cấy khác nhau trong hệ thống vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat)

- **Mục tiêu:** Xác định được sự thay đổi trong quá trình tăng sinh và phát triển của tế bào qua các khoảng thời gian khác nhau

- **Chỉ tiêu đánh giá:**

- Sự thay đổi mật độ tế bào 3T3 trong điều kiện vi trọng lực.
- Ảnh hưởng của vi trọng lực lên chu kỳ tế bào 3T3.
- Sự thay đổi về hình dạng và kích thước nhân của tế bào 3T3 dưới tác động của vi trọng lực.
- Ảnh hưởng của vi trọng lực đến sự biểu hiện của các protein liên quan tới chu kỳ tế bào 3T3.

2.2.1.2. Nội dung nghiên cứu 2

Đánh giá sức sống của tế bào 3T3 qua các thời gian nuôi cấy khác nhau trong hệ thống vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat).

- **Mục tiêu:** Xác định được sự thay đổi về sức sống của tế bào qua các khoảng thời gian khác nhau.

- **Chỉ tiêu đánh giá:**

- Tỷ lệ tế bào sống.
- Tỷ lệ tế bào apoptosis.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Nuôi cấy tế bào

a. Giải đông tế bào

- **Nguyên tắc**

Tế bào đang ở trạng thái đông lạnh, cần được rã đông và nuôi cấy để khôi phục lại hoạt động sinh lý và chức năng bình thường trước khi đưa vào các thí nghiệm về sau.

- **Các bước tiến hành**

- Ống đông lạnh chứa tế bào 3T3 được lấy ra khỏi bình chứa nitơ lỏng
- Đặt ống đông lạnh chứa tế bào vào bể ổn nhiệt 37°C trong 1-2 phút cho đến khi chỉ còn một mẫu đá nhỏ đang tan trong dung dịch.

Lưu ý: Không ngâm hoàn toàn ống, để nắp ống cao hơn mực nước để tránh nhiễm khuẩn.

- Bổ sung vào ống 1ml môi trường nuôi cấy và trộn đều.
- Ly tâm ống ở 1500 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Loại bỏ dịch nổi và thu tủa tế bào.
- Tái huyền phù tủa tế bào trong 1ml môi trường và chuyển vào bình nuôi T25 có chứa sẵn 4ml môi trường nuôi cấy.
- Bình nuôi tế bào được cho vào tủ nuôi ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂.
- Môi trường nuôi tế bào sẽ được thay mới sau 3 ngày nuôi cấy. Khi tế bào đạt mật độ 80 – 90% bề mặt nuôi cấy thì tiến hành cấy chuyển sang các bình T25

- **Tiêu chí đánh giá tế bào sau khi rã đông**

- Tế bào không bị vỡ, mật độ rã đông phù hợp.

b. Phương pháp cấy chuyển

- **Nguyên tắc**

Cấy chuyển tế bào là một quy trình loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ và chuyển các tế bào vào môi trường phát triển mới, cho phép các dòng tế bào hoặc chủng tế bào đủ không gian và chất dinh dưỡng để tiếp tục tăng sinh.

- **Các bước tiến hành**

- Tế bào phát triển đến khoảng 80% - 90% diện tích nuôi cấy được tiến hành cấy chuyển với tỷ lệ 1:2.
- Lấy các bình nuôi tế bào ra khỏi tủ nuôi, loại bỏ môi trường cũ.
- Rửa tế bào 3 lần với 3ml PBS 1X.
- Mỗi bình nuôi tế bào được xử lý với 1 ml dung dịch Trypsin 0,25% trong 5 phút, ở 37°C để các tế bào bóc tách khỏi bề mặt nuôi cấy.
- Bổ sung 1-2 ml môi trường nuôi cấy vào các bình nuôi cấy tế bào để bắt hoạt Trypsin.
- Hút toàn bộ dung dịch trong bình nuôi cấy cho vào ống ly tâm 15ml.
- Ly tâm ống ở 1500 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để thu tủa tế bào.

- Tái huyền phù tua tế bào và chia thành 2 bình nuôi T25 có chứa 4ml môi trường nuôi cấy.

- Các bình nuôi tế bào được cho vào tủ nuôi ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂.

- **Tiêu chí đánh giá tế bào sau khi cấy chuyển**

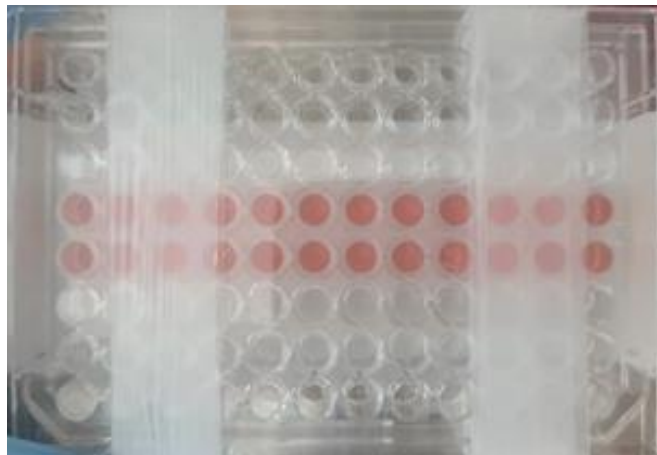
Tế bào tiếp tục phát triển và tăng sinh sau các lần cấy chuyển

2.2.2.2. Thử nghiệm vi trọng lực mô phỏng

Tế bào 3T3 sử dụng trong các thử nghiệm vi trọng lực mô phỏng bên dưới được lấy từ nguồn tế bào 3T3 được nuôi cấy và cấy chuyển theo phương pháp trên.

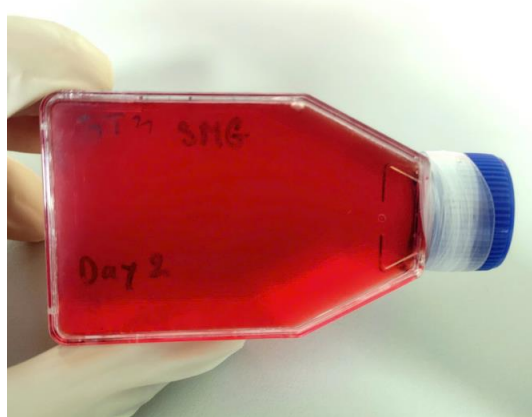
Tế bào 3T3 sẽ được nuôi cấy với 2 loại dụng cụ là đĩa 96 giếng và bình nuôi T25 nhằm phù hợp với các phương pháp nghiên cứu khác nhau như sau:

- Tế bào 3T3 được nuôi cấy trong các đĩa 96 giếng (161093, Thermo Scientific, Hoa Kỳ) với mật độ 10³ tế bào/ giếng. Mỗi giếng được lấp đầy với 395 μl môi trường nuôi cấy (thêm từ từ để tránh tạo bọt) phủ parafilm trước khi đậy nắp và sau khi đậy nắp (Hình 2.2).



Hình 2.2. Đĩa 96 giếng chứa tế bào 3T3 trong thử nghiệm vi trọng lực

- Tế bào 3T3 được nuôi cấy trong các bình nuôi T25 (156367, Thermo Scientific, Mỹ) với mật độ 10⁴ tế bào/flask. Mỗi flask được làm đầy với 75ml môi trường nuôi cấy (thêm từ từ để tránh tạo bọt) và phủ kín quanh miệng bình bằng parafilm (Hình 2.3).



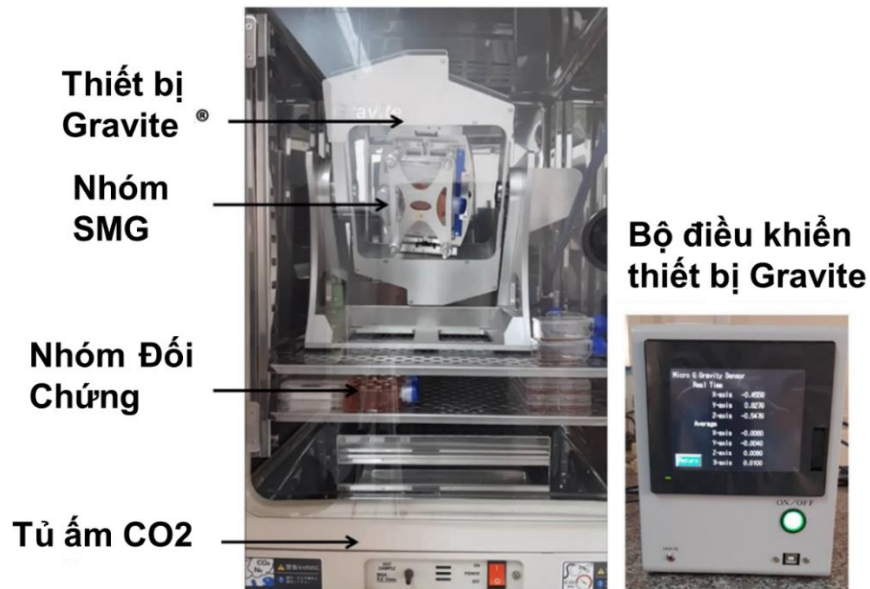
Hình 2.3. Bình nuôi tế bào 3T3 T25 trong thử nghiệm vi trọng lực

Với mục tiêu của các nội dung nghiên cứu trên, các bình hoặc đĩa tế bào 3T3 sẽ được chia làm 2 nhóm và nuôi cấy trong cùng lúc 2 điều kiện môi trường về trọng lực khác nhau (Hình 2.4):

- Nhóm vi trọng lực mô phỏng (SMG): các bình hoặc đĩa tế bào 3T3 được nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực sau cố định trên giá Gravite® của Gravity Controller (AS ONE INTERNATIONAL, INC., Santa Clara, CA, Mỹ) (Hình 2.1). Các tế bào 3T3 được đưa vào điều kiện trọng lực vi mô phỏng bằng cách sử dụng chế độ C (của Gravite®) và đặt vào tủ nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂.

- Nhóm điều kiện trọng lực 1G (đối chứng: control): nhóm đối chứng, các bình hoặc đĩa tế bào 3T3 được nuôi ở điều kiện trọng lực bình thường (1G) trong cùng một tủ nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂.

Các đĩa và bình Flask của nhóm SMG và nhóm đối chứng được đồng thời nuôi cấy và duy trì). Sau đó tại 4 mốc thời gian: 2 ngày, 4 ngày, 6 ngày và 8 ngày, riêng với phương pháp Wester 4 mốc thời gian là 1 ngày, 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày, thu nhận tế bào và tiến hành đánh giá các phương pháp đánh giá sự tăng sinh và sức sống của tế bào sau khi thử nghiệm khảo sát vi trọng lực (Theo nghiên cứu của Theodore ở trung tâm NASA thì sự thích nghi của sinh lý cơ thể con người khi đi vào không gian bắt đầu thay đổi và thích nghi sau 1 – 3 ngày Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất ba lần [8]



Hình 2.4. Chuẩn bị mẫu cho cảm ứng SMG. Các bình nuôi cấy tế bào được cố định trong máy Gravite và được đặt vào tủ ấm CO₂. Hoạt động của Gravite được điều khiển bởi chế độ mode C trong bộ điều khiển của máy

a. Đánh giá mật độ tế bào bằng phương pháp WST-1

- Nguyên tắc

Mức độ tăng sinh của tế bào 3T3 được đánh giá dựa trên phản ứng đổi màu của muối tetrazolium trong dung dịch WST-1 với các enzyme dehydrogenase trong ty thể. Thuốc thử tăng sinh tế bào WST-1 được sử dụng để định lượng tế bào (không dùng chất đánh dấu phóng xạ), định lượng quang phổ cho sự tăng sinh tế bào và khả năng tồn tại trong quần thể tế bào sử dụng đĩa 96 giếng. Giá trị OD càng cao, màu càng đậm, sự hoạt động của enzyme dehydrogenase trong ty thể càng lớn cho thấy tế bào tăng sinh mạnh, số lượng tế bào sống càng lớn, mức độ hô hấp càng nhiều [8, 60].

- Các bước tiến hành

- Sau các khoảng thời gian thử nghiệm vi trọng lực, các giếng nuôi tế bào được loại bỏ môi trường cũ và bổ sung 200 μ l PBS 1X mỗi giếng để rửa.
- Bổ sung 100 μ l môi trường nuôi cấy mới và 10 μ l dung dịch WST-1 vào mỗi giếng tế bào.
- Ủ tiếp tục trong 3,5 giờ ở 37 °C với 5% CO₂.

- Đo giá trị OD (Optical Density) ở bước sóng 450 nm bằng máy quang phổ GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader (Promega, Mỹ) [8, 42].

- **Tiêu chí đánh giá**

- Đánh giá mức độ tăng trưởng và phát triển của 3T3 khi nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng qua màu sắc và giá trị OD 45nm.

b. Đánh giá số lượng tế bào, nhân và chu kỳ tế bào qua phân tích bằng kính hiển vi Cytell:

- **Nguyên tắc:**

Dựa trên ứng dụng Cell Cycle của kính hiển vi Cytell (GE Healthcare, Hoa Kỳ) - hệ thống hình ảnh tế bào Cytell kết hợp các chức năng của kính hiển vi kỹ thuật số, máy đo tế bào hình ảnh và bộ đếm tế bào trong một thiết bị để bàn để đánh giá sự ảnh hưởng của vi trọng lực lên sự tăng sinh của tế bào 3T3 qua các khoảng thời gian khác nhau qua các yếu tố phân tích các hình ảnh tế bào, đánh giá khả năng sống, số lượng tế bào và chu kỳ tế bào.

- **Các bước tiến hành**

Trong nghiên cứu này hệ thống kính hiển vi Cytell được sử dụng để phân tích các nội dung nghiên cứu sau:

- Sau các khoảng thời gian thử nghiệm vi trọng lực, các giếng nuôi tế bào được loại bỏ môi trường cũ.

- Cố định tế bào trong paraformaldehyde 4% trong 30 phút.

- Bổ sung 200 μ l PBS 1X mỗi giếng, rửa 2 lần, mỗi lần 5 phút.

- Xử lý tế bào với Triton X100 0,1% qua đêm ở 4°C.

- Nhuộm nhân với dung dịch nhuộm Hoechst 33342 (14533, Sigma-Aldrich, Mỹ) trong 30 phút

- Rửa lại tế bào 3 lần bằng 200ul dung dịch PBS 1X, mỗi lần 5 phút.

- Số lượng tế bào, diện tích nhân, hình dạng nhân và chu kỳ tế bào 3T3 được đánh giá qua phần mềm ứng dụng Cell Cycle App [83].

- **Tiêu chí đánh giá**

Đánh giá số lượng tế bào, hình dạng và diện tích nhân và sự thay đổi chu kỳ tế bào của tế bào 3T3 dưới tác động của vi trọng lực

c. Phương pháp Western Blot

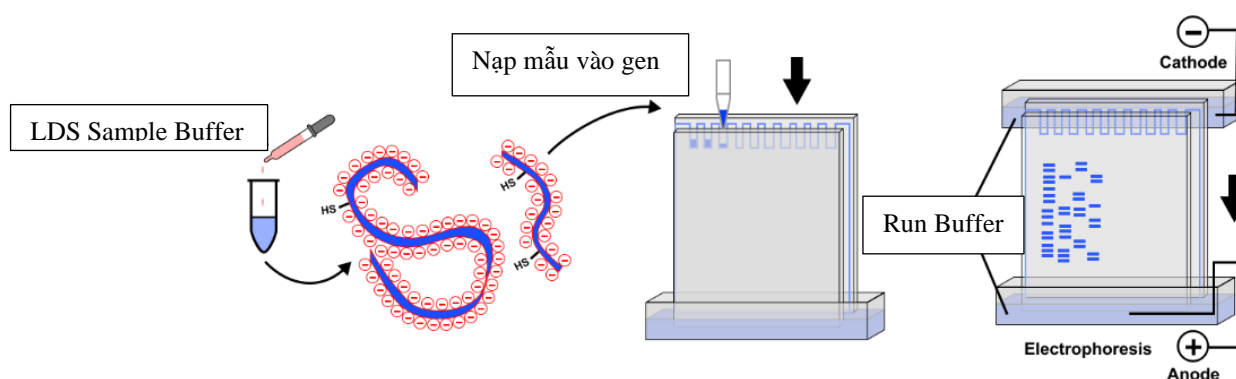
- **Nguyên tắc**

Dựa vào phản ứng tạo màu hoặc phát huỳnh quang của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để phát hiện sự biểu hiện của các protein chuyên biệt cần phân tích trên các mẫu mô, dịch chiết. Kỹ thuật này sử dụng phương pháp điện di trên gel nhằm phân tách các protein còn nguyên vẹn hoặc các 47 chuỗi polypeptide. Sau đó chúng được chuyển lên màng (màng nitrocellulose hoặc màng PVDF) và được gắn lên các kháng thể đặc hiệu. Bảng điện di trên gel sẽ được đưa vào hệ thống phân tích Western Blot để phân tích hiệu, nhờ đó có thể phát hiện sự hiện diện của protein mục tiêu trên màng lai [8, 61]. Trong thí nghiệm này, phương pháp Western Blot được sử dụng để đánh giá sự ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực lên mức độ biểu hiện của các protein liên quan đến chu kỳ tế bào của tế bào 3T3.

- **Các bước tiến hành**

- Sau các khoảng thời gian thử nghiệm vi trọng lực, các tế bào 3T3 được thu thập từ bình nuôi T25 và ly giải bằng Optiblot LDS Sample Buffer ở bề ổn nhiệt 70°C trong 10 phút để thu nhận protein tổng.

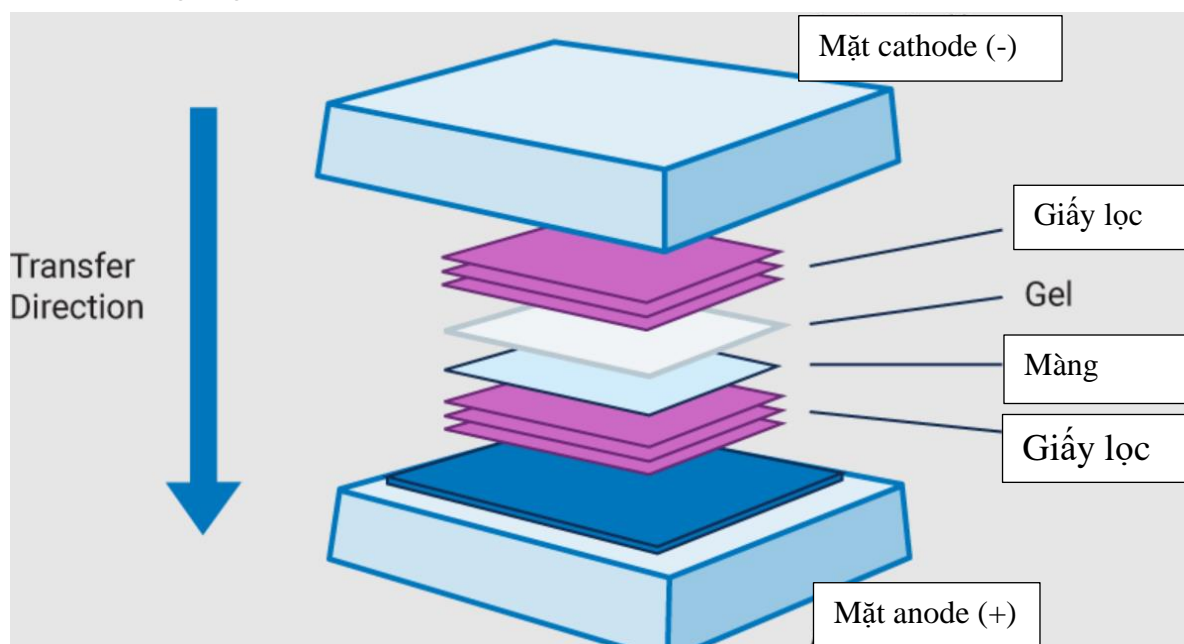
- Chuyển Protein thu được từ các mẫu với lượng bằng nhau vào các giếng của lên gel Precast Gel SDS-PAGE 4-12 % để phân tách các protein với Optiblot SDS Run Buffer ở hiệu điện thế không đổi 50V trong 2 giờ (GAPDH được sử dụng làm housekeeping protein) (Hình 2.5).



Hình 2.5. Điện di SDS-PAGE

- Chuyển các protein này lên màng Low Fluorescence Western Membrane (PVDF) được kẹp bởi một lớp giấy lọc Extra Thick Blot Paper và một lớp bọt biển ở mỗi bên và đặt cố định vào cassette (Hình 2.6). 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. ở 90V trong 2 giờ.



Hình 2.6. Phương pháp chuyển màng PVDF

- Sử dụng dung dịch Blocking buffer 1X trong 1 giờ để khóa màng ở nhiệt độ phòng

- Ủ với kháng thể sơ cấp qua đêm ở 4 °C rồi rửa màng với TBST 1X 3 lần, mỗi lần 10 phút.

Lưu ý: Các kháng thể (đặc trưng cho từng loại protein) được sử dụng ở độ pha loãng 1:5000. Kháng thể Anti-GAPDH được sử dụng làm đối chứng với tỷ lệ pha loãng 1:10.000.

- Rửa màng lại với TBST 1X 3 lần, mỗi lần 10 phút để loại bỏ kháng thể sơ cấp dư thừa.

- Ủ màng lại với kháng thể thứ cấp có gắn enzyme horseradish peroxidase

- Goat Anti-Rabbit IgG (ab6721, Abcam, Mỹ) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

- Rửa màng lại với TBST 1X 3 lần, mỗi lần 10 phút để loại bỏ kháng thể thứ cấp dư thừa.

- Xử lý màng lại đã được cố định trên cassette với hỗn hợp Reagent 1 và Reagent 2 (ECL Western Blotting Substrate Kit) theo tỉ lệ 1:1 trong 1 phút theo protocol bộ kit ECL Western Blotting Substrate

- Đặt 1 tấm phim CL-XPosure Film lên màng lại và ủ trong 1 phút.

- Nhúng phim vào dung dịch AUTOMATIC X-RAY - Develope trong 15 giây và chuyển qua dung dịch AUTOMATIC X-RAY - Fixing trong 15 giây.

- Rửa lại phim bằng nước cất trong 30 giây.

Các vạch protein phát huỳnh quang trên màng lai PVDF do sự phân giải cơ chất của enzyme horseradish peroxidase sẽ được hiển thị âm bản trên phim [83]. Phần mềm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Mỹ) được dùng để đo cường độ của các vạch protein trong kết quả hiện phim.

Các kháng thể được sử dụng bao gồm: Anti-Cyclin A1/A2 (ab185619, Abcam, Mỹ), anti-Cyclin D1 (ab40754, Abcam, Mỹ), anti-cdk2 (ab32147, Abcam, Mỹ), anti-Cdk4 (ab137675, Abcam, Mỹ), và anti-Cdk6 (ab124821, Abcam, Mỹ), Anti-GAPDH (ab181602, Abcam, Mỹ), Goat Anti-Rabbit IgG.

- **Tiêu chí đánh giá**

Đánh giá mức độ biểu hiện protein của các gen liên quan đến các quá trình hoạt động, hình thái cấu trúc tế bào trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Các protein được đánh giá bao gồm Cyclin A1, Cyclin A2, CDK4, CDK6, CDK2, Cyclin D1 liên quan đến chu kỳ tế bào.

2.2.2.3. Phương pháp đánh giá sức sống tế bào

2.2.2.4. Phương pháp Flow Cytometry

- **Nguyên tắc**

Flow Cytometry hay còn gọi là kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy, đo đặc tính huỳnh quang và quang học của tế bào đơn, nhân và nhiễm sắc thể... thông qua chùm tia sáng laser. Nguyên lý hoạt động: các hạt/tế bào (kích thước từ 0,2-150 μm) được đưa vào trong dòng chảy chất lỏng và đi qua chùm tia sáng laser, gây tán xạ ánh sáng và ánh sáng huỳnh quang sẽ được thu tại thấu kính rồi hướng tới cảm biến (detector). Cuối cùng, các cảm biến sẽ tạo ra tín hiệu điện tỉ lệ thuận với tín hiệu quang học.

Phospholipids của màng tế bào được phân phối không đối xứng giữa các mặt bên trong và bên ngoài của màng. Phosphatidylcholine và sphingomyelin được phơi bày trên mặt bên ngoài của lớp lipid kép, trong khi phosphatidylserine nằm ở bề mặt bên trong. Trong quá trình apoptosis, sự bất đối xứng này bị phá vỡ và phosphatidylserine bị lộ ra ở bề mặt bên ngoài của màng plasma. Do Annexin V liên kết với ái lực cao với phosphatidylserine, nên Annexin V liên kết với fluorochrome có thể được sử dụng để phát hiện tế bào apoptosis bằng

phương pháp tế bào học dòng chảy. Hệ thống máy BD Accuri C6 flow cytometer được sử dụng để phân tích sức sống của tế bào 3T3 khi nuôi trong môi trường mô phỏng vi trọng lực mô phỏng thông qua việc đánh giá tỷ lệ tế bào sống và tỷ lệ apoptosis của tế bào [8,61].

- **Các bước tiến hành**

- Tế bào 3T3 được thu thập từ bình nuôi T25 Sau các khoảng thời gian thử nghiệm vi trọng lực (2 ngày, 4 ngày, 6 ngày và 8 ngày).

- Rửa tế bào bằng 2ml PBS 1X lạnh/mỗi bình rồi huyền phù lại tế bào trong Annexin V Binding Buffer 1X đã bổ sung FITC - Annexin V và PI.

- Ủ tế bào trong 30 phút trong bóng tối, ở nhiệt độ phòng.

- Ly tâm, loại bỏ dịch nổi.

- Bổ sung 2 ml PBS 1X vào tube chứa tế bào, vortex đều.

Cho các tube chứa tế bào chạy qua hệ thống BD Accuri TM C6 Flow Cytometer để đánh giá tỷ lệ chu kỳ tế bào. Bên cạnh đó, tỷ lệ tế bào apoptosis cũng được xác định thông qua tỷ lệ các tế bào dương tính với FITC - Annexin V và PI.

- **Tiêu chí đánh giá**

Tỷ lệ tế bào apoptosis cũng được xác định thông qua tỷ lệ các tế bào dương tính với FITC - Annexin V và PI. Qua đó đánh giá ảnh hưởng vi trọng lực lên sức sống tế bào.

Phương pháp thống kê

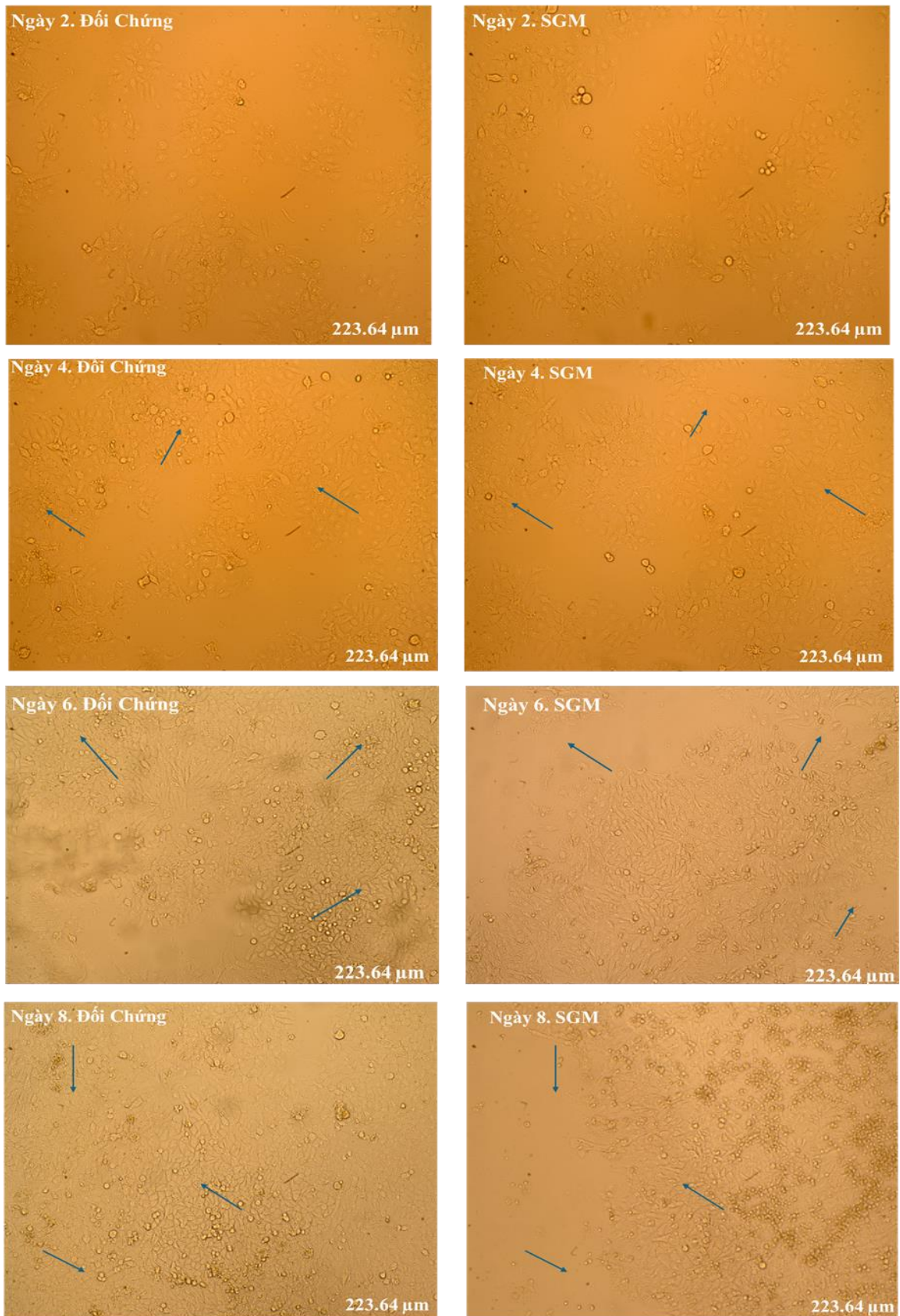
Phần mềm Sigma Plot (SYSTAT Software, Mỹ) được dùng để phân tích số liệu trong nghiên cứu. Phương pháp One-way ANOVA được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm, trong đó $p \leq 0,05$ được xem là các khác biệt có ý nghĩa thống kê.


Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nội dung 1: Đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy dưới điều kiện vi trọng lực mô phỏng lên sự tăng sinh của tế bào 3T3

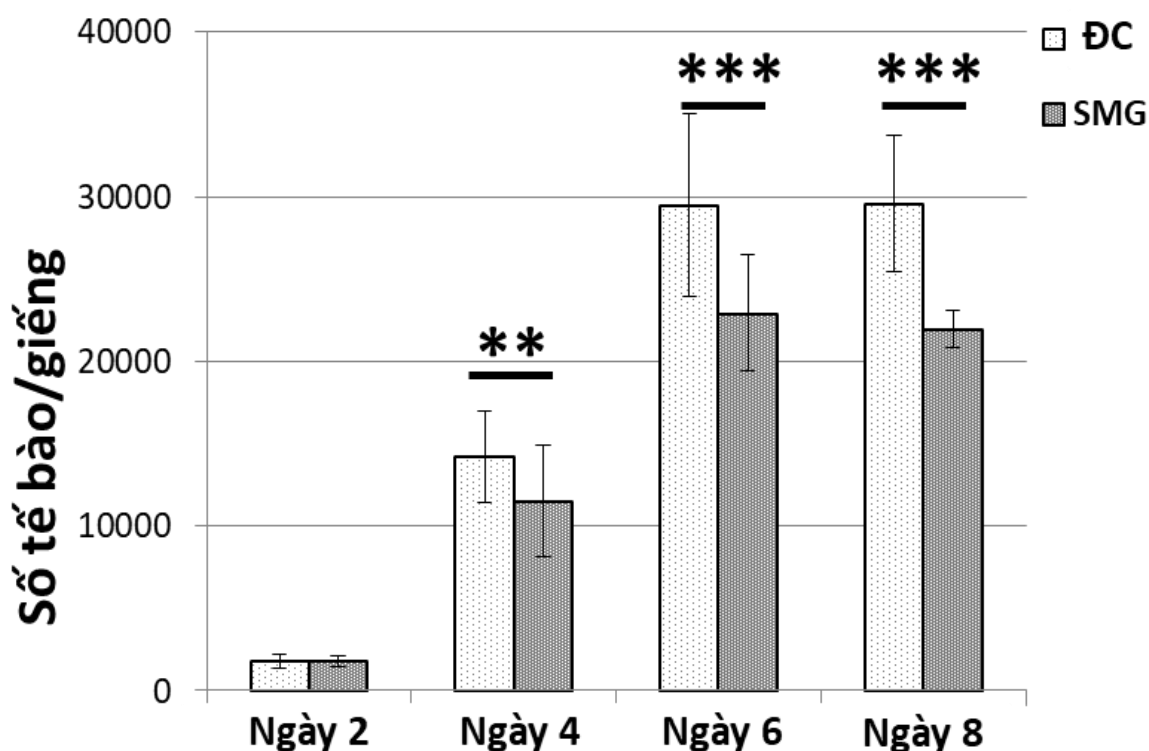
3.1.1. Sự thay đổi mật độ tế bào

Theo hình 3.1, tế bào 3T3 ở hai nhóm thí nghiệm SMG và nhóm đối chứng về hình thái có nhiều đặc điểm hình thái tương đồng (Xem hình 3.1 A, B, C, D) tại các thời gian khảo sát. Tế bào 3T3 được nuôi cấy trong điều kiện bình thường (1G) – nhóm đối chứng vẫn mang đặc điểm của tế bào nguyên bào sợi, tế bào bám dính, hình thoi hoặc chữ nhật, có nhân dẹt hình bầu dục. Tế bào 3T3 nuôi cấy trong điều kiện SMG không có sự khác biệt về đặc điểm hình thái, giống tế bào nguyên bào sợi về hình thái và tương tự hình dạng các tế bào 3T3 trong nhóm đối chứng. Tuy nhiên mật độ tế bào ít hơn so với nhóm đối chứng. (Hình 3.1, mũi tên)



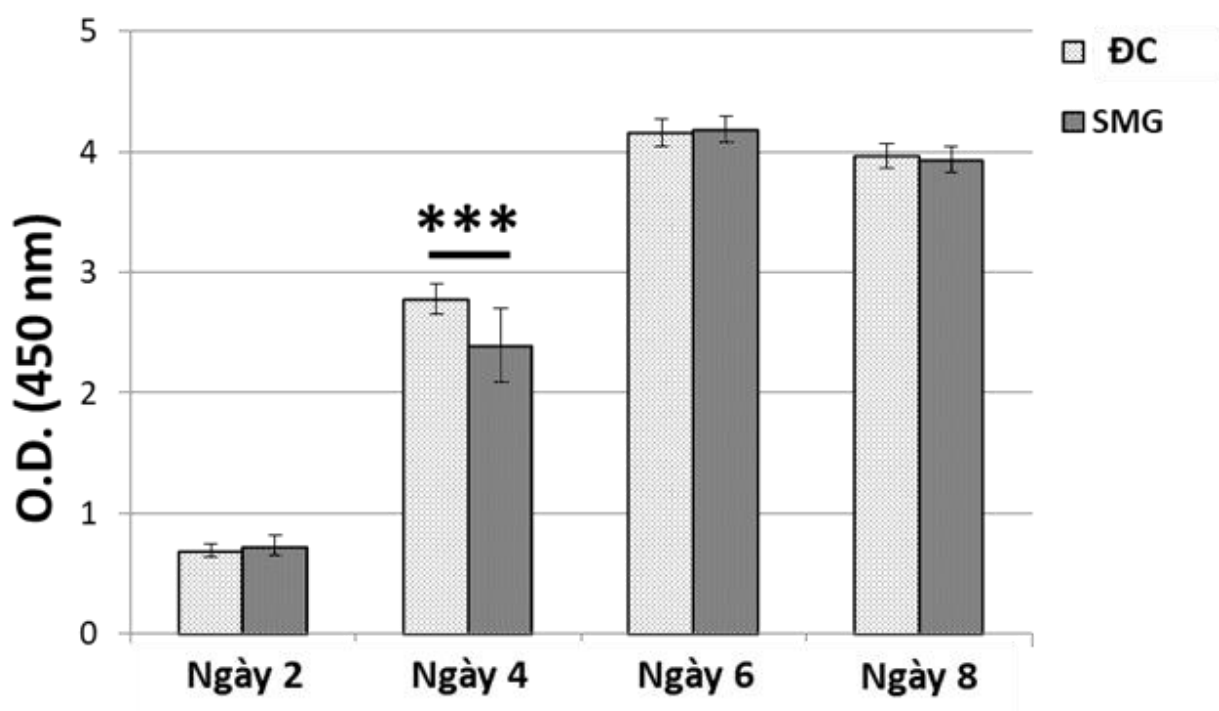
Hình 3.1. Hình thái tế bào 3T3 trong quá trình nuôi cấy *in vitro* ở hai nhóm thí nghiệm.  vị trí có khác biệt về mật độ tế bào 3T3 ở hai nhóm.

Tế bào 3T3 được nuôi cấy với mật độ 10^3 tế bào/giếng trong đĩa 96. Mật độ tế bào được xác định bằng chương trình Cell Cycle App của hệ thống kính hiển vi Cytell. Kết quả phân tích cho thấy mật độ tế bào ở nhóm SMG và nhóm đối chứng có mức độ tăng trưởng tương tự nhau, không có sự khác biệt sau 2 ngày nuôi cấy, với số tế bào lần lượt là 1805 ± 347 tế bào/giếng và 1807 ± 442 tế bào/giếng. Hình 3.2 thể hiện rõ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong mật độ tế bào 3T3 giữa hai nhóm đối chứng và nhóm SMG tại các mốc thời gian 4 ngày, 6 ngày và 8 ngày. Cụ thể, mật độ tế bào 3T3 của cả hai nhóm đều tăng lên ở ngày 4, nhưng ở nhóm SMG mật độ tế bào thấp hơn so với nhóm đối chứng, lần lượt là 11526 ± 3387 tế bào/giếng và 14202 ± 2818 tế bào/giếng ($p < 0.01$). Vào ngày thứ 6, mật độ tế bào của hai nhóm gấp đôi so với ngày thứ 4 và tương đương so với ngày thứ 8. Sau 8 ngày nuôi cấy, nhóm đối chứng có mật độ tế bào cao hơn nhóm SMG, lần lượt là 29546 ± 4153 tế bào/giếng, còn ở nhóm SMG là 21952 ± 1164 tế bào/giếng ($p < 0.001$).



Hình 3.2. Số lượng tế bào được phân tích bằng Cell cycle App của kính hiển vi huỳnh quang Cytell. *** chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.001$); ** chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.01$).

Ngoài ra, sự tăng sinh và khả năng sống của tế bào 3T3 cũng được đánh giá thông qua phương pháp WST-1. Kết quả phân tích giá trị độ hấp thụ của tế bào 3T3 theo hình 3.3 cho thấy giá trị OD ở cả hai nhóm đối chứng và nhóm SMG đều cho giá trị tương đồng ở ngày 2, lần lượt là 0.69 ± 0.05 và 0.73 ± 0.08 . Giá trị OD của tế bào nhóm đối chứng vào ngày thứ 4 là 2.78 ± 0.12 , cao so với nhóm SMG là 2.39 ± 0.31 ($p < 0.001$). Tuy nhiên, không có sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ở ngày 6 (lần lượt là 4.16 ± 0.12 và 4.19 ± 0.11) và ngày 8 (lần lượt là 3.97 ± 0.10 và 3.94 ± 0.11). (Hình 3.3)



Hình 3.3. Giá trị OD của tế bào 3T3 ở hai nhóm thí nghiệm. *** chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.001$).

Các nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng SMG gây ra tỉ lệ tăng sinh thấp ở các loại tế bào khác nhau, chẳng hạn như tế bào tiền thân tạo máu ở người [35,70], tế bào gốc trung mô tủy xương [16], tế bào nguyên bào sợi chuột [45], tế bào gốc trung mô chuột [38,58] Trong nghiên cứu này, mật độ tế bào 3T3 và giá trị OD ở nhóm đối chứng cao hơn so với nhóm SMG sau 4 ngày nuôi cấy. Qua đó có thể thấy, điều kiện SMG gây giảm hoạt động phát triển ở các tế bào 3T3 sau 4 ngày nuôi cấy. Mật độ tế bào 3T3 ở nhóm SMG thấp hơn nhóm đối chứng vào ngày 6 và ngày 8, mặc dù không sự khác biệt về giá trị OD giữa cả hai nhóm này vào cùng thời gian nuôi cấy trên. Kết quả cho thấy sự hoạt động

của enzyme dehydrogenase trong ty thể của tế bào 3T3 ở nhóm SMG cao hơn nhóm đối chứng, nên tế bào 3T3 ở nhóm SMG có sức sống cao hơn tế bào 3T3 ở nhóm đối chứng.

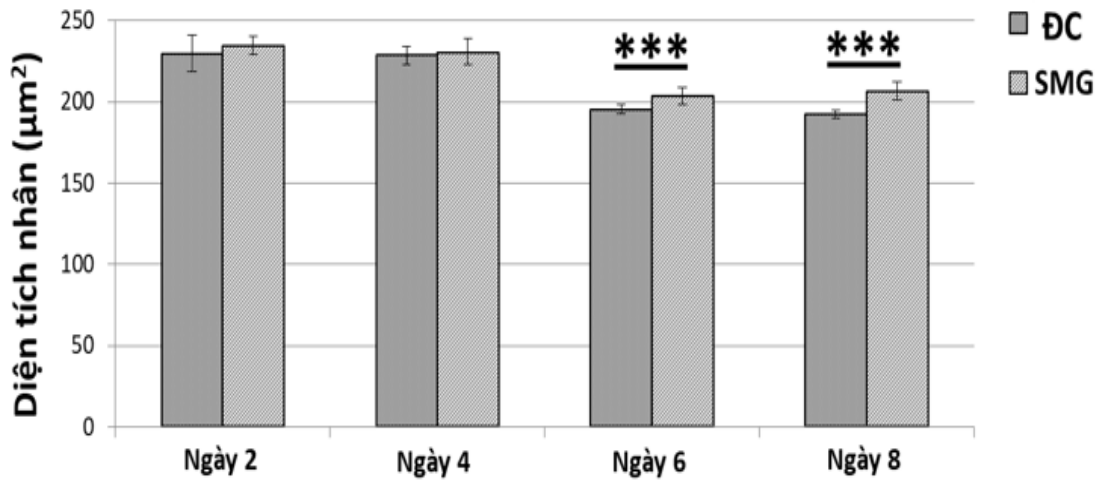
Như vậy, điều kiện vi trọng lực làm suy giảm mật độ tế bào 3T3 vào thời gian đầu tiếp xúc (2-4 ngày). Tuy nhiên, tế bào 3T3 sẽ dần thích nghi và hồi phục với điều kiện vi trọng lực sau khi cảm ứng ở thời gian dài (6-8 ngày) bằng các tăng mức độ hô hấp, tăng sinh số lượng tế bào thông qua việc tăng tổng hợp enzyme dehydrogenase trong ty thể ở các tế bào. Dù vậy, cơ chế của sự giảm tăng sinh của tế bào qua kết quả này vẫn chưa được mô tả rõ ràng. Do đó, các đánh giá về chu kỳ tế bào, sự biểu hiện của các protein liên quan đến chu kỳ tế bào được trình bày ở phần kết quả tiếp theo sẽ góp phần làm rõ hơn cơ chế này.

3.1.2. Đánh giá sự thay đổi hình thái nhân tế bào

Tế bào sau các khoảng thời gian thí nghiệm được đo diện tích nhân bằng kính hiển vi huỳnh quang Cytell, sử dụng thuốc nhuộm Hoechst 33342 và chương trình phân tích Cell Cycle App để đánh giá diện tích nhân và hình dạng nhân của tế bào.

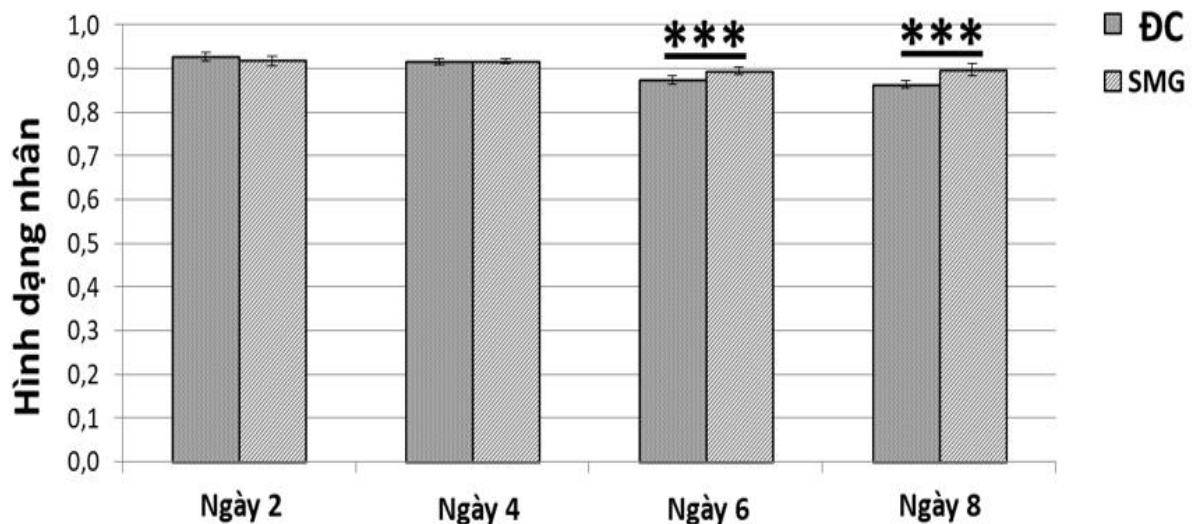
Ở biểu đồ hình 3.4, diện tích nhân tế bào 3T3 ở hai nhóm thí nghiệm có sự tương đồng, không có sự thay đổi đáng kể khi không tìm thấy sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê nào giữa hai nhóm SMG và nhóm đối chứng trong khoảng 2 - 4 ngày nuôi cấy. Diện tích nhân của cả hai nhóm tế bào giảm vào ngày ngày nuôi cấy thứ 6, tương đồng với diện tích nhân của cả hai nhóm tế bào vào ngày nuôi cấy thứ 8. Ngoài ra, ghi nhận sự khác biệt về diện tích nhân giữa hai nhóm tế bào 3T3 trong điều kiện SMG và nhóm đối chứng vào ngày 6 và ngày 8. Cụ thể, diện tích nhân của tế bào 3T3 trong nhóm SMG lớn hơn so với nhóm đối chứng sau 6 ngày (lần lượt là $204 \pm 5 \mu\text{m}^2$ và $195 \pm 3 \mu\text{m}^2$) và 8 ngày nuôi cấy (lần lượt là $206 \pm 6 \mu\text{m}^2$ và $192 \pm 2 \mu\text{m}^2$) ($p < 0.001$).

A



Hình 3.4. Biểu đồ thể hiện diện tích nhân giữa hai nhóm tế bào trong thời gian khảo sát. *** chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.001$).

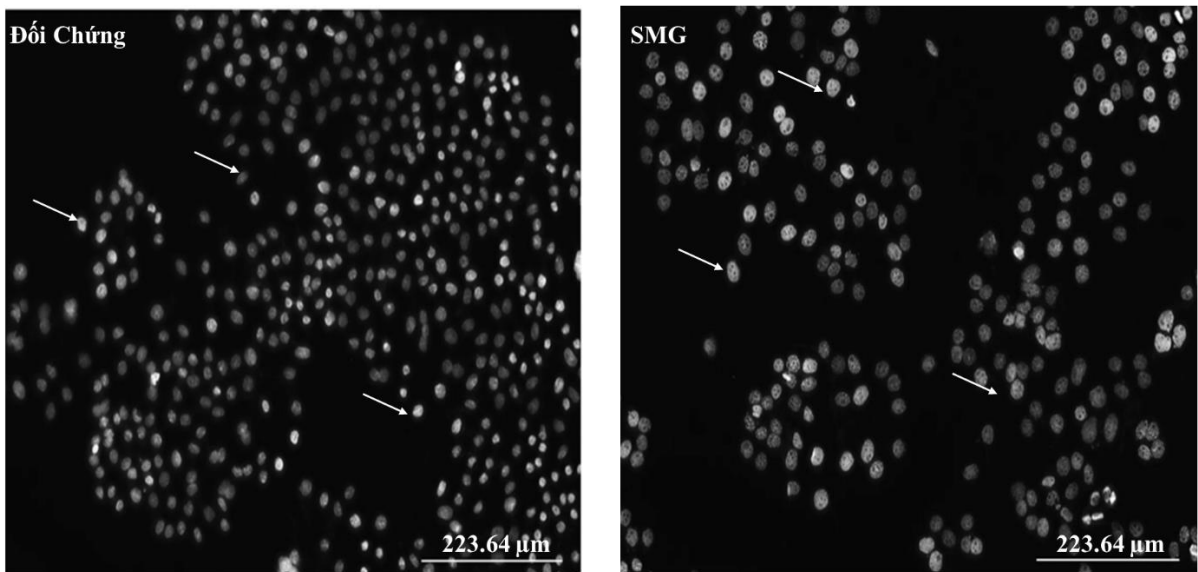
Giá trị hình thái nhân tế bào (nuclear shape value) nhằm đánh giá độ toàn vẹn của nhân, được phân tích bằng chương trình Cell Cycle App với thuốc nhuộm Hoechst 33342 dưới kính hiển vi huỳnh quang Cytell. Khi giá trị này bằng 1, nhân có hình dạng dạng tròn và mức độ toàn vẹn lớn nhất, khi giá trị này càng nhỏ hơn 1 thì mức độ tròn và toàn vẹn của nhân giảm dần.




Hình 3.5. Biểu đồ thể hiện giá trị hình dạng nhân tế bào của nhóm đối chứng và nhóm SMG qua các thời gian khảo sát. *** chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.001$).

Theo biểu đồ hình 3.5, không có sự khác biệt về hình dạng nhân của tế bào 3T3 ở nhóm đối chứng và nhóm SMG và gần như không thay đổi sau 2-4 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên hình dạng nhân tế bào 3T3 ở hai nhóm tế bào bắt đầu giảm kể từ ngày thứ 6 nuôi cấy và không có sự thay đổi quá nhiều vào ngày thứ 8 nuôi cấy. Cụ thể, giá trị hình dạng nhân tế bào ở nhóm SMG lại lớn hơn so với nhóm đối chứng sau 6 ngày nuôi cấy (0.89 ± 0.009 và 0.87 ± 0.001) và 8 ngày nuôi cấy (0.90 ± 0.009 và 0.86 ± 0.001).

Qua kết quả đánh giá diện tích nhân và hình dạng nhân tế bào 3T3 ở hai nhóm SMG và nhóm đối chứng, có thể thấy diện tích nhân và hình dạng tế bào ở nhóm SMG đều cao hơn và lớn hơn ở nhóm đối chứng sau các khoảng thời gian 6 ngày và 8 ngày nuôi cấy. Cụ thể, một số tế bào 3T3 ở nhóm SMG bắt đầu biểu hiện nhân to hơn và không còn giữ được hình dạng ban đầu so với nhóm đối chứng (hình 3.6). Quần thể tế bào 3T3 ở nhóm SMG có kích thước nhân không đều nhau khi quan sát dưới kính hiển vi Cytell. (Hình 3.6)



Hình 3.6. Hình thái nhân tế bào 3T3 được quan sát dưới kính hiển vi Cytell vào ngày 6.  Mũi tên: nhân tế bào 3T3

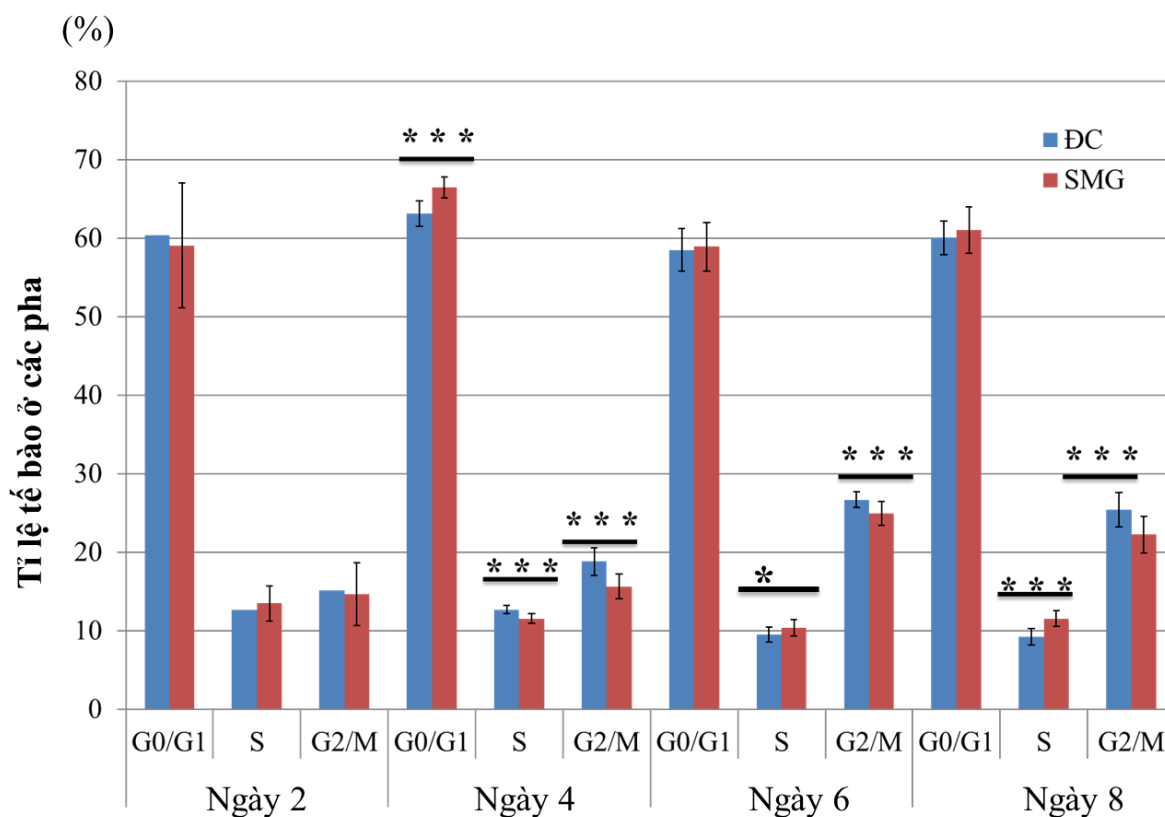
Việc tái cấu trúc hạt nhân đòi hỏi sự tổng hợp DNA và các thành phần tế bào liên quan. Trong pha S của chu kỳ tế bào, sự sao chép DNA dẫn đến sự tăng cường độ hạt nhân và ngưng tụ chromatin [42]. Quá trình chuyển từ pha S sang pha G2/M chuẩn bị cho giai đoạn nguyên phân cũng làm tăng cường độ nhân trong tế bào [42,51]. Kết quả đánh giá hình thái nhân trong nghiên cứu này ghi nhận trong khoảng thời gian từ 2 đến 4 ngày nuôi cấy, diện tích nhân và giá trị

hình dạng nhân của tế bào 3T3 không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG và nhóm đối chứng. Điều này cho thấy, ở giai đoạn đầu của quá trình nuôi cấy, vi trọng lực mô phỏng không có tác động rõ rệt lên kích thước nhân tế bào hay hình dạng nhân tế bào. Tuy nhiên, vi trọng lực mô phỏng làm hình dạng nhân tế bào to ra (tăng diện tích) làm hình dạng tế bào 3T3 trở nên to hơn so với nhóm đối chứng sau 6 đến 8 ngày nuôi cấy.

Những thay đổi này cho thấy rằng vi trọng lực có thể gây ra sự biến dạng hoặc thay đổi cấu trúc của nhân tế bào nếu tiếp xúc trong thời gian dài. Tuy nhiên, điều này cần được nghiên cứu thêm để hiểu rõ các cơ chế sinh học và các ảnh hưởng lâu dài của vi trọng lực đến tế bào.

3.1.3. Đánh giá sự thay đổi của chu kỳ tế bào

Phần trăm tế bào đang ở các pha của chu kỳ tế bào được phân tích bằng chương trình Cell Cycle App với thuốc nhuộm nhân Hoechst 33342 của kính hiển vi huỳnh quang Cytell. Kết quả phân tích các pha cho thấy có sự thay đổi giữa nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực ở một số pha trong chu kỳ tế bào. Theo Hình 3.7 và bảng 3.1, vào ngày 2, tế bào 3T3 trong nhóm đối chứng có tỷ lệ tương đồng về phần trăm số lượng tế bào ở pha G0/G1 với tế bào 3T3 nhóm SMG lần lượt là $60.44 \pm 12.93 \%$ so với $59.08 \pm 7.97 \%$. Tỷ lệ tế bào 3T3 của nhóm SMG đang ở pha S là $13.53 \pm 2.24 \%$ đối với nhóm tế bào đối chứng và $17.68 \pm 1.69 \%$ với nhóm tế bào cảm ứng vi trọng lực. Tỷ lệ của nhóm tế bào đối chứng và nhóm tế bào cảm ứng vi trọng lực đang ở pha G2/M lần lượt là $15.20 \pm 5.87 \%$ và $14.66 \pm 3.99 \%$ (Bảng 3.1). Kết quả so sánh cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm tế bào này khi phân tích tỷ lệ pha G0/G1, pha S và pha G2/M trong chu kỳ tế bào tại ngày thứ 2 nuôi cấy. (Hình 3.7)



Hình 3.6. Biểu đồ thể hiện phần trăm số lượng tế bào qua các pha trong các khoảng thời gian khảo sát. *** chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.001$), * chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.05$)

Sau 4 ngày nuôi cấy và cảm ứng, tế bào 3T3 ở nhóm SMG với tỷ lệ pha G0/G1 là 66.49 ± 1.29 %, cao hơn so với nhóm đối chứng là 63.18 ± 1.61 %. Tuy nhiên, tỷ lệ phần trăm tế bào 3T3 ở pha S ở nhóm đối chứng cao hơn so với nhóm SMG, lần lượt là 12.73 ± 0.5 % và 9.57 ± 0.97 % ($p < 0.001$). Kết quả cũng tương tự khi so sánh phần trăm tế bào 3T3 ở pha G2/M ở cả hai nhóm, nhóm đối chứng cao hơn nhóm SMG, lần lượt là 18.87 ± 1.76 % và 15.69 ± 1.59 % ($p < 0.001$) (Bảng 3.1). Không có sự khác biệt của tỷ lệ tế bào ở pha G0/G1 ở nhóm đối chứng và SMG sau 6 ngày nuôi cấy và 8 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên tỷ lệ tế bào 3T3 ở pha G2/M của nhóm đối chứng cao hơn so với nhóm SMG ở ngày thứ 6, lần lượt là 26.71 ± 1.02 % và 24.96 ± 1.51 %, và ngày thứ 8 lần lượt là 11.56 ± 1.01 % và 9.27 ± 1.02 % với khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0.001$.

Ngược lại, nhóm đối chứng có tỷ lệ phần trăm tế bào 3T3 ở pha S thấp hơn so với nhóm SMG vào ngày thứ 6, lần lượt là $9.57 \pm 0.97 \%$ và $10.41 \pm 1.05 \%$ ($p < 0.05$) và ngày thứ 8, $9.27 \pm 1.02 \%$ và $11.56 \pm 1.01 \%$ ($p < 0.001$).

Bảng 3.1. Tỷ lệ các pha tế bào sau cảm ứng SMG (%) ở các khoảng thời gian khảo sát. ^a: chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.001$), ^b: chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.05$)

Phần trăm (%)	Đối chứng			SMG		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
Ngày 2	60.44 ± 12.93	12.72 ± 2.95	15.20 ± 5.87	59.08 ± 7.97	13.53 ± 2.24	14.66 ± 3.99
Ngày 4	63.18 ± 1.61^a	12.73 ± 0.50^a	18.87 ± 1.76^a	66.49 ± 1.29^a	11.59 ± 0.63^a	15.69 ± 1.59^a
Ngày 6	58.52 ± 2.72	9.57 ± 0.97^b	26.71 ± 1.02^a	58.93 ± 3.12	10.41 ± 1.05^b	24.96 ± 1.51^a
Ngày 8	60.07 ± 2.13	9.27 ± 1.02^a	25.47 ± 2.20^a	61.08 ± 2.98	11.56 ± 1.01^a	22.26 ± 2.31^a

Sự sinh trưởng của tế bào gắn liền với chu kỳ tế bào. Một chu kỳ của tế bào bao gồm bốn giai đoạn cơ bản: pha G0/G1 (pha nghỉ), pha S (tổng hợp DNA), pha G2 (giai đoạn tổng hợp protein và chuẩn bị cho nguyên phân) và pha M (nguyên phân).

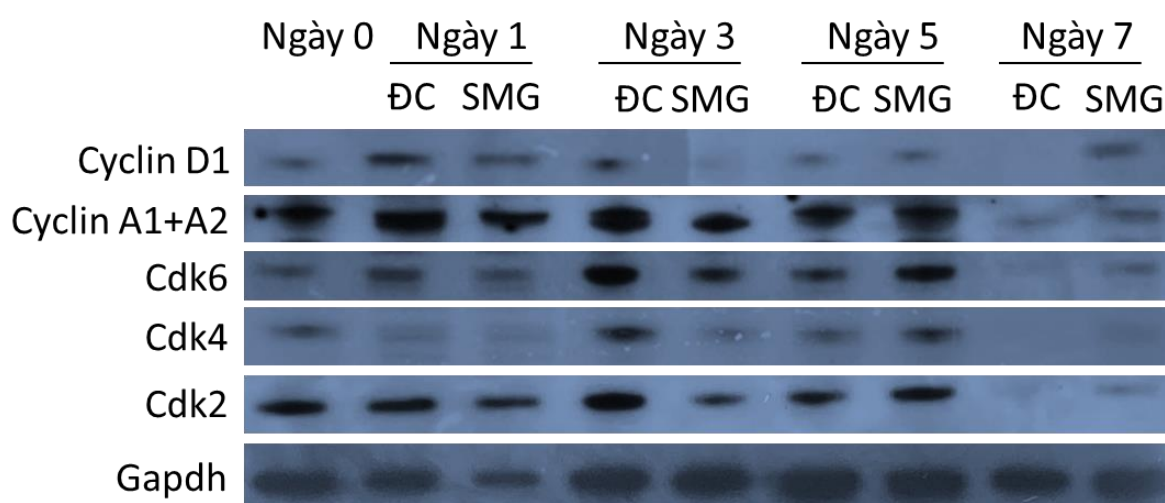
Trong kết quả phân tích chu kỳ tế bào cho thấy tỷ lệ các tế bào 3T3 đi vào pha G0/G1 ở nhóm SMG cao hơn nhóm đối chứng, tuy nhiên tỷ lệ tế bào ở pha S và pha G2/M ở nhóm SMG lại thấp hơn nhóm đối chứng sau 4 nuôi cấy. Điều này cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng làm tăng tỉ lệ tế bào đi vào pha G0/G1 và cản trở các tế bào đi vào pha S và pha G2/M sau 4 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ các tế bào 3T3 đi vào pha G2/GM ở nhóm SMG thấp hơn nhóm đối chứng sau 6 ngày và 8 ngày nuôi cấy trong khi tỷ lệ tế bào 3T3 đi vào pha S ở nhóm SMG cao hơn nhóm đối chứng trong cùng khoảng thời gian khảo sát này. Điều này chứng tỏ điều kiện vi trọng lực mô phỏng đã làm giảm tỷ lệ tế bào đi vào

pha G2/M, tuy nhiên lại thúc đẩy các tế bào đi vào pha S sau 6 đến 8 ngày nuôi cấy.

Như vậy, điều kiện vi trọng lực có tác dụng thúc đẩy tế bào 3T3 đi vào pha nghỉ trong giai đoạn đầu tiếp xúc với môi trường vi trọng lực (4 ngày), tuy nhiên các tế bào sẽ thích nghi và phục hồi sự tăng sinh, thúc đẩy tế bào phát triển bằng cách đưa tế bào vào giai đoạn tổng hợp DNA (pha S) tuy nhiên chỉ dừng lại ở pha G2 hoặc có thời gian tại pha G2 kéo dài mà không có quá trình nguyên phân xảy ra.

3.1.4. Đánh giá sự thay đổi biểu hiện các protein liên quan đến chu kỳ tế bào

Kỹ thuật Western blot được sử dụng trong nghiên cứu để đánh giá sự biểu hiện của các protein liên quan đến chu kỳ tế bào. Theo hình 3.8, tế bào 3T3 ở cả hai nhóm đều có mức độ biểu hiện của các protein liên quan đến chu kỳ tế bào tương tự của các protein này ở ngày 0.



Hình 3.7. Sự biểu hiện các protein liên quan đến chu kỳ tế bào 3T3 ở hai nhóm thí nghiệm được phân tích bằng Western blot. Các protein liên quan đến chu kỳ tế bào (Cyclin (A1+A2, D1), CDK (2, 4, 6)), Gapdh: Protein đối chứng.

Sự sinh trưởng của tế bào gắn liền với chu kỳ tế bào. Một chu kỳ của tế bào bao gồm bốn giai đoạn cơ bản: pha G0/G1 (pha nghỉ), pha S (tổng hợp DNA), pha G2 (giai đoạn tổng hợp protein và chuẩn bị cho nguyên phân) và pha M (nguyên phân). Cyclins và CDKs (cyclin-dependent kinases) là hai nhóm

phân tử đóng vai trò chính trong việc điều hòa chu kỳ tế bào [69]. Cyclin A1 và A2 đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn S và chuyển tiếp G2/M trong tất cả các tế bào tăng sinh [1, 71-74]. CDK4 và CDK6 kết hợp với Cyclin D để tạo ra các phức hợp thúc đẩy quá trình chuyển từ pha G1 sang pha S [77]. CDK2 là enzyme đóng vai trò thiết yếu trong quá trình tổng hợp DNA của chu kỳ tế bào [1, 75], có thể gắn với Cyclin E và kích hoạt quá trình chuyển giao từ pha G1 sang pha S [75]

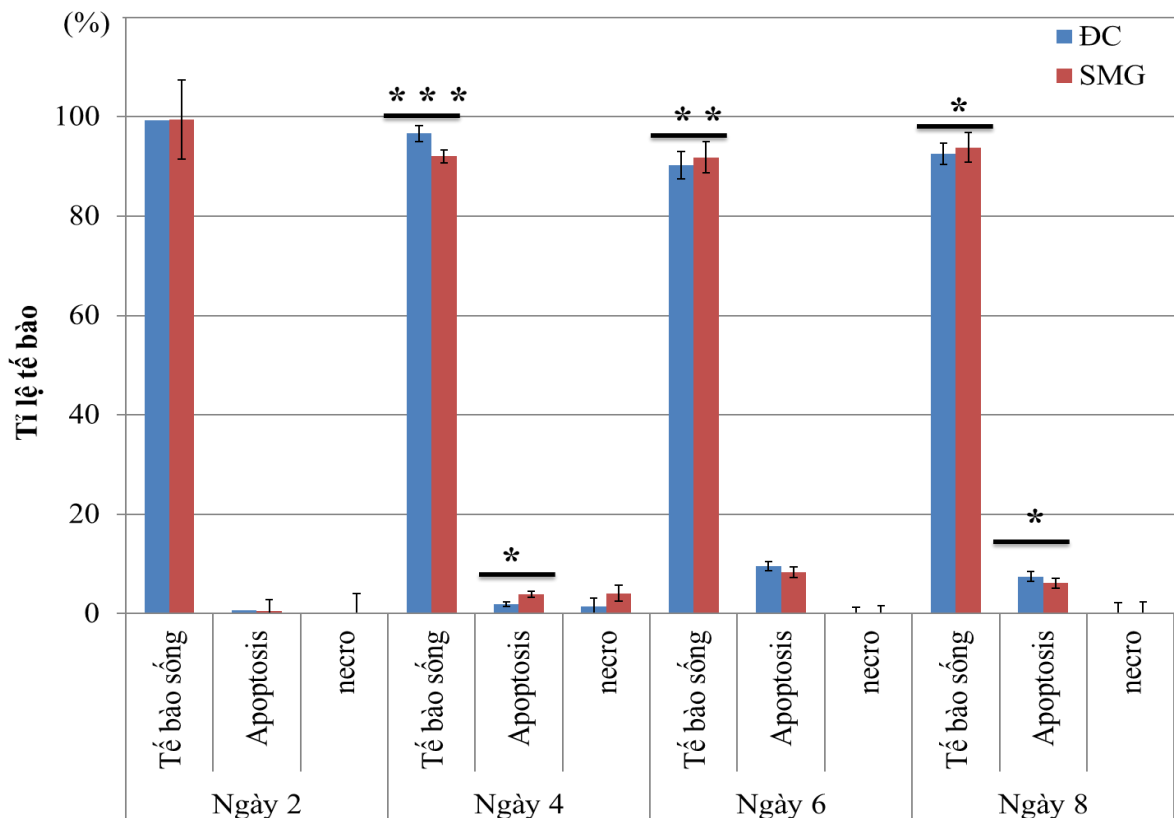
Qua kết quả đánh giá biểu hiện protein bằng Western Blot ở hình 3.9, sự biểu hiện của các protein liên quan đến chu kỳ tế bào (Cyclin A1+ A2, Cyclin D1, CDK2, CDK4, CDK6) thấp hơn so với nhóm đối chứng vào ngày thứ 3, dẫn đến sự kích thích tế bào vào pha nghỉ (tại pha G0/G1) và gây cản trở các tế bào đi vào pha S và chuyển tiếp G2/M ngày thứ 4. Tuy nhiên, sự biểu hiện các protein này của tế bào 3T3 ở nhóm SMG bắt đầu tăng lên, mạnh hơn so với nhóm đối chứng vào ngày thứ 5, do các tế bào đã thích nghi và thoát khỏi pha G0/G1 và phục hồi sự tăng sinh, tiến vào pha S. Biểu hiện của các protein liên quan đến chu kỳ tế bào ở các tế bào 3T3 giảm vào ngày thứ 7, tuy nhiên mức độ biểu hiện protein của nhóm SMG vẫn cao hơn so với nhóm đối chứng, dẫn đến sự kích thích tế bào 3T3 thoát khỏi pha G0/G1 và bước vào giai đoạn tổng hợp DNA ở pha S. Kết quả đánh giá biểu hiện protein này tương đương với kết quả đánh giá chu kỳ tế bào ở thí nghiệm trước đó.

Qua đó, có thể thấy điều kiện vi trọng lực đã làm giảm biểu hiện của các protein điều hòa chu kỳ tế bào (Cyclin (A1, A2, D1), CDK (2, 4, 6)) ngày thứ 3, từ đó kích thích và làm cho các tế bào 3T3 tăng cường đi vào pha nghỉ (tại pha G0/G1) và gây cản trở làm chậm quá trình phân chia tế bào vào ngày thứ 4, chứng tỏ cơ chế tăng sinh của tế bào đã bị ức chế. Tuy nhiên, khi tiếp xúc với điều kiện vi trọng lực trong thời gian dài (6-8 ngày), các tế bào sẽ thích nghi với điều kiện này và phục hồi sự phát triển bình thường bằng cách thúc đẩy tăng cường sự biểu hiện của các protein điều hòa chu kỳ tế bào, kích thích và tăng cường các tế bào 3T3 tiến vào pha S và chuyển tiếp G2/M, khôi phục khả năng tăng sinh.

3.2. Nội dung 2: Đánh giá sức sống của tế bào

Khả năng sống đóng vai trò quan trọng trong sự tăng sinh quần thể tế bào. Tỷ lệ sống của tế bào được đánh giá bằng phương pháp phân tích dòng chảy tế bào flow cytometry.

Kết quả phân tích theo biểu đồ hình 3.8 và bảng 3.6, kết quả cho thấy không có sự khác biệt trong tỷ lệ tế bào 3T3 sống ở nhóm đối chứng và SMG vào ngày 2 (lần lượt là $99.3 \pm 0.1\%$ và $99.4 \pm 0.2\%$). Tỷ lệ tế bào sống giảm từ ngày 2 đến ngày 6 và có sự tăng nhẹ vào ngày 8 ở cả 2 nhóm (hình 3.8). Vào ngày 4, tỷ lệ bào sống của nhóm đối chứng cao hơn nhóm SMG ($96.6 \pm 0.1\%$ so với $92.0 \pm 0.3\%$) ($P < 0.001$). Ngược lại, tỷ lệ tế bào sống của nhóm chịu ảnh hưởng của SMG cao hơn nhóm đối chứng vào các ngày 6, lần lượt là $91.8 \pm 0.6\%$ và $90.2 \pm 0.3\%$ ($P < 0.01$), và ngày 8 ($93.8 \pm 0.7\%$ và $92.5 \pm 0.3\%$) ($P < 0.05$).

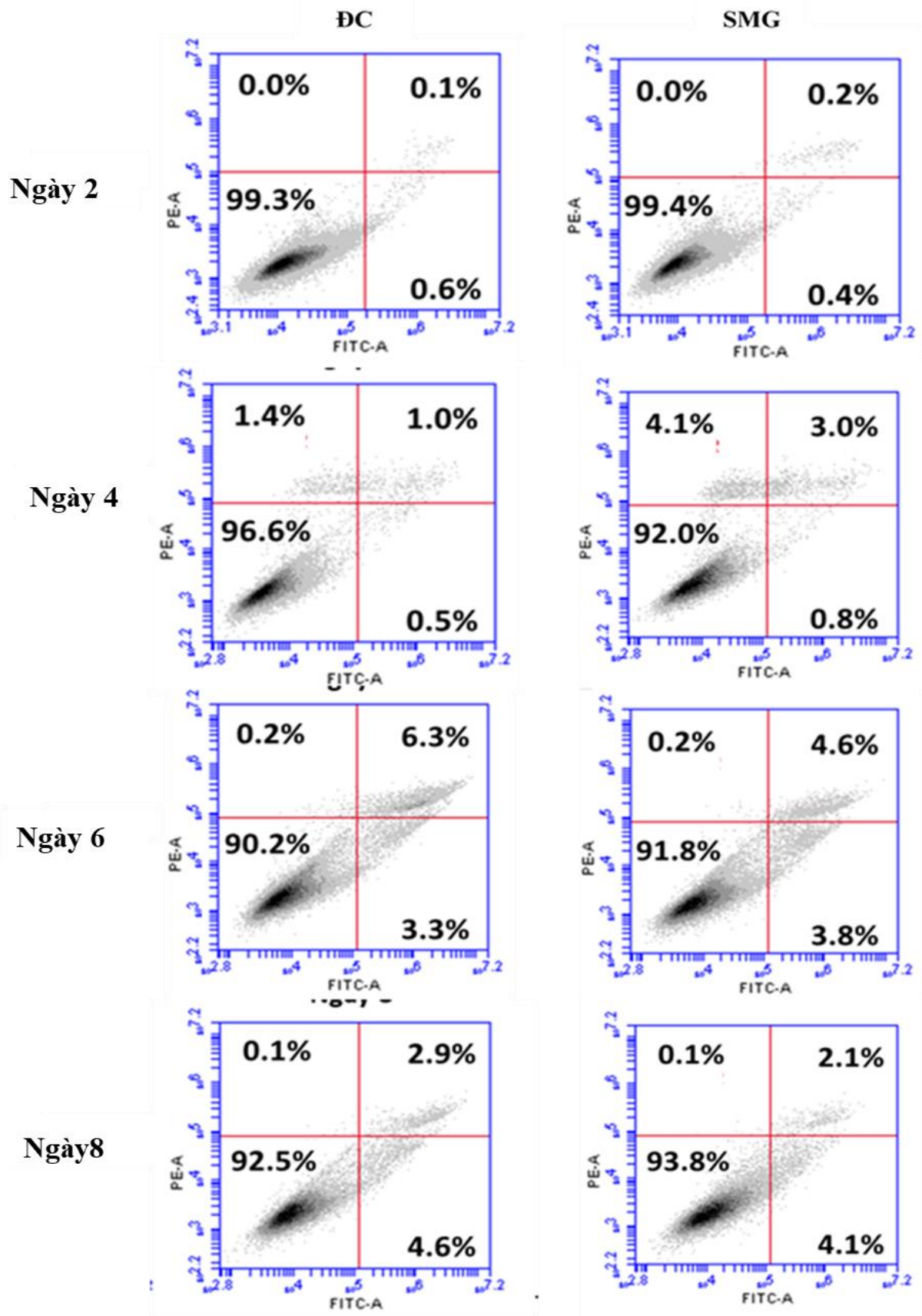


Hình 3.8 Biểu đồ thể hiện phần trăm tỷ lệ tế bào sống và tế bào chết-Apoptosis trong các khoảng thời gian khảo sát. * chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.05$). ** chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.01$). *** chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.001$)

Bảng 3.2. Bảng tỷ lệ tế bào 3T3 sống/chết (Apoptosis) ở nhóm đối chứng và SMG qua các khoảng thời gian khảo sát. ^a: chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.001$), ^b: chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.01$), ^c: chỉ thị sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG ($p < 0.05$)

Phần trăm (%)	Ngày 2		Ngày 4		Ngày 6		Ngày 8	
	ĐC	SMG	ĐC	SMG	ĐC	SMG	ĐC	SMG
Tế bào sống	99.3 ± 0.1	99.4 ± 0.2	96.6 ± 0.1 ^a	92.0 ± 0.3 ^a	90.2 ± 0.3 ^b	91.8 ± 0.6 ^b	92.5 ± 0.3 ^c	93.8 ± 0.7 ^c
Tế bào Apoptosis	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1 ^c	3.9 ± 0.6 ^c	0.9 ± 0.3	8.4 ± 0.8	7.5 ± 0.3 ^c	6.1 ± 0.7 ^c

Kết quả phân tích Apoptosis theo biểu đồ hình 3.8 và hình 3.9, tỷ lệ tế bào 3T3 bị apoptosis ở nhóm đối chứng và nhóm SMG rất thấp và không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê trong 2 ngày đầu nuôi cấy. Tuy nhiên, tỷ lệ tế bào 3T3 bị apoptosis ở ngày thứ 4 nuôi cấy cao hơn nhóm đối chứng, lần lượt là $3.9 \pm 0.6\%$ và $1.9 \pm 0.1\%$ ($p < 0.05$). Tỷ lệ tế bào 3T3 bị apoptosis ghi nhận sự tiếp tục tăng lên đồng thời ở nhóm đối chứng và nhóm SMG, tuy nhiên lại không ghi nhận sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm tế bào sau 6 ngày nuôi cấy. Vào ngày nuôi cấy thứ 8, tỷ lệ tế bào 3T3 bị apoptosis của nhóm SMG thấp hơn so với nhóm đối chứng, lần lượt là $6.1 \pm 0.7\%$ và $7.5 \pm 0.3\%$ ($p < 0.05$).



Hình 3.9. Phân tích apoptosis bằng flow cytometry

Các nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng sự phát triển của tế bào bị giảm dưới điều kiện SMG. Một nghiên cứu khác cho thấy sự phát triển của các tế bào gốc trung mô tủy xương có thể bị ức chế do việc chặn ở pha G2/M dưới điều kiện SMG [16]. Hơn nữa, một nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng SMG cũng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư bằng cách chuyển đổi về cơ chế trao đổi chất phân hủy cho các chức năng bảo trì [41]. Những nghiên cứu này áp dụng điều kiện SMG trong thời gian ngắn (2–4 ngày) để đánh giá sự phát triển tế bào.

Nghiên cứu hiện tại cho thấy sự giảm dần tỷ lệ sống tế bào, đặc biệt là từ ngày 2 đến ngày 6 đồng thời ở cả hai nhóm và có sự tăng nhẹ vào ngày thứ 8. Tỷ lệ tế bào sống ở nhóm vi trọng lực thấp hơn nhóm đối chứng trong khi tỷ lệ tế bào bị Apoptosis ở nhóm vi trọng lực lại cao hơn nhóm đối chứng sau 4 ngày nuôi cấy. Kết quả này cho thấy điều kiện SMG gây giảm hoạt động phát triển, sức sống của các tế bào 3T3 sau 4 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, tỷ lệ tế bào sống ở nhóm SMG tăng lên và cao hơn nhóm đối chứng ở các ngày nuôi cấy thứ 6 và thứ 8. Đồng thời trong cùng các khoảng thời gian đó, tỷ lệ tế bào 3T3 bị apoptosis của nhóm SMG thấp hơn so với nhóm đối chứng (Hình 3.8, hình 3.9). Kết quả này cho thấy sau khi tiếp xúc với điều kiện SMG ở thời gian đủ dài (6–8 ngày), các tế bào 3T3 sẽ thích nghi và hồi phục sự tăng sinh và sức sống của mình.

Như vậy, sức sống của các tế bào 3T3 sẽ bị suy giảm trong khoản thời gian đầu tiếp xúc với điều kiện vi trọng lực. Tuy nhiên, các tế bào sẽ thích ứng và khôi phục sự tăng sinh của mình sau khi tiếp xúc ở thời gian đủ dài. Kết hợp với kết quả ở nội dung 1, có thể thấy sự ức chế tăng sinh của tế bào 3T3 trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng gây ra bởi sự giảm biểu hiện các protein điều hòa chu kỳ tế bào. Những protein này trong 3T3 đã kích hoạt và gây ra sự bắt giữ các tế bào trong pha G0/G1 và làm chậm quá trình phân chia tế bào. Tuy nhiên, khi sự biểu hiện của các protein điều hòa chu kỳ tế bào tăng lên, tỷ lệ tế bào sống của các tế bào này tăng lên chứng tỏ các tế bào này đã được khôi phục khỏi giai đoạn bắt giữ và đạt được mức tăng sinh cao.

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Với mục tiêu đánh giá sự ảnh hưởng của thời gian lên khả năng tăng sinh và sức sống của tế bào nguyên bào sợi chuột trong điều kiện nuôi cấy vi trọng lực, đề tài đạt được kết quả như sau:

Mật độ tế bào 3T3 bị suy giảm vào ở giai đoạn 2-4 ngày nuôi cấy cảm ứng vi trọng lực. Tuy nhiên, tế bào 3T3 sẽ dần thích nghi và hồi phục sự tăng sinh với điều kiện vi trọng lực sau khi cảm ứng ở thời gian dài (6-8 ngày).

Hình dạng nhân tế bào 3T3 không có sự thay đổi rõ rệt về kích thước nhân ở giai đoạn 2-4 ngày nuôi cấy cảm ứng vi trọng lực. Tuy nhiên, hình dạng nhân tế bào 3T3 trở nên to hơn sau khi cảm ứng ở thời gian dài (6-8 ngày).

Điều kiện vi trọng lực có tác dụng thúc đẩy tế bào 3T3 đi vào pha nghỉ ở giai đoạn 2-4 ngày nuôi cấy cảm ứng vi trọng lực, giảm sự phân chia bằng cách giảm biểu hiện các protein điều hòa chu kỳ tế bào (Cyclin A1+ A2, Cyclin D1, CDK2, CDK4, CDK6). Tuy nhiên, sau khi cảm ứng ở thời gian dài (6-8 ngày), các tế bào sẽ thích nghi và khôi phục với điều kiện vi trọng lực thông qua tăng cường sự biểu hiện của các yếu tố điều hòa chu kỳ tế bào, cảm ứng các tế bào 3T3 chuyển từ pha nghỉ sang pha phân chia.

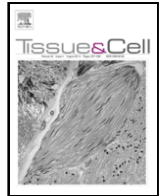
Điều kiện vi trọng lực mô phỏng ảnh hưởng đến sức sống của tế bào 3T3 theo thời gian nuôi cấy cảm ứng. Sức sống của các tế bào 3T3 bị suy giảm, tỷ lệ tế bào sống giảm và tỷ lệ tế bào bị apoptosis tăng ở giai đoạn 2-4 ngày nuôi cấy cảm ứng vi trọng lực. Tuy nhiên, sau khi thích ứng với điều kiện vi trọng lực mô phỏng (6-8 ngày), sức sống được ghi nhận đã phục hồi ở tế bào 3T3, tỷ lệ tế bào sống tăng và tỷ lệ tế bào bị apoptosis giảm.

4.2. Kiến nghị

Qua nhiều báo cáo, thời gian thử nghiệm và đặc trưng của dòng tế bào cũng là nhân tố tác động đến sự sinh trưởng và chu kỳ tế bào. Do đó, trong nghiên cứu sắp tới, sẽ tiếp tục đánh giá khả năng tăng sinh, chu kỳ tế bào và sức sống tế bào ở điều kiện bình thường sau khi cảm ứng vi trọng lực để làm rõ hơn các cơ chế và sự thích ứng của tế bào của sinh vật với điều kiện bình thường sau khi được cảm ứng với vi trọng lực.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. The adaptation of 3T3 cells to simulated microgravity by retrieving the major cell cycle-related protein expression during long-term in vitro. *Tissue and Cell*. Volume 89. August 2024. 102460.
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102460>



The adaptation of 3T3 cells to simulated microgravity by retrieving the major cell cycle-related protein expression during long-term in vitro proliferation

Chi Nguyen Quynh Ho^{a,1}, Son Nghia Hoang^{a,1}, Hanh Hong Nguyen^a, Han Thai Minh Nguyen^{a,b}, Han Thi Truong^c, Quynh Thi Truc Nguyen^a, Cang Ngoc Ly^a, Long Thanh Le^{a,*}

^a Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology, Ho Chi Minh City, Viet Nam

^b Biotechnology Innovation Center, University of New Hampshire, Manchester, NH 03101, USA

^c Department of Biophysics, Sungkyunkwan University, Suwon, South Korea

ARTICLE INFO

Keywords:

3T3 cells
Cell cycle regulator
Proliferation
Simulated microgravity
Viability

ABSTRACT

The present study aimed to assess the effects of simulated microgravity (SMG) on 3T3 cell proliferation and the expression of cell cycle regulators. 3T3 cells were induced to SMG by Gravite® for 8 days, while the control group was treated with 1G condition. The result showed that the SMG condition causes a decrease in proliferative activity in 3T3 cells. In the SMG group, the expression of cell cycle-related proteins was lower than the control on day 3. However, these proteins were upregulated in 3T3 cells of the SMG group on day 5, suggesting that these cells were rescued from the arrest and retrieved a higher proliferation. A down-regulation of cell cycle-related proteins was observed in 3T3 cells of both SMG and control groups on day 7. In conclusion, SMG results in the attenuation of cell proliferation during the initial exposure to SMG, but the cells will adapt to this condition and retrieve normal proliferation by increasing the expression of cell cycle regulators.

1. Introduction

Simulated microgravity (SMG) can affect cell proliferation and metabolism in different ways, depending on the used microgravity simulators and the type of cell lines (Grimm et al., 2020; Li et al., 2020; Shi et al., 2021). The recent study reported that there was no difference in the proliferation of adipose-tissue-derived mesenchymal stromal cells between the control group (1G) and the SMG condition induced by random positioning machine (Ratushnyy et al., 2019). The decreased proliferation was reported in mouse mesenchymal stem cells under SMG conditions using 1D clinostat (Touchstone et al., 2019). However, the increased proliferation was observed in human mesenchymal stem cells, which induced SMG by 3D clinostat (Yuge et al., 2006). 3T3, a cell line of mouse embryonic fibroblasts, is frequently employed to assess the degree of proliferation in response to environmental changes because of its sensitive characteristics related to proliferation. SMG condition has been shown to reduce apoptosis in mice fetal fibroblasts (Beck et al., 2012). Yang et al.' (2016) work shown that SMG could modify the mRNA expression of circadian genes and produce a shift in Per1 and

Per2 expression, hence altering the circadian rhythm of 3T3 cells. Because fibroblasts are highly sensitive to SMG, Zhou et al. (2023) have shown the potential importance of the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in controlling wound healing. According to a recent study, the main impacts of changed gravity on fibroblasts' structures and the delay of their migration include changes in fibroblast function associated to wound healing (Radstake et al., 2023). For long-term in vitro culture, the modification of the cell cycle progression and the expression of key cell cycle-related regulators have not been thoroughly studied. Moreover, the cell capacity in retrieving these regulators has not been still well understood. Thus, the present study was conducted to assess the effects of SMG condition on 3T3 cell proliferation, especially in cell cycle progression, and expression of the main regulators.

* Corresponding author.

E-mail address: longlt@itb.ac.vn (L.T. Le).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102460>

Received 12 February 2024; Received in revised form 31 May 2024; Accepted 1 July 2024
0040-8166/© 20XX

2. Methods

2.1. Cell culture and SMG induction

The culture media utilized in the research for 3T3 cells was DMEM/Ham's F-12 (DMEM-12-A, Capricorn Scientific, Germany), supplemented with 15 % FBS (FBS-HI-22B, Capricorn Scientific, Germany) and 1 % Pen/Strep (15140-122, Gibco, United States). To prevent fluid shearing, the culture media was gradually added to sterile T-25 Flasks (160430, Thermo Scientific, USA) and 96-well plates (161093, Thermo Scientific, USA) without creating bubbles. The flasks or plates were put in a CO₂ incubator (MCO-18AIC, Sanyo Electric Co., Japan) after being fixed in the Gravity Controller Gravite® stage (AS ONE INTERNATIONAL, INC., Santa Clara, CA, United States) (Fig. 1). While the control group received treatment at 1G in the same CO₂ incubator, the 3T3

cells were subjected to simulated microgravity using Gravite®'s Mode C operation.

2.2. Cell density analysis

A density of 1×10^3 cells/well was seeded after the culture media was filled to a maximum of 395 μ l in each well. Prior to inducing simulated microgravity in the cells, the plate was covered with parafilm tape. After 30 min of staining with Hoechst 33342 (14533, Sigma-Aldrich, USA), the cell nuclei were three times rinsed with phosphate-buffered saline (Gibco, Germany). Following washing, the fluorescence Cytell Microscope's Cell Cycle App was used to quantify the nuclei and cell number (GE Healthcare, United States).

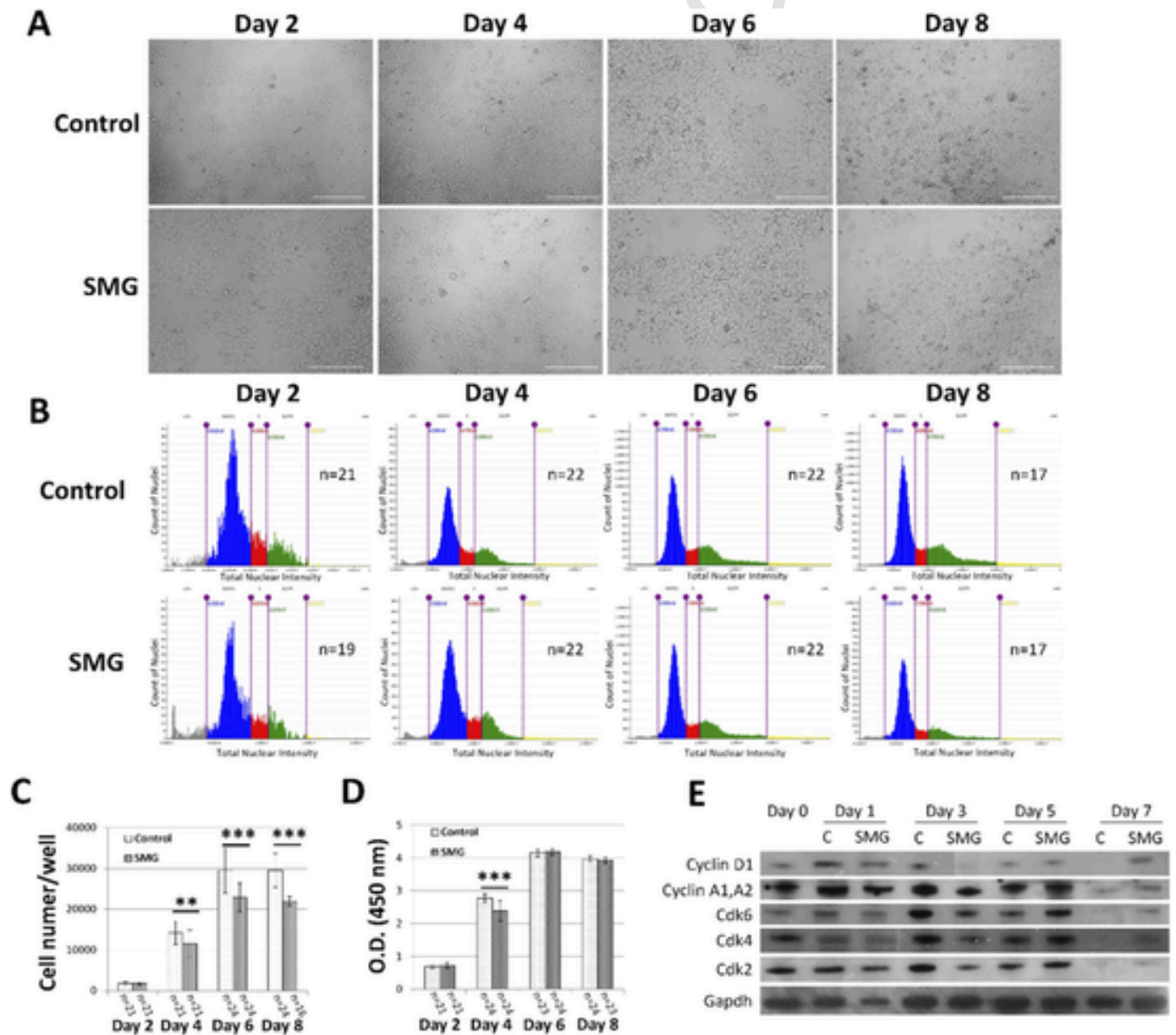


Fig. 1. Changes in 3T3 cell proliferation. A: Morphology of 3T3 cells, scale bar = 223.64 μ m. B: Cell cycle progression analyzed by Cell Cycle App. from Cytell microscope. C: Cell number counted by Cell Cycle App. D: The O.D. value of the cells measured by WST-1 assay. E: The expression of cell cycle-related proteins in the 3T3 cells from the control and the SMG group. *** indicates a significant difference between the control group and the SMG group ($p < 0.001$); ** indicates a significant difference between the control group and the SMG group ($p < 0.01$).

2.3. WST-1 assay

The proliferation of 3T3 cells was evaluated using the WST-1 test. In order to imitate microgravity, these cells were seeded at a density of 1×10^3 cells/well in 96-well plates. The old culture media in each well was then replaced with 100 μ l of new medium and 10 μ l of WST-1 solution (11644807001, Roche, Switzerland), and the mixture was incubated for 3.5 hours at 37 °C with 5 % CO₂. At Optical Density 450 (O.D. 450), the wells were subsequently measured using a GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader (Promega, United States).

2.4. Western blotting analysis

The 3T3 cells were collected from T-25 flasks and lysed using LDS Sample Buffer (ab119196, Abcam, United States). Subsequently, the same amounts of the protein samples were put onto an SDS-PAGE gel (ab139596, Abcam, United States). Gel running was performed with Running buffer (ab119197, Abcam, United States) at 50 V for 2 h, and the protein were then transferred to PVDF membrane (ab133411, Abcam, United States) at 90 V for 2 h. The primary antibody incubation was performed for the membrane for an entire night at 4 °C after it had been treated with blocking buffer (ab126587, Abcam, United States) for 1 h at room temperature. The following antibodies were used at a 1:5000 dilution: anti-Cyclin A1/A2 (ab185619, Abcam, United States), anti-Cyclin D1 (ab40754, Abcam, United States), anti-cdk2 (ab32147, Abcam, United States), anti-Cdk4 (ab137675, Abcam, United States), and anti-Cdk6 (ab124821, Abcam, United States). The Anti-GAPDH antibody (ab181602, Abcam, United States) was utilized as the control at a dilution of 1:10,000. The membrane was then incubated with the secondary antibody for one hour at room temperature after being cleaned three times with TBST, each time taking 10 min. The Goat Anti-Rabbit IgG (ab6721, Abcam, United States) was used to against the primary antibodies. X-ray film was used for imaging, and the ECL Kit (ab65623, Abcam, United States) was used to visualize the blots.

2.5. Statistical analysis

The data was analyzed using the one-way ANOVA for statistical significance; a P value of less than 0.05 was deemed statistically significant.

3. Results and discussion

3T3 cells were induced simulated microgravity (Mode C operation of Gravite®) while the control group was treated at 1G in the same CO₂ incubator. The results showed that 3T3 cells in both groups exhibited similar morphological characteristics during *in vitro* culture (Fig. 1A). To evaluate the cell proliferation, cell cycle progression and cell number were determined in both groups. As seen in Fig. 1B, 3T3 cells from the control group and SMG group showed similar ratio of cells in G0/G1 phase at day 2 ($60.44 \pm 12.93\%$ vs. $59.08 \pm 7.97\%$, respectively). A higher ratio of G0/G1 phase cells was observed in the SMG group compared to the control group at day 4 ($66.49 \pm 1.29\%$ vs. $63.18 \pm 1.61\%$, respectively). There was no difference in the ratio of G0/G1 cells between the control group and the SMG group at day 6 ($58.22 \pm 2.72\%$ vs. $58.93 \pm 3.12\%$, respectively) and day 8 ($60.07 \pm 2.13\%$ vs. $61.08 \pm 2.98\%$, respectively).

The control group and the SMG group showed a similar growth rate of 3T3 cells on day 2, proved by the density at 1807 ± 442 cells/well and 1805 ± 347 cells/well, respectively (Fig. 1C). On day 6, cell density of the two groups was twice as high as on day 4. Both groups did not differ in cell density between days 6 and 8. However, there was a difference in 3T3 cell proliferation between the two groups from day 4 to day 8. Cells in the SMG group exhibited a lower proliferation compared with the control group.

The cell growth was also estimated using the WST-1 assay. As seen in Fig. 1D, 3T3 cells from both groups showed the same O.D. value at day 2 (0.69 ± 0.05 vs. 0.73 ± 0.08 , respectively). The O.D. value of 3T3 cells from the control group increased higher than the SMG group at day 4 (2.78 ± 0.12 vs. 2.39 ± 0.31 , respectively). However, there was no difference in the O.D. value of 3T3 cells between the control group and the SMG group on day 6 and day 8.

Western blotting was then used to further evaluate the expression of proteins relevant to the cell cycle (Fig. 1E). At day 1, 3T3 cells from both groups maintained a similar expression of these proteins to day 0. However, 3T3 cells from the SMG groups showed a lower expression of these proteins compared to the control group at day 3. Interestingly, there was an upheaval in the 3T3 cells in the SMG group on day 5, when the expression of the cyclins and cdks was increased. On day 7, 3T3 cells exhibited a down-regulation of these proteins in both groups.

Previous studies have reported that cell proliferation was reduced by SMG conditions (Damm et al., 2013; Touchstone et al., 2019). Another study revealed that the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells could be inhibited by the blocking in the G2/M phase under SMG conditions (Yan et al., 2015). Furthermore, a recent study has demonstrated that SMG also inhibited tumor cell growth by reverting to catabolic metabolic machinery for housekeeping functions (Tan et al., 2018). These studies applied SMG conditions in short-term (2–4 days) for evaluating cell proliferation. The present study found that the attenuated proliferation of 3T3 cells treated with SMG was not only observed in the first 4 days but also prolonged to days 6 and 8. This result indicated that the SMG condition causes a decrease in proliferative activity in 3T3 cells.

There are few studies evaluating the effects of SMG on mammalian cells over a long period of culture. An increase in growth areas of mouse embryonic stem cells was determined at day 5 in spaceflight, and then they started decreasing at day 6 (Lei et al., 2018). A recent study showed that long-term exposure to SMG (11 days) induced protein degradation processes in human primary macrophages. Furthermore, the degradation of glucogenic and ketogenic amino acids was observed in these cells (Thiel et al., 2021). However, the relationship between changes in cell proliferation and expression of main cell cycle-related proteins has not well understood. Cyclins and Cdks make essential contributions to cell division, which promotes cell proliferation and keeps significant parts in cell cycle progression (Sherr and Roberts, 2004). Cyclins A1 and A2 are known to play important roles in the S phase and G2/M transition (Loukil, 2015). Cyclin D and CDK4/CDK6 complexes control the cell progression through G1 and G1/S transitions (Tigan et al., 2016). In the present investigation, 3T3 cells from the control group maintain high expression of these proteins during the proliferation until day 5. However, the expression of cell cycle-related proteins was markedly reduced in control 3T3 cells at day 7, which correlated to the full confluence of cell expansion. In the SMG group, the expression of cell cycle-related proteins was lower than the control on day 3, resulting in the induction of cells to the arrest phase (at G0/G1 phase) and reducing cell division on day 4. However, these proteins were upregulated in 3T3 cells of the SMG group on day 5, suggesting that these cells were rescued from the arrest and retrieved a higher proliferation at day 6. A similar down-regulation of cell cycle-related proteins was observed in 3T3 cells of SMG group on day 7. This reduction occurred in 3T3 cells of the SMG group even though the density of these cells has not reached full confluence, indicating that the SMG condition may cause a restriction on cell growth in space. In conclusion, SMG results in the attenuation of cell proliferation during the initial exposure to SMG, but the cells will adapt to this condition and retrieve normal proliferation by increasing the expression of cell cycle regulators.

CRediT authorship contribution statement

Quynh Thi Truc Nguyen: Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Han Thi Truong:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Han Thai Minh Nguyen:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Hanh Hong Nguyen:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Cang Ngoc Ly:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Long Thanh Le:** Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Conceptualization. **Son Nghia Hoang:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Chi Nguyen Quynh Ho:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation.

Uncited references

Mao et al., 2016; Plett et al., 2004.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This work was supported by the Vietnam Academy of Science and Technology under Grant NVCC16.01/22-23.

References

- Beck, M., Tabury, K., Moreels, M., Jacquet, P., Van Oostveldt, P., De Vos, W.H., Baatout, S., 2012. Simulated microgravity decreases apoptosis in fetal fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* 30, 309–313. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1001>.
- Damm, T.B., Richard, S., Tanner, S., Wyss, F., Egli, M., Franco-Obregón, A., 2013. Calcium-dependent deceleration of the cell cycle in muscle cells by simulated microgravity. *FASEB J.* 27, 2045–2054. <https://doi.org/10.1096/fj.12-218693>.
- Grimm, D., Wehland, M., Corydon, T.J., Richter, P., Prasad, B., Bauer, J., Egli, M., Kopp, S., Lebert, M., Krüger, M., 2020. The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* 9 (8), 882–894. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0084>.
- Lei, X., Cao, Y., Zhang, Y., Qian, J., Zhao, Q., Liu, F., Zhang, T., Zhou, J., Gu, Y., Xia, G., Duan, E., 2018. Effect of microgravity on proliferation and differentiation of embryonic stem cells in an automated culturing system during the TZ-1 space mission. *Cell Prolif.* 51 (5), e12466. <https://doi.org/10.1111/cpr.12466>.
- Li, B.B., Chen, Z.Y., Jiang, N., et al., 2020. Simulated microgravity significantly altered metabolism in epidermal stem cells. *Vitr. Cell Dev. Biol.-Anim.* 56, 200–212. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00435-8>.
- Loukil, A., 2015. Cyclin A2: at the crossroads of cell cycle and cell invasion. *World J. Biol. Chem.* 6, 346. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i4.346>.
- Mao, X., Chen, Z., Luo, Q., Zhang, B., Song, G., 2016. Simulated microgravity inhibits the migration of mesenchymal stem cells by remodeling actin cytoskeleton and increasing cell stiffness. *Cytotechnology* 68, 2235–2243. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-0007-x>.
- Plett, P.A., Abonour, R., Frankovitz, S.M., Orschell, C.M., 2004. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 32, 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.03.014>.
- Radstake, W.E., Gautam, K., Miranda, S., Rompay, C.V., Vermeesen, R., Tabury, K., Verslegers, M., Dowson, A., Gorissen, J., van Loon, J.J.W.A., Savage, N.D.L., Baatout, S., Baselet, B., 2023. Gravitational effects on fibroblasts' function in relation to wound healing. *NPJ Microgravity* 9, 48. <https://doi.org/10.1038/s41526-023-00286-z>.
- Ratushnyy, A., Yakubets, D., Andreeva, E., Buravkova, L., 2019. Simulated microgravity modulates the mesenchymal stromal cell response to inflammatory stimulation. *Sci. Rep.* 9, 9279. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45741-8>.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M., 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 18, 2699–2711. <https://doi.org/10.1101/gad.1256504>.
- Shi, L., Tian, H., Wang, P., et al., 2021. Spaceflight and simulated microgravity suppresses macrophage development via altered RAS/ERK/NFκB and metabolic pathways. *Cell. Mol. Immunol.* 18, 1489–1502. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0346-6>.
- Tan, X., Xu, A., Zhao, T., Zhao, Q., Zhang, J., Fan, C., Deng, Y., Freywald, A., Genth, H., Xiang, J., 2018. Simulated microgravity inhibits cell focal adhesions leading to reduced melanoma cell proliferation and metastasis via FAK/RhoA-regulated mTORC1 and AMPK pathways. *Sci. Rep.* 8, 3769. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20459-1>.
- Thiel, C.S., Vahlensieck, C., Bradley, T., Tauber, S., Lehmann, M., Ullrich, O., 2021. Metabolic dynamics in short- and long-term microgravity in human primary macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (13), 6752. <https://doi.org/10.3390/ijms22136752>.
- Tigan, A.-S., Bellutti, F., Kollmann, K., Tebb, G., Sexl, V., 2016. CDK6—a review of the past and a glimpse into the future: from cell-cycle control to transcriptional regulation. *Oncogene* 35, 3083–3091. <https://doi.org/10.1038/ncr.2015.407>.
- Touchstone, H., Bryd, R., Loiate, S., Thompson, M., Kim, S., Puranam, K., Senthilnathan, A.N., Pu, X., Beard, R., Rubin, J., Alwood, J., Oxford, J.T., Uzer, G., 2019. Recovery of stem cell proliferation by low intensity vibration under simulated microgravity requires LINC complex. *NPJ Microgravity* 5, 11. <https://doi.org/10.1038/s41526-019-0072-5>.
- Yan, M., Wang, Y., Yang, M., Liu, Y., Qu, B., Ye, Z., Liang, W., Sun, X., Luo, Z., 2015. The effects and mechanisms of clinorotation on proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.034>.
- Yuge, L., Kajitume, T., Tahara, H., Kawahara, Y., Umeda, C., Yoshimoto, R., Wu, S.-L., Yamaoka, K., Asashima, M., Kataoka, K., Ide, T., 2006. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem Cells Dev.* 15, 921–929. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.15.921>.
- Zhou, Y., Lv, W., Peng, X., Cheng, Y., Tu, Y., Song, G., Luo, Q., 2023. Simulated microgravity attenuates skin wound healing by inhibiting dermal fibroblast migration via F-actin/YAP signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* 238, 2751–2764. <https://doi.org/10.1002/jcp.31126>.



Tissue and Cell

Supports open access

3.9
CiteScore

2.7
Impact Factor

Articles & Issues

About

Publish

Order journal

Search in this journal

Submit your article

Guide for authors

Volume 89

August 2024

Download full issue

Previous vol/issue

Next vol/issue

Actions for selected articles

Receive an update when the latest issues in this journal are published

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ogneva, I.V., Single cell in a gravity field, *Life*, 2022. **12**(10): p. 1601.
2. Takahashi, K., et al., 2021, Gravity sensing in plant and animal cells, *npj Microgravity*, **7**(1): p. 2.
3. Rahimi, A.M., M. Cai, and S. Hoyer-Fender, 2022, Heterogeneity of the NIH3T3 Fibroblast Cell Line, *Cells*, **11**(17): p. 2677.
4. Tran, M.T., et al., Morphological Changes of 3T3 Cells under Simulated Microgravity, *Cells*, 2024. **13**(4): p. 344.
5. Littlefield, J.W., 1982, NIH 3T3 Cell Line, *Science*, 218(4569): p. 214-216.
6. Will be called Cytion, C., Diverse Morphologies and Applications of NIH-3T3 Cells.
7. Morey-Holton, E.R., 2003, The impact of gravity on life, in Evolution on planet Earth, *Elsevier*. p. 143-159.
8. Carvil, P., 2017, Axial loading as a countermeasure to microgravity-induced deconditioning: effects on the spine and its associated structures, *King's College London London*.
9. Grimm, D., et al., 2020, The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells. *Stem cells translational medicine*. **9**(8): p. 882-894.
10. Li, B.-B., et al., 2020, Simulated microgravity significantly altered metabolism in epidermal stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. **56**: p. 200-212.
11. Shi, L., et al., 2021, Spaceflight and simulated microgravity suppresses macrophage development via altered RAS/ERK/NFκB and metabolic pathways. *Cellular & molecular immunology*. **18**(6): p. 1489-1502.
12. Ratushnyy, A., et al., 2019, Simulated microgravity modulates the mesenchymal stromal cell response to inflammatory stimulation. *Scientific Reports*. **9**(1): p. 9279.
13. Touchstone, H., et al., 2019, Recovery of stem cell proliferation by low intensity vibration under simulated microgravity requires LINC complex. *npj Microgravity*. **5**(1): p. 11.

14. Yuge, L., et al., 2006, Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem cells and development*. **15**(6): p. 921-929.
15. Beck, M., et al., 2012, Simulated microgravity decreases apoptosis in fetal fibroblasts. *International journal of molecular medicine*. **30**(2): p. 309-313.
16. Yan, M., et al., 2015, The effects and mechanisms of clinorotation on proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **460**(2): p. 327-332.
17. Zhou, Y., et al., 2023, Simulated microgravity attenuates skin wound healing by inhibiting dermal fibroblast migration via F-actin/YAP signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*. **238**(12): p. 2751-2764.
18. Radstake, W.E., et al., 2023, Gravitational effects on fibroblasts' function in relation to wound healing. *npj Microgravity*. **9**(1): p. 48.
19. Martin, E., & Hine, R. (Eds.), 2015, A dictionary of biology. *Oxford university press, USA*.
20. Cooper, G.M., 2000, The cell: a molecular approach. Sunderland (MA) Sinauer Associates. *Structure and Organization of Actin Filaments*.
21. Rubenstein, I., S.M. Wick, 2008, Cell. *World Book Online Reference Center*.
22. Murray, A.W., 2004, Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**: p. 221-234.
23. H. Lodish, A.B., S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, 2000, Overview of the cell cycle and its control. *In Molecular Cell Biology (4th ed.)*.
24. Hochegger, H., Takeda, S., & Hunt, T, 2008, Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature reviews Molecular cell biology*. **9**(11): p. 910-916.
25. J.B. Rogers, L.V., J. Wargo, Microgravity, 1997, A Teacher's Guide with Activities in Science, Mathematics, and Technology. Grades 5-12. *National Aeronautics and Space Administration*.
26. Chandler, D., 1991, Weightlessness and Microgravity. *Physics Teacher*. **29**(5): p. 312-13.

27. Rogers, M.J., G.L. Vogt, and M.J. Wargo, 1997, Microgravity: A Teacher's Guide with Activities in Science, Mathematics, and Technology. *Journal*. (Issue): p.
28. Bizzarri, M., M. Monici, and J.J. van Loon, 2015, How microgravity affects the biology of living systems. *BioMed research international*. **2015**.
29. Häder, D.-P., R. Hemmersbach, and M. Lebert, *Gravity and the behavior of unicellular organisms*. 2005: Cambridge University Press.
30. Koszelak, S., C. Leja, and A. McPherson, 1996, Crystallization of biological macromolecules from flash frozen samples on the Russian Space Station Mir. *Biotechnology and bioengineering*. **52**(4): p. 449-458.
31. Sachs, J.v., 1982, Über Ausschliessung der geotropischen und heliotropischen Krümmungen während des Wachstums. *Arbeiten Bot. Inst. Würzburg*. **2**: p. 209-225.
32. Herranz, R., et al., 2013, Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology*. **13**(1): p. 1-17.
33. Von Kampen, P., T. Könnemann, and H.J. Rath, 2010, The Drop Tower Bremen-An Overview. *38th COSPAR Scientific Assembly*. **38**: p. 4.
34. Briegleb, W., 1992, Some qualitative and quantitative aspects of the fast-rotating clinostat as a research tool. *ASGSB bulletin: publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*. **5**(2): p. 23-30.
35. Wuest, S.L., et al., 2015, Simulated microgravity: critical review on the use of random positioning machines for mammalian cell culture. *BioMed research international*. **2015**(1): p. 971474.
36. Böhmer, M. and E. Schleiff, 2019, Microgravity research in plants: A range of platforms and options allow research on plants in zero or low gravity that can yield important insights into plant physiology. *EMBO reports*. **20**(7): p. e48541.
37. Crucian, B.E., et al., 2018, Immune system dysregulation during spaceflight: potential countermeasures for deep space exploration missions. *Frontiers in immunology*. **9**: p. 1437.

38. Ulbrich, C., et al., 2014, The impact of simulated and real microgravity on bone cells and mesenchymal stem cells. *BioMed research international*. **2014**(1): p. 928507.
39. Garrett-Bakelman, F.E., et al., 2019, The NASA Twins Study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight. *Science*. **364**(6436): p. eaau8650.
32. Kim, Y.J., et al., 2020, Manufacturing and control of a robotic device for time-averaged simulated micro and partial gravity of a cell culture environment. *International Journal of Control, Automation and Systems*. **18**: p. 53-64.
33. Schwarz, R., 1991, Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: An application of simulated microgravity. *Tissue Culture Methods*. **13**: p. 4.
34. Demontis, G.C., et al., 2017, Human pathophysiological adaptations to the space environment. *Frontiers in physiology*. **8**: p. 547.
35. Udden, M.M., et al., 1995, Decreased production of red blood cells in human subjects exposed to microgravity. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. **125**(4): p. 442-449.
36. Furukawa, T., et al., 2018, Simulated microgravity attenuates myogenic differentiation via epigenetic regulations. *npj Microgravity*. **4**(1): p. 11.
37. Imura, T., et al., 2018, Stem cell culture in microgravity and its application in cell-based therapy. *Stem cells and development*. **27**(18): p. 1298-1302.
38. Otsuka, T., et al., 2018, Simulated microgravity culture enhances the neuroprotective effects of human cranial bone-derived mesenchymal stem cells in traumatic brain injury. *Stem cells and development*. **27**(18): p. 1287-1297.
39. Li, X., et al., 2011, Effects of wall vessel rotation on the growth of larval zebrafish inner ear otoliths. *Microgravity Science and Technology*. **23**: p. 13-18.
40. Gu, J., et al., 2023, Glycopolymer-grafted nanoparticles as glycosaminoglycan mimics with cell proliferation and anti-tumor metastasis activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. **253**: p. 126975

41. Mori, M., et al., 2024, Desert Hedgehog Down-regulation Mediates Inhibition of Proliferation by γ -Glutamylcyclotransferase Knockdown in Murine Glioblastoma Stem Cells. *Cancer Genomics & Proteomics*. **21**(5): p. 474-484.
42. A. Sokolovskaya, T.I., A. Bochenkova, A. Moscovtsev, V. Baranov, A. Kubatiev, 2014, Effects of simulated microgravity on cell cycle in human endothelial cells, *Acta Astronaut*, **99**: p. 16–23.
43. Jaffal, S., 2023, Effects of Pgf2 α On P-Erk1/2 Mapk Activation, Proliferation and Formation of Trans-Endothelial Tunnels in Swiss 3t3 Fibroblast Cells. *J. Pharmaceutics and Pharmacology Research*, **6**(2).
44. Le, K.-T., et al., 2023, Facilely preparing carboxymethyl chitosan/hydroxyethyl cellulose hydrogel films for protective and sustained release of fibroblast growth factor 2 to accelerate dermal tissue repair. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **82**: p. 104318.
45. Son, H.N., et al., *Effects of simulated microgravity on the morphology of mouse embryonic fibroblasts (MEFs)*. Romanian Biotechnological Letters, 2020. **25**(6): p. 2156-2160.
46. Brungs, S., et al., 2011, Effects of simulated weightlessness on fish otolith growth: clinostat versus rotating-wall vessel. *Advances in Space Research*. **48**(5): p. 792-798.
47. A.L. Radtke, M.M.H.-K., 2012, Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models. *J. Vis. Exp.* **62**: p. 3868.
48. Granet, C., et al., 1998, Rotating-wall vessels, promising bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions. *Medical and Biological Engineering and Computing*. **36**: p. 513-519.
49. JJ, B.A.V.L., 2009, Technology and developments for the random positioning machine. *RPM. Microgravity science and technology*. **21**: p. 287-292.
50. Aleshcheva G, W.M., Sahana J, Bauer J, Corydon TJ, Hemmersbach R & Grimm D, 2015, Moderate alterations of the cytoskeleton in human chondrocytes after short-term microgravity produced by parabolic flight maneuvers could be prevented by up-regulation of BMP-2 and SOX-9. *The FASEB Journal*. **29**(6): p. 2303-2314.
51. A. Sokolovskaya, T.I., A. Bochenkova, A. Moscovtsev, V. Baranov, A. Kubatiev, 2014, Effects of simulated microgravity on cell cycle in human endothelial cells. *Acta Astronaut*. **99**: p. 16–23.

52. T. Benavides Damm, I.W., S.L. Wüest, J. Sekler, M. Egli, 2014, Cell cultivation under different gravitational loads using a novel random positioning incubator. *Biotechnol. Bioeng.* **111**: p. 1180–1190.
53. A. Cazzaniga, J.M., S. Castiglioni, 2016, Impact of simulated microgravity on human bone stem cells: New hints for space medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (473): p. 181–186.
54. Todaro, G.G., H 1963, Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Bio.* **17**(2): p. 299–313.
55. Vanwanseele B, E.F., Knecht H, Stüssi E & Spaepen A, 2002, Knee cartilage of spinal cord–injured patients displays progressive thinning in the absence of normal joint loading and movement. *Arthritis & Rheumatism.* **46**(8): p. 2073-2078.
56. Plett, P.A., Abonour, R., Frankovitz, S. M., & Orschell, C. M, 2004, Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology.* **32**(8): p. 773-781.
57. Son HN, C.H., Thanh LNP, Han TT, Han NTM, Chung DC & Long LT 2020, Effects of simulated microgravity on the morphology of mouse embryonic fibroblasts (MEFs). *Romanian Biotechnological Letters.* **25**(6): p. 2156-2160.
58. Chi HNQ, H., HNQ, Chung DC & Son HN 2020, Inhibited growth of mesenchymal stem cells under simulated microgravity. . *Vietnam Journal of Biotechnology.* **18**(2): p. 257-264.
59. HN, C.H.S., 2020, Morphological changes of human mesenchymal stem cell under 3D clinostat culture. *Asian Jr. Of Microbiol. Biotech. Env.Sc.* **22**(3): p. 438-442.
60. Dai TX, S.H., Chi HNQ, Huy HNQ, Minh NT, Tram NTT, Huyen NTT, Quan TM, Chung DC, Nhung TH, Minh TT, Diem TH, Mai NTP, Long LT 2021, Simulated Microgravity Induces the Proliferative Inhibition and Morphological Changes in Porcine Granulosa Cells. *Current Issues in Molecular Biology.* **43**(3): p. 2210-2219.

61. Quynh Chi HN, N.S.H., Chinh Chung D, Huan LD, Hong Diem T & Long LT, 2020, Simulated microgravity reduces proliferation and reorganizes the cytoskeleton of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Physiological research*. **69**(5): p. 897–906.
62. Nhut DT, K.H., Tuan NX, Bien LT & Tung HT, 2022, In Vitro Growth and Development of Plants Under Stimulated Microgravity Condition. *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region*. Springer Singapore. p. 343-381.
63. Nhựt DT, T.N., Anh NTT, Nam NB, Huy NP, Tùng HT & Luận TC, 2017, Effects of simulated microgravity on seed germination, growth, development and accumulated secondary compounds of *Hibiscus sagittifolius* Kurz. cultured in vitro. *Vietnam Journal of Biotechnology*. **15**(1): p. 73-85.
64. C.A. Schneider, W.S.R., K.W. Eliceiri, NIH 2012, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. **9**(7): p. 671-675.
65. Tan X, X.A., Zhao T, Zhao Q, Zhang J, Fan C, Deng Y, et al, 2018, Simulated microgravity inhibits cell focal adhesions leading to reduced melanoma cell proliferation and metastasis via FAK/RhoA-regulated mTORC1 and AMPK pathways. *Sci Rep* **8**: p. 3769.
66. Nabavi N, K.A., Camirand A & Harrison RE 2011, Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. *Bone*. **49**(5): p. 965-974.
67. Lei, X., Cao, Y., Zhang, Y., Qian, J., Zhao, Q., Liu, F., Zhang, T., Zhou, J., Gu, Y., Xia, G., Duan, E, 2018, Effect of microgravity on proliferation and differentiation of embryonic stem cells in an automated culturing system during the TZ-1 space. *Cell proliferation*. **51**(5): p. e12466.
68. S. Dinarelli, G.L., G. Dietler, A. Francioso, L. Mosca, G. Pannitteri, et al., 2018, Erythrocyte's aging in microgravity highlights how environmental stimuli shape metabolism and morphology. *Sci. Rep.* **8**(1): p. 5277.
69. M. Gioia, A.M., M. Scimeca, M. Marini, U. Tarantino, L. Zolla, et al., 2018, Simulated microgravity induces a cellular regression of the mature phenotype in human primary osteoblasts. *Cell Death Discov.* **4**: p. 59.

70. M.J.A. Moes, J.C.G., R. Bleichrodt, J.J.W.A. van Loon, P.C.M. Christianen, J. Boonstra, 2011, Simulation of Microgravity by Magnetic Levitation and Random Positioning: Effect on Human A431 Cell Morphology, *Microgravity Sci. Technol.* **23**: p. 249-261.
71. M.Y. Kapitonova, N.S., S. Othman, T.M. Muhd Kamauzaman, A.M. Ali, H.M. Nawawi, et al. Pathol 2013, Alteration of cell cytoskeleton and functions of cell recovery of normal human osteoblast cells caused by factors associated with real space flight *Malays J.* **35**(2): p. 153-163.
72. Thiel, C.S., Vahlensieck, C., Bradley, T., Tauber, S., Lehmann, M., Ullrich, O, 2021, Metabolic dynamics in short- and long-term microgravity in human primary macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(13): p. 6752.
73. Sherr, C.J., Roberts, J.M., 2004, Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **18**: p. 2699–2711.
74. J.B. Reece, L.A.U., M.L. Cain, S.A. Wasserman, P.V. Minorsky, R.B. Jackson, 2011, The cell cycle. *Campbell biology.* (10): p. 244.
75. C.H. Yam, T.K.F., R.Y. Poon, 2002, Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**(8): p. 1317–1326.
76. N. Bendris, B.L., J.M. Blanchard, N. Arsic, 2011, Cyclin A2 mutagenesis analysis: a new insight into CDK activation and cellular localization requirements. *PLoS ONE.* **6**(7): p. e22879.
77. Loukil, A., 2015, Cyclin A2: at the crossroads of cell cycle and cell invasion. *World J. Biol. Chem.* **6**(346).
78. Matsuura, I., et al., 2004, Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature.* **430**(6996): p. 226-231.
79. E. Aleem, H.K., P. Kaldis, 2005, Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat. Cell Biol.* **7**: p. 831–836.
80. Fujimoto, T., et al., 2007, Cdk6 blocks myeloid differentiation by interfering with Runx1 DNA binding and Runx1-C/EBP α interaction. *The EMBO journal.* **26**(9): p. 2361-2370.
81. Tigan, A.-S., Bellutti, F., Kollmann, K., Tebb, G., Sexl, V, 2016, CDK6—a review of the past and a glimpse into the future: from cell-cycle control to transcriptional regulation. *Oncogene.* **35**: p. 3083–3091.

82. Anders, L., et al., 2011, A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer cell*. **20**(5): p. 620-634.
83. Damm, T.B., Richard, S., Tanner, S., Wyss, F., Egli, M., Franco-Obregón, A, 2013, Calcium-dependent deceleration of the cell cycle in muscle cells by simulated microgravity. *FASEB J*. **27**: p. 2045–2054

PHỤ LỤC

Phụ lục bảng 3.1: Số lượng tế bào giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG qua các khoảng thời gian khảo sát

Số lượng tế bào được xác định bằng ứng dụng chu kỳ tế bào của kính hiển vi Cytell

STT	Số lượng tế bào/Giếng							
	Day 2		Day 4		Day 6		Day 8	
	C	SMG	C	SMG	C	SMG	C	SMG
1	2646	1613	12601	13087	35240	19026	31306	22145
2	1809	2241	19350	12032	33933	27698	28610	21946
3	2153	1443	16077	13210	36630	22906	33222	23339
4	1245	1759	14306	14298	32995	27846	28675	23094
5	1552	2351	18070	13162	36474	22686	33789	21807
6	1439	2273	15541	13511	35565	28275	28605	21976
7	2109	1917	15380	16118	29590	26494	33385	20736
8	2404	2231	17534	15006	35688	23235	29277	20637
9	1315	2294	17720	10040	27865	26700	20373	22218
10	1889	1468	14500	9171	34342	25076	21642	20904
11	1740	1563	14630	3336	36336	22817	26197	20322
12	2162	1395	15701	6176	27878	23885	24791	21731
13	1138	2292	8741	10653	24438	22786	32471	23800
14	1175	1827	10843	15699	30961	18569	32681	20396
15	1889	1724	12057	8100	21628	18957	33657	22220
16	1962	1257	10145	15668	25910	16954	31615	23961
17	2344	1879	13478	9517	20817	23090	34372	n/a
18	1895	1535	13996	12831	21994	17792	35137	n/a
19	1832	1624	9919	10651	25719	23004	32338	n/a
20	1124	1493	13242	7243	21216	17017	30398	n/a
21	2126	1721	14415	12541	21733	24427	25877	n/a
22	n/a	n/a	n/a	n/a	28348	25145	26450	n/a
23	n/a	n/a	n/a	n/a	32718	19224	30790	n/a
24	n/a	n/a	n/a	n/a	29106	26120	23452	n/a

*** Bảng phân tích Anova số lượng tế bào ngày 2**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	27	0	1807	442,130	85,088
SMG	27	0	1805	347,181	66,815
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	54	54	0,000342	0,985
Residual	52	8210098	157886,500		
Total	53	8210152			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,985$).

*** Bảng phân tích Anova số lượng tế bào ngày 4**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Đối Chứng	27	0	14202,000	2818,000	542,324
SMG	27	0	11526,000	3387,000	651,828
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	96673176,000	96673176,000	9,960	0,003
Residual	52	504735218,000	9706446,500		
Total	53	601408394,000			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,003$).

*** Bảng phân tích Anova số lượng tế bào ngày 6**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	27	0	29464,000	5534,000	1065,019
SMG	27	0	22905,000	3528,000	678,964
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	580776493,500	580776493,500	26,968	<0,001
Residual	52	1119870440,000	21535970,000		
Total	53	1700646933,500			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$).

*** Bảng phân tích Anova số lượng tế bào ngày 8**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	27	0	29546,000	4153,000	799,245
SMG	27	0	21952,000	1164,000	224,012
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups		1778529286,000	778529286,000	83,702	<0,001
Residual		52483659930,000	9301152,500		
Total		531262189216,000			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$).

Phụ lục Bảng 3.2. Giá trị OD của nhóm đối chứng và nhóm SMG qua các khoảng thời gian khảo sát

Sự phát triển của tế bào được đánh giá bằng xét nghiệm WST1

STT	Giá trị OD							
	Day 2		Day 4		Day 6		Day 8	
	C	SMG	C	SMG	C	SMG	C	SMG
1	0.77	0.76	2.86	2.52	4.32	4.32	4.02	3.89
2	0.66	0.78	2.79	2.52	4.14	4.25	4.03	3.84
3	0.73	0.81	2.56	2.49	4.12	4.24	3.96	3.97
4	0.74	0.78	2.64	2.78	4.14	4.23	4.01	3.95
5	0.71	0.79	2.90	2.37	4.12	4.17	3.94	3.97
6	0.70	0.81	2.85	2.18	4.09	4.20	3.99	3.94
7	0.69	0.82	2.72	2.76	4.08	4.26	3.95	3.91
8	0.74	0.82	2.52	2.69	4.13	4.22	3.93	4.18
9	0.76	0.81	2.74	2.32	4.08	4.14	3.94	3.98
10	0.69	0.80	2.76	2.48	4.10	4.24	3.93	3.71
11	0.65	0.75	2.89	2.61	4.14	4.19	3.95	3.90
12	0.57	0.75	2.80	2.87	3.77	4.30	3.83	3.98
13	0.71	0.54	2.81	2.25	4.19	3.81	3.60	3.90

14	0.67	0.63	2.91	2.10	4.19	4.31	4.02	3.93
15	0.70	0.66	2.62	2.05	4.19	4.29	3.98	3.82
16	0.62	0.62	2.74	2.21	4.15	4.23	4.04	3.87
17	0.65	0.66	2.82	2.24	4.17	4.18	4.03	3.90
18	0.68	0.68	2.71	2.07	4.24	4.21	3.92	4.18
19	0.74	0.76	2.69	1.90	4.20	4.24	4.03	3.93
20	0.63	0.73	2.92	2.27	4.23	4.13	4.04	3.98
21	0.64	0.59	2.78	2.13	4.17	4.10	4.03	n/a
22	n/a	n/a	2.96	2.07	4.22	4.08	3.89	n/a
23	n/a	n/a	2.69	2.33	4.44	4.09	4.09	n/a
24	n/a	n/a	3.01	3.19	n/a	4.07	4.05	n/a

*** Bảng phân tích Anova giá trị OD của tế bào ngày 2**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	24	0	0,690	0,0507	0,0103
SMG	24	0	0,730	0,0800	0,0163
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0,0192	0,0192	4,281	0,044
Residual	46	0,206	0,00449		
Total	47	0,226			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,044$).

*** Bảng phân tích Anova giá trị OD của tế bào ngày 4**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	27	0	2,780	0,120	0,0231
SMG	27	0	2,390	0,310	0,0597
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	2,053	2,053	37,165	<0,001
Residual	52	2,873	0,0553		
Total	53	4,926			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$).

*** Bảng phân tích Anova giá trị OD của tế bào ngày 6**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	26	0	4,160	0,120	0,0235
SMG	27	0	4,190	0,110	0,0212
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0,0119	0,0119	0,901	0,347
Residual	51	0,675	0,0132		
Total	52	0,687			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,347$).

*** Bảng phân tích Anova giá trị OD của tế bào ngày 8**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	27	0	3,970	0,1000	0,0192
SMG	23	0	3,940	0,110	0,0229
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0,0112	0,0112	1,020	0,318
Residual	48	0,526	0,0110		
Total	49	0,537			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,318$).

Phụ lục Bảng 3.3. Bảng diện tích nhân tế bào của nhóm đối chứng và nhóm SMG qua các khoảng thời gian khảo sát

Diện tích nhân tế bào (μm^2)							
Ngày 2		Ngày 4		Ngày 6		Ngày 8	
253	231	233	232	194	199	193	216
230	238	230	232	195	206	195	204
233	231	231	225	193	200	193	202

234	236	236	232	194	208	192	212
236	234	229	226	191	202	192	207
229	240	232	231	192	208	190	211
226	228	233	232	197	209	191	212
247	232	228	229	191	207	194	213
224	243	237	228	196	216	197	211
230	239	238	234	193	208	191	209
261	243	231	247	195	206	190	204
231	228	229	213	200	200	192	202
224	234	219	218	194	193	191	200
218	243	219	226	193	199	195	202
218	238	220	245	196	198	190	203
225	242	219	222	199	198	193	205
222	230	225	237	197	200	194	195
220	228	230	220	197	205	190	
216	232	227	237	193	206	191	
224	231	220	237	195	199	195	
226	226	231	235	198	209	188	
		232	237	197	207	191	
		231		199	202	194	
		228		200	202	194	

*** Bảng phân tích Anova diện tích nhân tế bào ngày 2**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	12	0	230,000	12,000	2,619
SMG	6	0	235,000	6,000	1,309
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	262,500	262,500	2,917	0,095
Residual		403600,000	90,000		
Total		413862,500			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,095$).

*** Bảng phân tích Anova diện tích nhân tế bào ngày 4**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	24	0	229,000	6,000	1,225
SMG	22	0	231,000	8,000	1,706
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	45,913	45,913	0,930	0,340
Residual	44	2172,000	49,364		
Total	45	2217,913			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,340$).

*** Bảng phân tích Anova diện tích nhân tế bào ngày 6**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	24	0	195,000	3,000	0,612
SMG	24	0	204,000	5,000	1,021
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	972,000	972,000	57,176	<0,001
Residual	46	782,000	17,000		
Total	47	1754,000			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$).

*** Bảng phân tích Anova diện tích nhân tế bào ngày 8**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	24	0	192,000	2,000	0,408
SMG	17	0	206,000	6,000	1,455
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	1950,439	1950,439	113,873	<0,001
Residual	39	668,000	17,128		
Total	40	2618,439			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$).

Phụ lục Bảng 3.4. Bảng giá trị hình thái nhân tế bào của nhóm đối chứng và nhóm SMG qua các khoảng thời gian khảo sát

Hình thái nhân tế bào							
Ngày 2		Ngày 4		Ngày 6		Ngày 8	
0,94	0,93	0,91	0,92	0,87	0,88	0,87	0,9
0,93	0,92	0,92	0,92	0,89	0,9	0,85	0,91
0,93	0,93	0,92	0,91	0,88	0,9	0,86	0,9
0,92	0,92	0,92	0,91	0,88	0,91	0,87	0,9
0,93	0,93	0,92	0,91	0,88	0,9	0,87	0,9
0,93	0,92	0,92	0,91	0,87	0,9	0,86	0,9
0,92	0,92	0,92	0,91	0,88	0,9	0,86	0,9
0,94	0,92	0,92	0,92	0,88	0,89	0,86	0,91
0,93	0,92	0,92	0,91	0,86	0,9	0,86	0,91
0,91	0,92	0,92	0,92	0,89	0,9	0,85	0,89
0,90	0,91	0,92	0,92	0,88	0,9	0,84	0,9
0,92	0,92	0,91	0,92	0,87	0,89	0,85	0,9
0,93	0,91	0,92	0,91	0,88	0,9	0,87	0,88
0,93	0,92	0,9	0,91	0,88	0,88	0,87	0,89
0,93	0,92	0,91	0,92	0,87	0,88	0,87	0,9
0,93	0,93	0,91	0,91	0,86	0,88	0,87	0,9
0,93	0,93	0,91	0,92	0,86	0,9	0,87	0,85
0,93	0,93	0,92	0,92	0,86	0,88	0,88	
0,92	0,91	0,92	0,91	0,87	0,89	0,87	
0,93	0,93	0,9	0,91	0,86	0,89	0,86	
0,92	0,90	0,91	0,93	0,86	0,9	0,86	
		0,92	0,92	0,88	0,9	0,87	
		0,91		0,88	0,88	0,87	
		0,9		0,88	0,9	0,85	

* *Bảng phân tích Anova giá trị hình thái nhân tế bào ngày 2*

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
C	22	0	0,926	0,00921	0,00196	
SMG	22	0	0,921	0,00831	0,00177	
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P	
Between Groups	1	0,000297		0,000297	3,868	0,056
Residual	42	0,00323	0,0000769			
Total	43	0,00353				

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,056$).

** Bảng phân tích Anova giá trị hình thái nhân tế bào ngày 4*

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	25	0	0,915	0,00721	0,00144
SMG	23	0	0,915	0,00596	0,00124
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0,000009700	0,00000970	0,220	0,641
Residual	46	0,00203	0,0000441		
Total	47	0,00204			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,641$).

** Bảng phân tích Anova giá trị hình thái nhân tế bào ngày 6*

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	24	0	0,870	0,01000	0,00204
SMG	24	0	0,890	0,00900	0,00184
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0,00480	0,00480	53,039	<0,001
Residual	46	0,004160	0,0000905		
Total	47	0,00896			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$).

*** Bảng phân tích Anova giá trị hình thái nhân tế bào ngày 8**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	24	0	0,860	0,001000	0,000204
SMG	17	0	0,900	0,0140	0,00340

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0,0159	0,0159	196,567	<0,001
Residual	39	0,003160	0,0000810		
Total	40	0,0191			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$).

Phụ lục bảng 3.5. Phần trăm số lượng tế bào trong chu kỳ tế bào giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG qua các khoảng thời gian khảo sát

Bảng bổ sung. chu kỳ tế bào được xác định bằng Ứng dụng chu kỳ tế bào của kính hiển vi Cytell

Day 2

STT.	Phần trăm số lượng tế bào (%)					
	Control			SMG		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
1	64.9	12.3	16.3	66.9	11.9	12.9
2	70	13.3	9.67	63.1	16.1	10.4
3	69.6	11.2	12.4	65.8	13	10.7
4	63.1	10.2	12.9	63.2	13.9	10.2
5	66.6	10.7	12.2	64.9	12	14.4
6	60.9	11.7	16	63	11.1	13.3
7	66.7	10.7	12	61.9	12.1	13.2
8	67.5	10.5	14.7	51.9	12.2	18.3
9	59	10.4	16.4	52.9	15.6	19.7
10	46.6	17	20.1	43.6	17.9	22.3
11	15.5	18.1	33.5	39.7	17.6	22.3
12	41	21.1	23.1	55.3	12.2	14.7
13	65.6	15.6	9.31	66.3	11.7	11.8
14	60.3	9.87	15.6	66.6	11.2	11.4
15	67	12.2	11.6	53.2	16.7	19.4
16	69.6	10.9	10.5	60.1	11.9	14.6
17	70.4	11.6	9.47	62.1	14.1	13.9
18	64.5	10.9	17.5	55.3	11.5	15.6
19	70	11.5	7.48	66.8	14.3	9.36
20	53.5	13.7	19.3	n/a	n/a	n/a
21	56.9	13.7	19.2	n/a	n/a	n/a

Day 4.

STT.	Phần trăm số lượng tế bào (%)					
	Control			SMG		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
1	59.9	12.4	21.4	65.4	11.4	17.2
2	64.3	12.5	19.3	66.4	12	15.9
3	62.3	12.7	21.1	64.3	11.2	17.9
4	63.9	12.5	19.9	65.7	11.1	17.7
5	63.2	12.4	20.4	64.3	11.8	17.5
6	64.4	12.3	19.9	66.1	11.4	16.5
7	64.7	12.2	18.6	67.2	11.8	15.2
8	63.2	12.7	20.5	68	11	15.6
9	64.5	12	19.7	67.7	11.8	15
10	63.1	13.1	19.2	64.3	11.4	17.4
11	64.7	13.5	17.5	69.3	10.3	13
12	64.2	12.3	18.9	66.8	9.98	11.5
13	62.7	12.1	16.6	66.5	12.3	14.6
14	64.8	13	15.7	67.2	11.2	15.7
15	64.4	13.1	16.1	66.9	12	16
16	61.5	13.9	17.8	67.7	11.8	15
17	62.8	12.8	18.2	67.6	11.6	15.6
18	63.8	12.3	17.3	67.5	12.5	13.3
19	64.3	12.6	16.4	66.1	12.1	15.4
20	63.6	13.1	18.3	65.2	12	16.5
21	60.2	13.5	21.1	66.4	12.5	15.7
22	59.4	13.1	21.2	66.2	11.8	16.9

Day 6

STT.	Phân trăm số lượng tế bào (%)					
	Control			SMG		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
1	59.5	9.14	26.3	49.9	14.3	28.2
2	60.9	8.96	25.7	60.2	10.9	24.2
3	60.9	8.28	26.6	59.5	10.4	25
4	59.6	8.69	27.1	62.6	10.4	23
5	61.1	7.85	26.5	59.4	10.4	24.8
6	60.1	9.21	26.5	60.7	11.5	23.3
7	59.7	9.5	25.8	60.8	10.1	24.3
8	63	8.42	24.8	59.2	9.66	25.3
9	57.2	10	27.4	59.9	10.6	24.4
10	61.9	8.27	25.6	60.8	10.2	24.3
11	60.8	9.07	25.8	60.1	10.2	24.4
12	56.9	10.5	27.2	59.5	9.68	25.3
13	59.1	10.6	25.3	64	9.42	21.5
14	59.4	9.71	25.9	57.3	9.65	25.8
15	54.5	10.8	27.6	58.4	9.89	25.5
16	53.4	11	28.5	54.5	11.2	26.7
17	56.6	10.9	27	61.5	9.25	24.4
18	53.7	10.7	28.5	56.3	10.4	26.6
19	54.4	10.7	28.4	59.9	9.66	24.2
20	58.3	9.5	26.8	54.6	11.1	27.1
21	59.3	8.99	27	61.2	9.89	24.1
22	57.2	9.83	27.4	56.2	10.3	26.8

Day 8

STT.	Phần trăm số lượng tế bào (%)					
	Control			SMG		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
1	56.9	8.08	29	66.4	8.26	20
2	58.8	7.57	28	61	10.9	23.6
3	57	8.9	28.1	60.8	11.7	23
4	58.5	7.99	27.7	63.8	11.6	20.3
5	59.7	8.56	28.6	60	11.5	23.8
6	57.3	8.98	27	60.4	11.6	23.2
7	61.4	9.17	24.7	62	11.7	21.7
8	61.2	9.52	24.4	61.7	11.2	22.4
9	62.9	10.5	22.2	64.8	12.3	18.2
10	62.3	9.52	23.1	65.2	12.7	16.9
11	61.8	9.12	24.1	59.1	11.3	24.2
12	64.3	9.38	22.4	62	12.3	21
13	60.8	10.1	24.3	57.2	12.1	24.7
14	59.4	9.03	25.9	60.8	11.4	22.5
15	58.4	11.9	23.8	58.8	11.6	24.2
16	59.7	9.99	24.9	60	11.4	23.6
17	60.8	9.36	24.8	54.3	13	25.2

* Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha G0/G1 ngày 2

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	21	0	60,440	12,930	2,822
SMG	21	0	59,080	7,970	1,739
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	19,421	19,421	0,168	0,684
Residual	40	4614,116	115,353		
Total	41	4633,537			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,684$).

*** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha G0/G1 ngày 4**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	22	0	63,180	1,610	0,343
SMG	22	0	66,490	1,290	0,275
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	120,517	120,517	56,631	<0,001
Residual	42	89,380	2,128		
Total	43	209,897			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$).

*** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha G0/G1 ngày 6**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	22	0	58,520	2,720	0,580
SMG	22	0	58,930	3,120	0,665
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	1,849	1,849	0,216	0,645
Residual	42	359,789	8,566		
Total	43	361,638			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,645$).

*** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha G0/G1 ngày 8**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	17	0	60,070	2,130	0,517
SMG	17	0	61,080	2,980	0,723
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	8,671	8,671	1,292	0,264

Residual	32	214,677	6,709
Total	33	223,348	

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0,264$).

*** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha G2/M ngày 2**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	21	0	15.201	5.866	1.280
SMG	21	0	14.656	3.994	0.871
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	3.126	3.126	0.124	0.726
Residual	40	1007.215	25.180		
Total	41	1010.341			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0.726$).

*** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha G2/M ngày 4**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	22	0	18.868	1.762	0.376
SMG	22	0	15.686	1.593	0.340
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	111.362	111.362	39.472	<0.001
Residual	42	118.494	2.821		
Total	43	229.856			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$).

*** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha G2/M ngày 6**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	22	0	26.714	1.025	0.218
SMG	22	0	24.964	1.507	0.321

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	33.688	33.688	20.283	<0.001
Residual	42	69.757	1.661		
Total	43	103.444			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$)

*** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha G2/M ngày 8**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	17	0	25.471	2.199	0.533
SMG	17	0	22.265	2.314	0.561

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	87.361	87.361	17.149	<0.001
Residual	32	163.014	5.094		
Total	33	250.376			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0,001$)

*** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha S ngày 2**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	21	0	12.722	2.951	0.644
SMG	21	0	13.526	2.236	0.488

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	6.786	6.786	0.990	0.326
Residual	40	274.120	6.853		
Total	41	280.906			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0.326$).

*** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha S ngày 4**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	22	0	12.732	0.502	0.107

SMG	22	0	11.590	0.632	0.135
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	14.341	14.341	44.000	<0.001
Residual	42	13.689	0.326		
Total	43	28.030			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0.001$).

** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha S ngày 6*

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	22	0	9.574	0.970	0.207
SMG	22	0	10.414	1.046	0.223
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	7.762	7.762	7.623	0.009
Residual	42	42.765	1.018		
Total	43	50.527			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0.009$).

** Bảng phân tích Anova phần trăm số lượng tế bào pha S ngày 8*

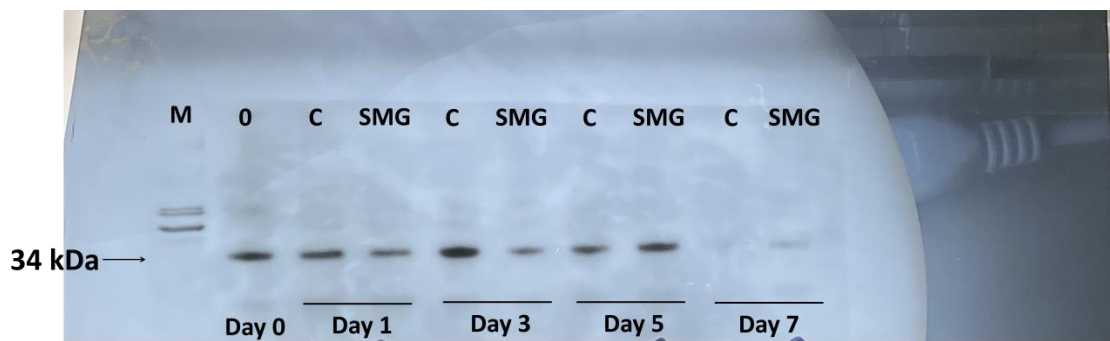
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C	17	0	9.275	1.017	0.247
SMG2	17	0	11.562	1.012	0.245
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	44.485	44.485	43.235	<0.001
Residual	32	32.925	1.029		
Total	33	77.411			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0.001$).

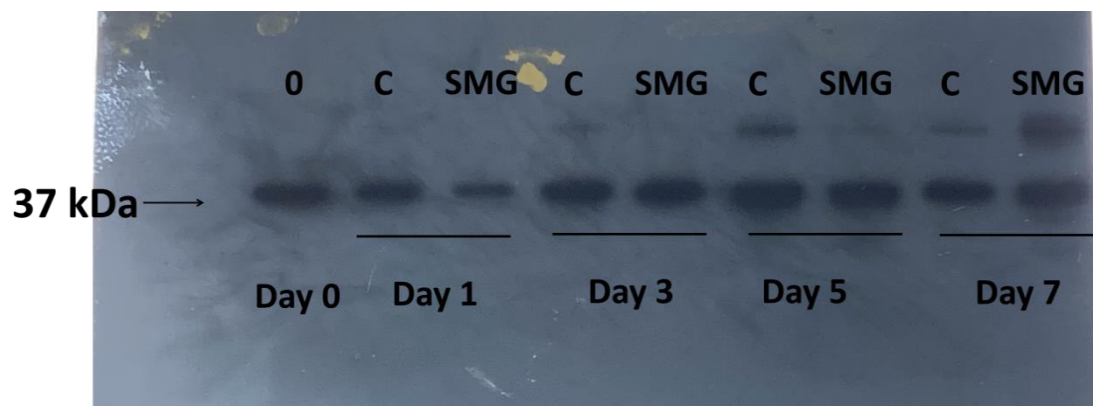
4. Cdk4



5. Cdk2.



6. Gapdh



Phụ lục hình 3.9. Đánh giá sức sống tế bào qua phân tích apoptosis bằng flow cytometry

Day 2				
	Viability	early	late	necro
Control	99,4	0,5	0,1	0,0
	99,3	0,6	0,1	0,0
	99,3	0,6	0,1	0,0
Mean	99,3	0,6	0,1	0,0
SD	0,1	0,1	0,0	0,0
SMG	99,4	0,4	0,1	0,0
	99,5	0,3	0,2	0,0
	99,2	0,4	0,3	0,0
Mean	99,4	0,4	0,2	0,0
SD	0,2	0,1	0,1	0,0

Day 4				
	Viability	early	late	necro
DC	96,5	0,5	1,5	1,5
	96,7	0,5	1,4	1,4
	96,7	0,5	1,4	1,4
Mean	96,6	0,5	1,4	1,4
SD	0,1	0,0	0,1	0,1
SMG	92,4	0,8	2,4	4,4
	91,8	0,9	3,3	4,0
	91,9	0,8	3,4	3,9
Mean	92,0	0,8	3,0	4,1
SD	0,3	0,1	0,6	0,3

Day 6				
	Viability	early	late	necro
DC	90,5	3,3	5,9	0,3

	90,2	3,3	6,4	0,1
	90,0	3,2	6,6	0,2
Mean	90,2	3,3	6,3	0,2
SD	0,3	0,1	0,4	0,1
SMG	92,4	3,8	3,7	0,1
	91,2	3,7	4,9	0,2
	91,8	3,8	5,2	0,2
Mean	91,8	3,8	4,6	0,2
SD	0,6	0,1	0,8	0,1

Day 8				
	Viability	early	late	necro
DC	92,7	4,6	2,7	0,1
	92,1	4,5	3,3	0,1
	92,7	4,6	2,7	0,0
Mean	92,5	4,6	2,9	0,1
SD	0,3	0,1	0,3	0,1
SMG	94,5	3,9	1,6	0,0
	93,1	4,2	2,6	0,1
	93,8	4,1	2,0	0,1
Mean	93,8	4,1	2,1	0,1
SD	0,7	0,2	0,5	0,1

Bảng phân tích Anova tỷ lệ tế bào sống ngày 2

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ĐC	3	0	99.333	0.0577	0.0333
SMG	3	0	99.367	0.153	0.0882
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.00167	0.00167	0.125	0.742
Residual	4	0.0533	0.0133		
Total	5	0.0550			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0.742$).

Bảng phân tích Anova tỷ lệ tế bào sống ngày 4

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ĐC	3	0	96.633	0.115	0.0667
SMG	3	0	92.033	0.321	0.186
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	31.740	31.740	544.114	<0.001
Residual	4	0.233	0.0583		
Total	5	31.973			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = <0.001$).

Bảng phân tích Anova tỷ lệ tế bào sống ngày 6

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ĐC	3	0	90.233	0.252	0.145
SMG	3	0	91.800	0.600	0.346
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	3.682	3.682	17.394	0.014
Residual	4	0.847	0.212		
Total	5	4.528			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0.014 < 0.05$).

Bảng phân tích Anova tỷ lệ tế bào sống ngày 8

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ĐC	3	0	92.500	0.346	0.200
SMG	3	0	93.800	0.700	0.404
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P

Between Groups	1	2.535	2.535	8.311	0.045
Residual	4	1.220	0.305		
Total	5	3.755			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0.045 < 0.05$).

Bảng phân tích Anova tỷ lệ tế bào Apoptosis ngày 2

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ĐC	3	0	0.667	0.0577	0.0333
SMG	3	0	0.567	0.115	0.0667
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0150	0.0150	1.800	0.251
Residual	4	0.0333	0.00833		
Total	5	0.0483			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0.251$).

Bảng phân tích Anova tỷ lệ tế bào Apoptosis ngày 4

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ĐC	3	0	1.933	0.0577	0.0333
SMG	3	0	3.867	0.577	0.333
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	5.607	5.607	33.307	0.004
Residual	4	0.673	0.168		
Total	5	6.280			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0.004 < 0.01$).

Bảng phân tích Anova tỷ lệ tế bào Apoptosis ngày 6

roup Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
------------------	----------	----------------	-------------	----------------	------------

y

ĐC	3	0	9.567	0.321	0.186
SMG	3	0	8.367	0.777	0.448
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	2.160	2.160	6.113	0.069
Residual	4	1.413	0.353		
Total	5	3.573			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm không đủ lớn để loại trừ khả năng sự khác biệt là do biến thiên lấy mẫu ngẫu nhiên; không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0.069$).

Bảng phân tích Anova tỷ lệ tế bào Apoptosis ngày 8

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ĐC	3	0	7.467	0.289	0.167
SMG	3	0	6.133	0.651	0.376
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	2.667	2.667	10.526	0.032
Residual	4	1.013	0.253		
Total	5	3.680			

Sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các nhóm thí nghiệm lớn hơn mức dự kiến ngẫu nhiên; số liệu có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ($P = 0.032$).