

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Trần Thị Minh**

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

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG**

**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

Trần Thị Minh

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH SINH HỌC ỨNG DỤNG  
CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9420201

Xác nhận của Học viện Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

Khoa học và Công nghệ



KT. GIÁM ĐỐC

PHÓ GIÁM ĐỐC

\* Nguyễn Thị Trung

TS. Lê Thành Long

GS. TS. Hoàng Nghĩa Sơn

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2024

**LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan luận án: ***“Nghiên cứu sự thay đổi tăng sinh và cấu trúc khung xương tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng”*** là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

*Hà Nội, ngày 10 tháng 11 năm 2024*

**Tác giả luận án**

*Trần Thị Minh*

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi xin chân thành cảm ơn Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Sinh học Nhiệt đới đã tạo điều kiện thuận lợi để tôi thực hiện đề tài này.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc đến Thầy - GS.TS. Hoàng Nghĩa Sơn và Thầy - TS. Lê Thành Long, những người đã luôn tận tâm chỉ dẫn, tạo mọi điều kiện cho tôi học tập, nghiên cứu và hoàn chỉnh đề tài này.

Xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo Trường ĐH Văn Lang đã tạo điều kiện thuận lợi để tôi thực hiện đề tài này.

Tôi xin cảm ơn Thầy, Cô, các anh chị em đồng nghiệp, bạn bè đã luôn động viên giúp đỡ tôi trong quá trình công tác và nghiên cứu.

Cuối cùng con xin cảm ơn Ba, Mẹ và Gia đình đã luôn ở bên con, động viên con trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

*Hà Nội, ngày 10 tháng 11 năm 2024*

**Tác giả luận án**

*Trần Thị Minh*

## MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ KÝ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC BẢNG.....	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ .....	ix
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU .....	4
1.1. Tổng quan về vi trọng lực .....	4
1.1.1. Giới thiệu chung về vi trọng lực .....	4
1.1.2. Các hệ thống mô phỏng điều kiện vi trọng .....	5
1.1.3. Các nghiên cứu về vi trọng lực .....	10
1.2. Giới thiệu chung về gan .....	11
1.2.1. Cấu trúc của gan.....	11
1.2.2. Chức năng của gan .....	12
1.2.3. Tế bào gan Chang (CCL-13) .....	13
1.3. Sự sinh trưởng tế bào .....	14
1.3.1. Sự tăng sinh của tế bào .....	14
1.3.2. Chu kỳ phân chia tế bào .....	14
1.3.3. Vi trọng lực và sự tăng sinh của tế bào .....	21
1.4. Sự chết theo chương trình .....	23
1.4.1. Con đường apoptosis .....	23
1.4.2. Tác động của vi trọng lực đến quá trình apoptosis .....	26
1.5. Bộ khung xương tế bào .....	27
1.5.1. Khái niệm .....	27
1.5.2. Cấu trúc bộ khung xương tế bào .....	28
1.5.3. Các tác động của vi trọng lực lên cấu trúc khung xương tế bào.....	30
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	35
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	35
2.2. Vật liệu .....	35
2.2.1. Thiết bị và dụng cụ.....	35
2.2.2. Môi trường và hóa chất sử dụng .....	36
2.2.3. Tế bào gan Chang (CCL-13) .....	37
2.2.4. Hệ thống vi trọng lực mô phỏng (clinostat 3D).....	37

2.3. Nội dung nghiên cứu.....	38
2.3.1. Nội dung nghiên cứu 1.....	38
2.3.2. Nội dung nghiên cứu 2.....	38
2.3.3. Nội dung nghiên cứu 3.....	39
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	39
2.4.1. Nuôi cấy tế bào và thử nghiệm vi trọng lực mô phỏng.....	39
2.4.2. Thử nghiệm WST-1.....	40
2.4.3. Phân tích bằng kính hiển vi Cytell.....	41
2.4.4. Phương pháp flow cytometry.....	43
2.4.5. Tách chiết RNA tổng.....	43
2.4.6. Phương pháp Real time PCR.....	44
2.4.7. Phân tích Western blot.....	46
2.4.5. Phương pháp thống kê.....	48
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	49
3.1. Khả năng tăng sinh của tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng.....	49
3.1.1. Sự thay đổi mật độ tế bào CCL-13.....	49
3.1.2. Ảnh hưởng vi trọng lực đến chu kỳ tế bào CCL-13.....	52
3.1.2.1. Kết quả phân tích flow cytometry.....	52
3.1.2.2. Biểu hiện phiên mã các gene điều hoà chính chu kỳ tế bào.....	53
3.1.2.3. Biểu hiện dịch mã các gene điều hoà chính chu kỳ tế bào.....	54
3.2. Ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực lên sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào gan chang (CCL-13).....	56
3.2.1. Sự thay đổi hình dạng nhân và cường độ hạt nhân của tế bào CCL-13.....	56
3.2.2. Ảnh hưởng của vi trọng lực lên sự chết theo chương trình (apoptosis).....	61
3.2.2.1. Tỷ lệ tế bào đi vào con đường apoptosis.....	61
3.2.2.2. Biểu hiện mức phiên mã các gene liên quan đến apoptosis.....	62
3.2.2.3. Biểu hiện mức độ dịch mã của các gene Bcl-2 và Bax.....	63
3.3. Thay đổi cấu trúc khung xương tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực.....	65
3.3.1. Biểu hiện các gene mã hóa protein hình thành cấu trúc bộ khung xương tế bào.....	65
3.3.1.1. Kết quả Real time qRT-PCR của gene $\alpha$ -tubulin 3.....	65
3.3.1.2. Kết quả Real time qRT-PCR của gene $\beta$ -actin.....	65
3.3.1.3. Biểu hiện các protein tham gia hình thành cấu trúc khung xương tế bào.....	66

3.3.2. Thay đổi cấu trúc khung xương tế bào trong điều kiện vi trọng lực .....	67
3.3.2.1. Sự thay đổi cấu trúc vi ống và vi sợi của tế bào CCL-13 .....	67
3.3.2.2. Sự thay đổi cấu trúc khung xương của tế bào CCL-13 trong quá trình phân bào.. .....	71
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	75
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	76
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	77
PHỤ LỤC	

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ KÝ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
2-D clinostat	Two – Dimensional clinostat	Hệ thống buồng quay 2 chiều
3-D clinostat	Three – Dimensional clinostat	Hệ thống buồng quay 3 chiều
Bax	Bcl-2-associated X protein	Protein X liên kết Bcl-2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	Protein lymphoma tế bào B-2
CCL-13	Chang liver cells (ATCC® CCL-13™)	tế bào gan Chang (danh mục ATCC® # CCL-13™)
CDKs	Cyclin-dependent kinases	Kinase phụ thuộc cyclin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	Môi trường Dulbecco's modified Eagle
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh thai bò
FITC	Fluorescein isothiocyanate	Thuốc nhuộm huỳnh quang fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward scatter	Chỉ số tán xạ trước
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
hucMSC	Human umbilical cord mesenchymal stem cell	Tế bào gốc trung mô cuống rốn người
ICC	Immunocytochemistry	Hóa tế bào miễn dịch
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Axit ribonucleic thông tin
NASA	National Aeronautics and Space Administration	Cơ quan Hàng không và Vũ trụ Hoa Kỳ
NST	Chromosome	Nhiễm sắc thể
OD	Optical density	Mật độ quang
PBS	Phosphate-buffered saline	Phosphate-buffered saline
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin	Penicillin-Streptomycin
PI	Propidium iodide	Propidium iodide
PVDF	Polyvinylidene fluoride	Polyvinylidene fluoride
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng định lượng chuỗi polymerase phiên mã ngược
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic



RPM RT-PCR	Random positioning machine Real-time polymerase chain reaction	Máy định vị ngẫu nhiên
RWV	Rotating wall vessel	Buồng quay
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate– polyacrylamide gel electrophoresis	Điện di gel sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide
SMG	Simulated microgravity	Vi trọng lực mô phỏng
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20	Dung dịch đệm Tris Buffered Saline bổ sung Tween 20
WST-1	Water-soluble tetrazolium salt assay	Xét nghiệm muối tetrazolium hòa tan trong nước

**DANH MỤC BẢNG**

	Trang
Bảng 2.1. Một số thiết bị chính sử dụng trong đề tài.....	35
Bảng 2.2. Một số dụng cụ chính sử dụng trong đề tài .....	35
Bảng 2.3. Môi trường, hóa chất sử dụng trong đề tài .....	36
Bảng 2.4. Trình tự môi các gene liên quan đến chu kỳ tế bào.....	45
Bảng 2.5. Trình tự môi các gene liên quan đến quá trình apoptosis.....	46
Bảng 2.6. Trình tự môi các gene mã hóa vi ống, vi sợi .....	46

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

	Trang
Hình 1.1. Nguyên lý hoạt động của hệ thống 2-D clinostat.....	5
Hình 1.2. Mô hình 2-D clinostat .....	6
Hình 1.3. Buồng quay (RWV) .....	7
Hình 1.4. Máy định vị trí ngẫu nhiên (RPM).....	7
Hình 1.5. Hệ thống 3-D Clinostat .....	8
Hình 1.6. Thiết bị 3-D Clinostat Gravity Controller Gravite.....	9
Hình 1.7. Các loại tế bào trong mô gan .....	12
Hình 1.8. Tế bào gan Chang.....	12
Hình 1.9. Chu kỳ tế bào .....	14
Hình 1.10. Vai trò của Cyclin và CDK trong chu kỳ tế bào.....	18
Hình 1.11. Mối quan hệ của các protein họ cyclin và CDK với mỗi pha trong chu kỳ tế bào. ....	20
Hình 1.12. p53/p21 trong điều hòa chu kỳ tế bào.....	21
Hình 1.13. Con đường apoptosis nội sinh.....	24
Hình 1.14. Con đường apoptosis ngoại sinh.....	25
Hình 1.15. Thành phần cấu trúc khung xương tế bào.....	28
Hình 1.16. a) Ba thành phần chính của bộ xương tế bào. b) tế bào được nhuộm huỳnh quang (sợi actin: đỏ, DNA: xanh dương và Keratin: xanh lá) .....	30
Hình 1.17. Sự thay đổi của tổ chức khung xương tế bào khi nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực .....	32
Hình 1.18. Các protein liên kết với actin ảnh hưởng đến hoạt động của Actin theo nhiều cách khác nhau .....	33
Hình 1.19. Tổng quan về tương tác chuyển đổi tín hiệu và tu sửa actin.....	34
Hình 2.1. Cấu trúc máy 3D clinostat.....	38
Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu chung.....	39
Hình 2.3. Phân cắt muối tetrazolium WST-1 .....	41
Hình 2.4. Phương pháp chuyển màng PVDF.....	48
Hình 3.1. Hình thái tế bào sau nuôi cấy. ....	49
Hình 3.2. Mật độ tế bào CCL-13 trung bình khi nuôi cấy .....	50
Hình 3.3. Giá trị O.D của các tế bào CCL-13 sau khi nuôi cấy 72h và phân tích WST-1 .....	51
Hình 3.4. Diện tích tế bào CCL-13 trong 2 điều kiện nuôi cấy .....	51
Hình 3.5. Chu kỳ tế bào CCL-13 được phân tích bằng flow cytometry.....	52

Hình 3.6. Kết quả phân tích Realtime RT-PCR các gene điều hòa chính chu kỳ tế bào .....	53
Hình 3.7 So sánh biểu hiện gene phiên mã liên quan đến chu kỳ tế bào trong nhóm SMG và nhóm đối chứng sử dụng Realtime RT-PCR.....	54
Hình 3.8. Phân tích western blot các protein liên quan đến chu kỳ tế bào .....	55
Hình 3.9. Hình thái nhân tế bào CCL-13 .....	57
Hình 3.10. Kết quả phân tích tế bào và hình thái nhân tế bào CCL-13 .....	58
Hình 3.11. Diện tích hạt nhân CCL-13 (A) và tỉ lệ hạt nhân / tế bào chất trong các tế bào CCL-13 (B).....	59
Hình 3.12. Cường độ hạt nhân (A); Phân bố cường độ hạt nhân CCL-13 giữa nhóm kiểm soát và nhóm SMG (B) .....	60
Hình 3.13. Kết quả phân tích flow cytometry.....	61
Hình 3.14. Sự biểu hiện của gene Bax được đánh giá bằng RT-PCR .....	62
Hình 3.15. Sự biểu hiện của Bcl-2 được đánh giá bằng RT-PCR .....	63
Hình 3.16. Kết quả phân tích protein Bax và Bcl-2 bằng Western blot .....	64
Hình 3.17. Phân tích biểu hiện gene gene $\alpha$ -Tubulin 3 bằng RT-PCR.....	65
Hình 3.18. Phân tích biểu hiện gene $\beta$ -actin bằng RT-PCR .....	66
Hình 3.19. Phân tích sự biểu hiện các protein $\alpha$ –Tubulin và $\beta$ -actin bằng kỹ thuật western blot .....	67
Hình 3.20. Kết quả nhuộm protein Tubulin cấu thành nên vi ống của tế bào gan Chang (CCL-13).....	69
Hình 3.21. Kết quả nhuộm protein Actin cấu thành nên vi sợi actin của tế bào gan Chang (CCL-13).....	70
Hình 3.22. Nhuộm vi sợi của các tế bào CCL-13 .....	72
Hình 3.23. Nhuộm vi ống của các tế bào CCL-13 .....	73

# MỞ ĐẦU

## 1. Lý do chọn đề tài

Trọng lực ở Trái Đất luôn giữ ở mức độ ổn định, các sinh vật tồn tại trên Trái Đất đã thích nghi với trọng lực nên sự thay đổi của trọng lực dẫn đến những tác động trên tất cả các sinh vật và con người. Trong quá trình tiến hoá, cơ thể sống đã phát triển các hệ thống hỗ trợ như cấu trúc vận động được hỗ trợ thích hợp, màng tế bào trở nên cứng chắc, điều hòa các chất lỏng di chuyển trong cơ thể. Tuy nhiên, trọng lực có thể ảnh hưởng sâu hơn đến cả hoạt động và cấu trúc trong tế bào. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của vi trọng lực trên sinh vật được phát triển ở thế kỉ 20 trong các chuyến bay vào không gian cùng các mô hình thí nghiệm được mang theo. Tuy nhiên chi phí đắt đỏ đã giới hạn rất nhiều các nghiên cứu này.

Nhiều mô hình thí nghiệm mô phỏng điều kiện vi trọng lực đã được tạo ra như hệ thống 2-D clinostat, hệ thống 3-D clinostat, máy định vị vị trí ngẫu nhiên (RPM-Random Positioning Machine). Trong đó mô hình quay 3D (3-D clinostat) được sử dụng để loại bỏ yếu tố trọng lực. Mô hình này đã được sử dụng nhiều cho các nghiên cứu về điều kiện không trọng lực tác động lên các dòng tế bào và để nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác động của trọng lực lên hệ thống sống. 3-D clinostat là một thiết bị tạo ra lực g đa chiều và hủy bỏ trọng lực tích lũy, do đó mô phỏng hiệu quả các khía cạnh nhất định của trọng lực. Sử dụng các thiết bị như vậy, các thí nghiệm được thực hiện theo hướng tác động của vi trọng lực với nhiều hoạt động của tế bào. Các nghiên cứu từ các mô phỏng của vi trọng lực trên mặt đất đã chỉ ra rằng nhiều loại tế bào, từ vi khuẩn đến tế bào động vật có vú rất nhạy cảm đối với môi trường vi trọng lực, bao gồm tăng sinh tế bào, chu kỳ tế bào, biệt hóa tế bào, apoptosis, toàn vẹn bộ gene và sửa chữa tổn thương DNA.

Các nghiên cứu trước đây cho thấy điều kiện vi trọng lực gây ra sự ức chế tăng sinh của một số dòng tế bào như tế bào tiền thân tạo máu của người, tế bào gốc trung mô tủy xương và tế bào gốc trung mô chuột. Hơn nữa, sự tái tạo tubulin đã xảy ra trong các tế bào nội mô dưới vi trọng lực. Sự tổ chức lại F-actin gây ra ức chế sự di chuyển của các tế bào gốc trung mô của chuột do vi trọng lực mô phỏng. Vi trọng lực mô phỏng cũng ảnh hưởng đến gan chuột bằng cách thay đổi sự trao đổi chất của Loureirin B và sự biểu hiện của Cytochrome P450 chính.

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

hoá và đã được nghiên cứu cho thấy có các đặc điểm sinh học và chức năng tương tự như các tế bào gan bình thường. Tuy nhiên, các nghiên về tác động của vi trọng lực mô phỏng lên sự tăng sinh, sự hình thành cấu trúc khung xương của tế bào gan người cho đến nay vẫn chưa được đặc trưng và rõ ràng. Việc nghiên cứu sự thay đổi tăng sinh và cấu trúc khung xương của tế bào gan Chang trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng là cần thiết trong bối cảnh ngày càng có nhiều nghiên cứu về tác động của vi trọng lực lên cơ thể sinh học. Với sự phát triển của công nghệ không gian, việc hiểu rõ tác động của vi trọng lực lên các tế bào, đặc biệt là tế bào gan, trở nên ngày càng quan trọng, đặc biệt trong bối cảnh chuẩn bị cho các sứ mệnh không gian dài ngày. Hiểu rõ cơ chế tác động của vi trọng lực lên tế bào gan có thể giúp chúng ta tìm ra những phương pháp điều trị hiệu quả hơn cho các bệnh liên quan đến gan, hoặc thậm chí phát triển các liệu pháp mới dựa trên cơ chế này.

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

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

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

## **3. Nội dung nghiên cứu**

Nội dung 1: Đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat).

Nội dung 2: Đánh giá sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào gan Chang (CCL-13) được nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat).

Nội dung 3: Đánh giá sự thay đổi cấu trúc khung xương tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat).

## **4. Cơ sở khoa học và thực tiễn của đề tài**

Cơ sở khoa học: Việc nghiên cứu về cơ chế tác động của vi trọng lực gây ra các thay đổi bất thường đối với một số quá trình sinh lý của mô và cơ thể là điều

cần thiết và có tính thời sự trong thời đại phát triển của khoa học vũ trụ. Nghiên cứu này sẽ cung cấp những hiểu biết sâu sắc về sự thay đổi trong cấu trúc khung xương tế bào và khả năng tăng sinh của tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Đây là một bước tiến quan trọng trong việc hiểu rõ cơ chế phân tử của sự thích nghi và thay đổi của tế bào trong môi trường vi trọng lực. Những phát hiện từ nghiên cứu này có thể mở ra những hướng nghiên cứu mới trong lĩnh vực y học vũ trụ và sinh học tế bào. Nghiên cứu này thực hiện góp phần chứng minh được sự tác động có tính bất lợi của điều kiện môi trường vi trọng lực, làm giảm quá trình tăng sinh và suy yếu cấu trúc khung xương tế bào gan.

Cơ sở thực tiễn: Kết quả nghiên cứu góp phần tham gia vào Chương trình nghiên cứu phát triển và ứng dụng khoa học và công nghệ vũ trụ (mã số: KC. 13/21-30), nghiên cứu là tiền đề cơ bản cho các thử nghiệm lâm sàng, từ đó có thể góp phần dự đoán các rủi ro cũng như đề xuất các phương án khắc phục nhằm bảo vệ sức khỏe, xây dựng các biện pháp phòng ngừa và điều trị các bệnh lí liên quan đến tác động của vi trọng lực lên cơ thể người đối với các phi hành gia thực hiện công tác ngoài vũ trụ. Ngoài ra, nghiên cứu còn có thể góp phần vào việc phát triển các ứng dụng công nghệ sinh học trong môi trường vi trọng lực, mở ra các cơ hội trong sản xuất dược phẩm hoặc nuôi cấy tế bào trong không gian.

### **5. Những đóng góp mới của luận án**

Điều kiện vi trọng lực mô phỏng bằng hệ thống 3-D clinostat đã ức chế khả năng tăng sinh tế bào gan Chang (CCL-13) thông qua giảm biểu hiện các gen kiểm soát chu kỳ tế bào và các gene liên quan bộ khung xương tế bào sau 72 giờ khảo sát. Trên cơ sở đó các nhà khoa học có thể nghiên cứu sâu hơn để đưa ra các giải pháp khắc phục các hạn chế và ảnh hưởng của vi trọng lực lên con người cũng như các loài sinh vật. Các nghiên cứu này không chỉ có giá trị trong việc bảo vệ sức khỏe của các phi hành gia mà còn góp phần mở ra các hướng nghiên cứu mới trong y học, sinh học tế bào và ứng dụng công nghệ sinh học trong môi trường vi trọng lực. Sự bùng nổ của các sứ mệnh không gian và kế hoạch khám phá sâu hơn vũ trụ khiến cho việc nghiên cứu này càng thêm thời sự và cấp bách. đóng góp vào việc mở rộng kiến thức về công nghệ sinh học tế bào (cấu trúc vi ống, vi sợi,...) mà còn có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong nhiều lĩnh vực khác nhau, đặc biệt là y học và hàng không vũ trụ.

## Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. Tổng quan về vi trọng lực

#### 1.1.1. Giới thiệu chung về vi trọng lực

Tất cả các sinh vật trên trái đất đều chịu tác động của trọng lực. Trọng lực của trái đất luôn tác động đến tất cả các hoạt động vật lí và sinh học trong toàn bộ quá trình tăng trưởng, phát triển của mọi sinh vật sống. Trọng lực đóng vai trò quan trọng trong suốt quá trình tiến hóa về hình dạng của sinh vật kể từ khi sinh vật di chuyển từ dưới nước lên trên cạn. Ngay cả khi, trong một khoảng thời gian trọng lực cũng ảnh hưởng đến chọn lọc tự nhiên bằng cách giới hạn kích thước cơ thể sinh vật trong khoảng cho phép. Để chống lại tác động của trọng lực, cơ thể sống cần phải phát triển các hệ thống như cấu trúc vận động, màng tế bào trở nên bền chắc, điều hòa dòng chảy của chất lỏng trong cơ thể. Tuy nhiên, trọng lực có thể ảnh hưởng một cách sâu sắc hơn đến cả hành vi và cấu trúc trong tế bào [1, 2].

Trên Trái đất, các điều kiện vi trọng lực thực sự có thể được tạo ra do rơi tự do từ tháp thả hoặc bằng các chuyến bay parabol của máy bay. Tuy nhiên, thời gian quá ngắn để thực vật hoặc tế bào thể hiện rõ ràng thay đổi trong tăng trưởng và phát triển. Môi trường vi trọng lực mô phỏng được tạo ra trên Trái đất bằng thiết bị clinostat không bị hạn chế về thời gian. Clinostat có thể quay chậm hoặc quay nhanh với một hoặc hai trục với vận tốc góc không đổi (2 vòng/phút). Đối với nuôi cấy tế bào huyền phù trong điều kiện vi trọng lực bằng cách sử dụng clinostat, xoay một hộp đựng mẫu chứa đầy chất lỏng với vận tốc không đổi. Sau một thời gian ngắn, tốc độ quay của các hộp đựng mẫu dừng lại, các hạt lơ lửng trong hộp phân phối ngẫu nhiên theo vòng tròn nhỏ.

Các nghiên cứu mô phỏng về điều kiện vi trọng lực (microgravity) nhằm thay thế môi trường không trọng lực trong không gian (các dự án nghiên cứu về sự sống trên không gian), hay điều kiện siêu trọng lực (hypergravity) (ly tâm) xác định được mức độ ảnh hưởng của trọng lực lên các quá trình sinh học, các hoạt động và các cơ chế trao đổi chất của các sinh vật. Tuy nhiên, các kết quả mà chúng ta có được về sự tác động của môi trường không trọng lực từ các thí nghiệm trong không gian còn rất hạn chế, chi phí này cũng rất tốn kém. Vì thế, các nhà khoa học đã nghiên cứu và thiết lập ra các mô hình nuôi cấy tế bào và các sinh vật trong điều kiện không trọng lực mô phỏng trên trái đất nhằm nghiên cứu sâu hơn về các tác động của môi trường vi trọng lực lên các hoạt động sống của sinh vật.

Hiện nay, nhiều trang thiết bị được thiết kế nhằm mô phỏng các trạng thái vi trọng lực khác nhau. Một số thiết bị được sử dụng phổ biến có thể kể đến như tháp rơi (drop tower), 2-D clinostat, buồng quay (RWV), máy định vị ngẫu nhiên (RPM)



hay 3-D clinostat,... Trong số đó, máy định vị ngẫu nhiên hay 3-D clinostat là thiết bị được sử dụng phổ biến để đánh giá khả năng tác động của vi trọng lực mô phỏng lên các tế bào trong hàng giờ.

Thuật ngữ “vi trọng lực mô phỏng” (SMG: simulated microgravity) được áp dụng đối với các thí nghiệm, bao gồm các thông số tạo ra sự mô phỏng (kích thước, hình dạng các buồng chứa mẫu, tốc độ quay hay đường kính trục quay, chế độ hoạt động...). Hơn nữa, thuật ngữ “vi trọng lực” được sử dụng đối với các điều kiện vi trọng lực thực sự trên trạm không gian quốc tế (ISS: International Space Station) hay các chuyến bay parabol. Đồng thời, thuật ngữ “vi trọng lực” này còn được sử dụng để chỉ các mức độ g khác nhau, từ khoảng  $10^{-6}$  g cho tới 1 g [3].

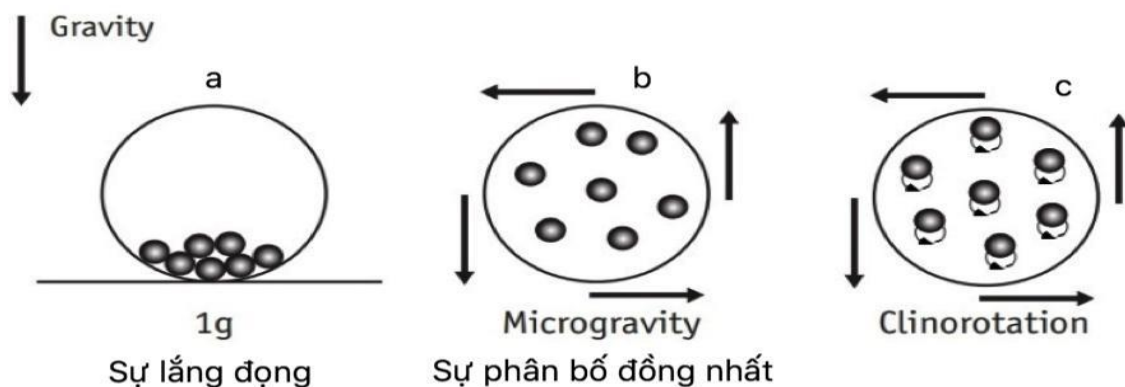
### 1.1.2. Các hệ thống mô phỏng điều kiện vi trọng lực

Nhiều mô hình thí nghiệm để nghiên cứu được thiết lập và phát triển để mô phỏng điều kiện vi trọng lực. Các mô hình được sử dụng để đánh giá mức độ ảnh hưởng của của điều kiện không trọng lực lên hệ thống sinh học của sinh vật trên trái đất. 3 hệ thống mô phỏng phổ biến được sử dụng là:

- Clinostat với 1 trục hoặc 2 trục (2-D, 3-D clinostats)
- Buồng quay (RWV: Rotating wall vessel)
- Hệ thống máy định vị trí ngẫu nhiên (RPM: Random positioning machine)

#### **Hệ thống Clinostat:**

Tất cả các dạng clinostat đều có một dạng phổ biến là mẫu chứa trong hệ thống nằm quay vuông góc với trường trọng lực để cản trở sự việc nhận biết vector gia tốc trọng trường của một hệ thống sinh học (Hình 1.1). Clinostat với một trục quay được gọi là 2-D clinostat (Hình 1.2).



**Hình 1.1.** Nguyên lý hoạt động của hệ thống 2-D clinostat [4]

*a: Các phần tử lắng dưới trọng lực 1g của trái đất; b: Trong điều kiện vi trọng lực thực, các phần tử mất quá trình lắng; c: Ở một tốc độ quay xác định, không có sự chuyển động nào của các phần tử liên quan đến vector trọng lực, các phần tử này chỉ chuyển động quanh bản thân chúng, do đó các phần tử này đang nằm trong trạng thái vi trọng lực mô phỏng.*



**Hình 1.2.** Mô hình 2-D clinostat [5]

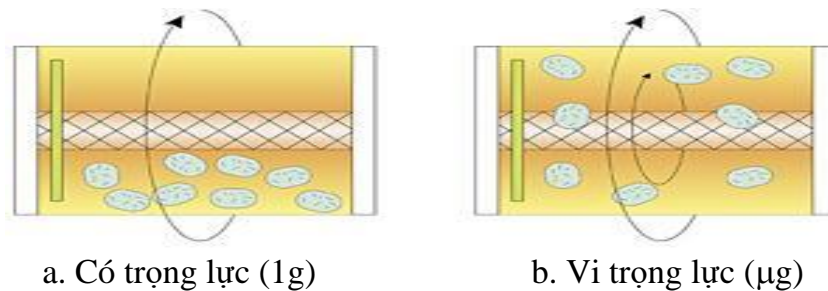
Trong khi đó ở 3-D clinostat, có một trục thứ hai được lắp đặt vuông góc với trục đầu tiên, vận hành với một tốc độ và sự định hướng ổn định. Nếu tốc độ và hướng quay được thay đổi ngẫu nhiên trong quá trình vận hành, thì hệ thống mô phỏng đó được gọi là máy định vị trí ngẫu nhiên. Những clinostat đầu tiên có tốc độ quay chậm từ 1-10 vòng/phút. Sự quay chậm này có khả năng ngăn cản những đáp ứng tăng trưởng được kích hoạt bởi trọng lực [5, 6].

Khái niệm về clinostat quay nhanh (fast rotating clinostat) được sử dụng với mục đích nghiên cứu tế bào [7], hay các sinh vật nhỏ và thực vật, được Wolfgang Briegleb giới thiệu vào những năm 1950. Sự quay nhanh và ổn định của hệ thống sẽ ngăn cản quá trình lắng của mẫu nghiên cứu. Việc quan sát sự chuyển động của các phân tử nằm ở vùng lân cận trong ống trục hay buồng quay cho thấy các phân tử này chịu một lực làm chúng di chuyển theo một con đường xoay vòng. Đường kính các vòng này càng giảm thì tốc độ quay càng tăng, cuối cùng chúng sẽ tiến tới một giai đoạn mà ở đó các chuyển động được cảm ứng bởi trọng lực có thể được loại bỏ. Do đó, một tế bào có thể quay quanh trục của nó và được bao quanh bởi một lớp chất lỏng [8]. Từ nguyên lý cơ bản này, nhiều hệ thống clinostat được phát triển với nhiều hệ thống hỗ trợ như hệ thống kính hiển vi quan sát (Clinostat Microscope), hệ thống hỗ trợ đo động lực trực tuyến (Photomultiplier Clinostat), hệ thống cố định trong quá trình quay (Pipette Clinostat), hệ thống nghiên cứu điều kiện ngập chìm (Submersed clinostat), hệ thống nuôi tế bào bám dính... [9].

#### ***Hệ thống buồng quay (RWV):***

Buồng quay hay hệ thống bioreactor quay (được phát triển bởi NASA) được thiết kế để nuôi cấy tế bào [10] và các sinh vật thủy sinh như trứng hay phôi cá [11, 12]. Các đối tượng được giữ trong dịch nuôi cấy, trong khi chúng chuyển động rơi liên tục trong hệ thống. Hệ thống nuôi cấy ngập chìm phổ biến hiện nay được thiết kế bởi Trung tâm nghiên cứu không gian của Đức [13], hệ thống này được sử dụng

để nghiên cứu quá trình phát triển của cá trong trạng thái vi trọng lực mô phỏng. Hình 1.3 mô tả cấu trúc cơ bản của một buồng quay theo nghiên cứu của Becker và Souza năm 2013 [14].



a. Có trọng lực (1g)

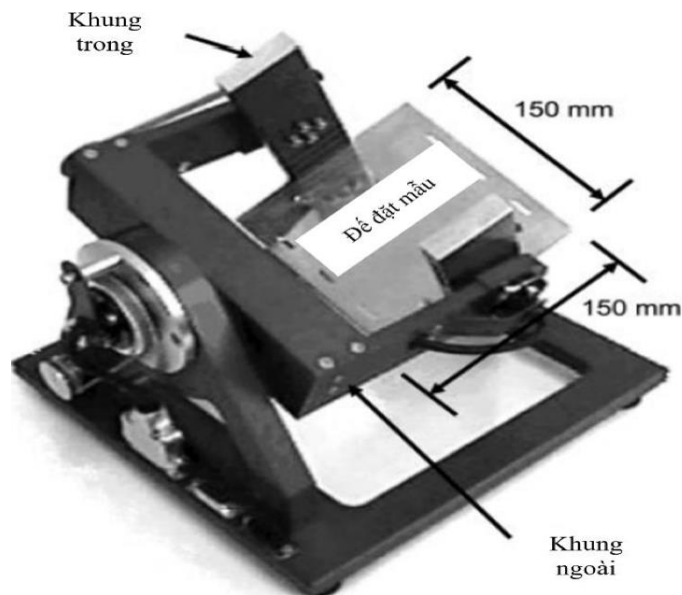
b. Vi trọng lực ( $\mu\text{g}$ )

**Hình 1.3.** Buồng quay (RWV)

(NASA – [http://www.nasa.gov/missions/science/f\\_spacecells.html](http://www.nasa.gov/missions/science/f_spacecells.html))

#### **Hệ thống máy định vị trí ngẫu nhiên (RPM):**

Có giả thiết cho rằng chất lượng của việc mô phỏng vi trọng lực đối với các mẫu lớn hơn có thể được tăng cường bằng việc quay mẫu quanh hai trục. Hệ thống này được phát triển đầu tiên ở Nhật Bản và Hà Lan [15]. Hệ thống này có hai trục quay độc lập nhau. Trong trường hợp cả hai trục đều quay với một tốc độ và hướng ổn định, chúng được gọi là clinostat 3-D. Nếu cả hai trục được vận hành với tốc độ và hướng ngẫu nhiên thì chúng được gọi là máy định vị trí ngẫu nhiên (random positioning machine-RPM) (Hình 1.4) [16].



**Hình 1.4.** Máy định vị trí ngẫu nhiên (RPM) [25]

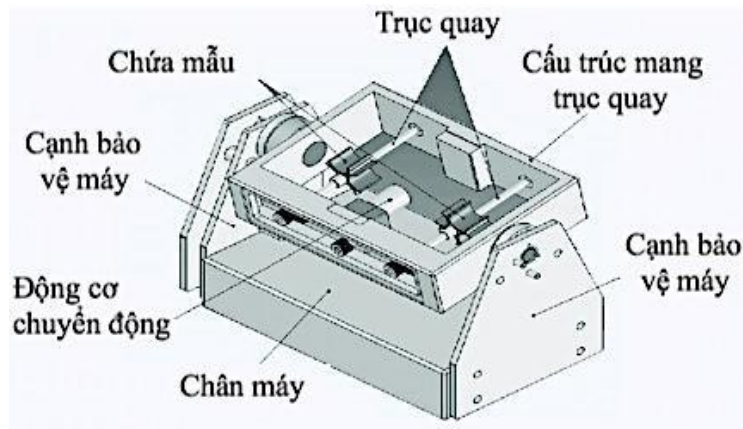
Lúc đầu, việc sử dụng máy định vị ngẫu nhiên để tạo điều kiện vi trọng lực cho các tế bào động vật có vú còn bị hạn chế do các tế bào động vật có vú rất nhạy cảm với sự biến động nhiệt độ vì thế chúng cần phải được nuôi cấy trong các tủ nuôi có thể điều chỉnh nhiệt độ. Sau đó, các nhà khoa học đã dùng một cách tiếp cận khác nhằm làm giảm bớt các hạn chế như thu nhỏ kích thước của máy định vị ngẫu

nhiên (kích thước tối đa khoảng  $50 \times 50 \times 50$  cm) giúp phù hợp hơn với tủ nuôi cấy tế bào thông thường [17].

***Hệ thống mô phỏng vi trọng lực 3-D clinostat:***

3-D clinostat là một mô phỏng vi trọng lực dựa trên nguyên tắc vector trọng lực trung bình. Trọng lực là một vector vì nó có độ lớn và hướng. Trong quá trình chạy thử nghiệm 3-D clinostat hai trục, vị trí mẫu có liên quan đến hướng vector trọng lực Trái đất và không ngừng thay đổi. Trong clinostat, mô phỏng vi trọng lực có được bằng cách thay đổi định hướng ngẫu nhiên liên tục để vector trọng lực tương đối. Vector trọng lực được tạo ra bởi sự kết hợp của hai chuyển động khác nhau có thể mô phỏng kết quả tương đương với tác động của trọng lực thực sự. Trọng lực mô phỏng trong clinostat phụ thuộc vào tốc độ và khoảng cách của mẫu đến tâm quay. Nuôi cấy tế bào được đặt trong một mô-đun quay của clinostat và quay 2-3 vòng/phút. Sau đó, clinostat chạy trong một khoảng thời gian xác định (vài giờ đến vài ngày). Các mẫu nuôi cấy được loại bỏ và thử nghiệm cho các đặc tính như sự phát triển của tế bào, kích thước và hình dạng, sự phân bố của các thụ thể, tính toàn vẹn của tế bào học hoặc biểu hiện gen.

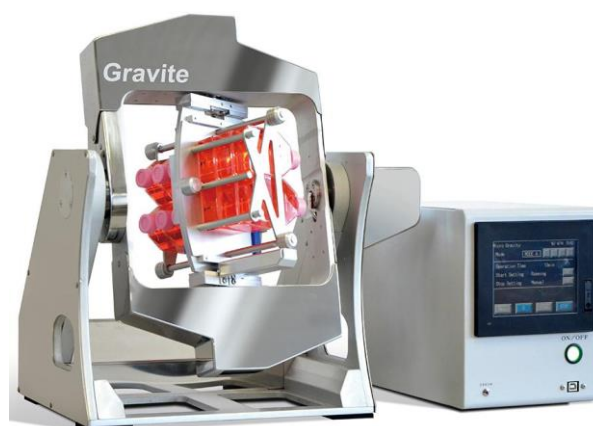
3-D clinostat được phát triển bởi Trung tâm Trọng lực/PUCRS, Brazil, có hai trục quay (mỗi trục dài 100mm), trong đó bốn mẫu có thể được gắn vào từng trục và thử nghiệm cùng lúc. Tốc độ quay của cả hai trục cố định ở 1,6 vòng/phút, tương đương với 0,00168 Gy/s (vận tốc góc). 3-D clinostat được cài sẵn phần mềm SolidWorks. Phần bên trong của 3-D clinostat là cấu trúc hình chữ nhật  $288 \times 209$  mm. Hai hộp đựng mẫu làm bằng nylon. Bốn giá đỡ làm bằng ống nhựa PVC 32mm, mỗi giá đỡ đều có 4 màn hình bao quanh trục quay. Do đó, tám mẫu nuôi cấy tế bào đều được tiếp xúc với mô phỏng vi trọng lực cùng lúc. Cấu trúc bên ngoài clinostat có hình chữ V lộn ngược với kích thước  $383,5 \times 220$ mm. Khoảng cách giữa tâm của buồng khuếch tán vi trọng lực và tâm của trục quay là 25,5mm (Hình 1.5).



**Hình 1.5.** Hệ thống 3-D clinostat [26]

Đối với các chuyển động quay, hai động cơ DC 3,8 vòng, 24V đã được sử dụng. Những động cơ này kết hợp với các hệ thống bánh răng. Để cung cấp một chuyển động quay vòng của toàn bộ cấu trúc bên trong, một hệ thống vành đai ròng rọc được sử dụng để chuyển chuyển động quay từ động cơ được đặt bên dưới cấu trúc bên ngoài. Đối với chuyển động quay của mẫu, một hệ thống vành đai ròng rọc khác được sử dụng với cả hai trục quay được gắn với ròng rọc và sau đó, thông qua hai vành đai, được quay bằng cùng một ròng rọc trên trục động cơ. 3-D clinostat sử dụng nguồn cung cấp năng lượng tự chuyển đổi 12V, 1,5A. Động cơ quay được kết nối trực tiếp với nguồn điện [18].

Hiện nay hệ thống này được sử dụng rộng rãi cho các thí nghiệm mô phỏng vi trọng lực trên mặt đất. Trong nghiên cứu này, hệ thống 3-D clinostat được sử dụng để mô phỏng vi trọng lực trên mặt đất (Hình 1.6). Thiết bị này được đặt trong tủ nuôi cấy chứa 5% CO<sub>2</sub> và nhiệt độ được điều chỉnh 37°C để tạo điều kiện tối ưu cho các tế bào tăng sinh và phát triển bình thường. Hệ thống với 2 trục quay độc lập nhau, khi hoạt động sẽ phân tán hướng vecto trọng lực liên tục làm mất tác động của trọng lực lên mẫu.



**Hình 1.6.** Thiết bị 3-D clinostat Gravity Controller Gravite

(NASA – [http://www.nasa.gov/missions/science/f\\_spacecells.html](http://www.nasa.gov/missions/science/f_spacecells.html))

Các mô hình 2-D clinostat, 3-D clinostat hay RPM có thể mô phỏng điều kiện vi trọng lực rất tốt cho việc nghiên cứu tế bào động vật ở dạng huyền phù [19]. Tuy nhiên một số thông số trong hệ thống này cần được điều chỉnh như sự hệ thống kết nối mẫu, gradient gia tốc g... [20].

2-D clinostat là mô hình mô phỏng vi trọng lực phù hợp với nuôi cấy tế bào huyền phù. Các nghiên cứu với tế bào huyền phù trong mô hình RPM vẫn đang được nghiên cứu. Nuôi cấy tế bào trong điều kiện 3-D có thể được thực hiện bằng mô hình RPM hoặc 3-D clinostat, đây là những mô hình cung cấp nhiều thông số cho nghiên cứu trong lĩnh vực kỹ nghệ mô.

### ***1.1.3. Các nghiên cứu về vi trọng lực***

Nhiều nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới đã được thực hiện và đều cho thấy mức độ ảnh hưởng rõ rệt của điều kiện vi trọng lực đến sự tăng sinh tế bào, sự phân bố chu kỳ tế bào, các quá trình biệt hóa tế bào, bám dính tế bào, apoptosis, toàn vẹn bộ gene và sửa chữa tổn thương DNA của các tế bào, mô ở động vật và người.

Điều kiện vi trọng lực (SMG) đã làm thay đổi tỉ lệ tăng sinh và tách rời tế bào phôi chuột (mES) [21]. Chức năng tế bào miễn dịch cũng bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi môi trường SMG, điều này cho thấy các con đường dẫn truyền tín hiệu tế bào trong các tế bào của hệ thống miễn dịch phụ thuộc vào sự tồn tại của trọng lực. Ngoài ra, sự phát triển của nguyên bào xương bị giảm, khả năng được kích hoạt để phát triển bị thay đổi đáng kể trong điều kiện vi trọng lực [22]. Các tế bào tủy xương cũng được nuôi bởi vi trọng lực mô phỏng và cho thấy rõ sự thay đổi hình thái tế bào, quá trình trao đổi chất làm tăng các phản ứng oxy hoá và làm giảm tốc độ tăng sinh của tế bào [23].

Các nghiên cứu trên tế bào gốc dưới điều kiện vi trọng lực ngoài không gian và vi trọng lực mô phỏng trên mặt đất cũng đã chứng minh rằng trọng lực yếu tố vi trọng lực ảnh hưởng mạnh đến mor-phology, tăng sinh, phân biệt và truyền tín hiệu trong các tế bào [24]. Đồng thời, vi trọng lực gây ra thay đổi hình thái tế bào và thay đổi vi ống, thúc đẩy phản ứng apoptotic thông qua điều chế kết hợp các phản ứng apoptosis ở các con đường Uev1A/TICAM/TRAF/NF B và p53/PCNA- và ATM/ATR Chk1 của tế bào [25]. Vi trọng lực phá vỡ các quá trình trùng hợp và khử polymer của các polymer cytoskeleton chính, do đó ảnh hưởng trực tiếp đến sự truyền tín hiệu, tổng hợp và bài tiết các cytokine và biểu hiện gene, cuối cùng có thể dẫn đến quá trình apoptosis [26]. Ngoài ra, trên các tế bào thần kinh đệm, vi trọng lực mô phỏng cũng ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào và giảm sự biểu hiện các gene Bcl-2 và Bax trong quá trình apoptosis [27].

Các tế bào gan chuột khi được nuôi cấy trong điều kiện SMG cũng đã làm thay đổi sự trao đổi chất của Loureirin B và sự biểu hiện của Cytochrome P450 chính [28]. Ngoài ra vi trọng lực còn gây ra rối loạn điều hòa lipid trong gan chuột [29].

Ở Việt Nam cũng đã có các nghiên cứu về sự ảnh hưởng của môi trường vi trọng lực mô phỏng (SMG) 3-D clinostat đến khả năng tăng sinh, chu kỳ tế bào, quá trình apoptosis, bộ khung xương tế bào của các loại tế bào động vật và người. Trong điều kiện SMG đã làm giảm diện tích tế bào nguyên bào sợi phôi chuột (MEFs); Cường độ hạt nhân của MEFs biểu hiện cao hơn; tỉ lệ tế bào MEFs ở pha G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>

giảm, tỉ lệ tế bào pha S và pha G<sub>2</sub>/M lại tăng; giảm đường kính của các bó sợi Actin của MEFs [30]. Đối với tế bào hạt của buồng trứng ở lợn (pGC), điều kiện SMG đã làm ức chế khả năng tăng sinh của tế bào; giảm mật độ tế bào; tỉ lệ tế bào pGC tăng lên trong pha G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> và giảm trong pha S và G<sub>2</sub>/M; giảm sự biểu hiện phiên mã và dịch mã ở các gene cyclin D1, cdk4 và cdk6 điều hoà chu kỳ tế bào pGC [31]. Ngoài ra, dưới tác động của vi trọng lực mô phỏng cũng làm giảm khả năng tăng sinh của tế bào gốc trung mô dây rốn người (hucMSCs); tỉ lệ tế bào hucMSC trong pha G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> tăng cao; giảm biểu hiện gene và các protein cyclin A1 và A2, cdk4 và cdk6 điều hoà chu kỳ tế bào; cường độ hạt nhân của các tế bào hucMSC giảm thấp hơn; giảm biểu hiện của các gene  $\beta$ -actin và  $\alpha$ -tubulin tham gia hình thành cấu trúc khung xương của tế bào và đã tạo ra sự sắp xếp lại các vi ống và vi sợi trong tế bào hucMSC [32].

## **1.2. Giới thiệu chung về gan**

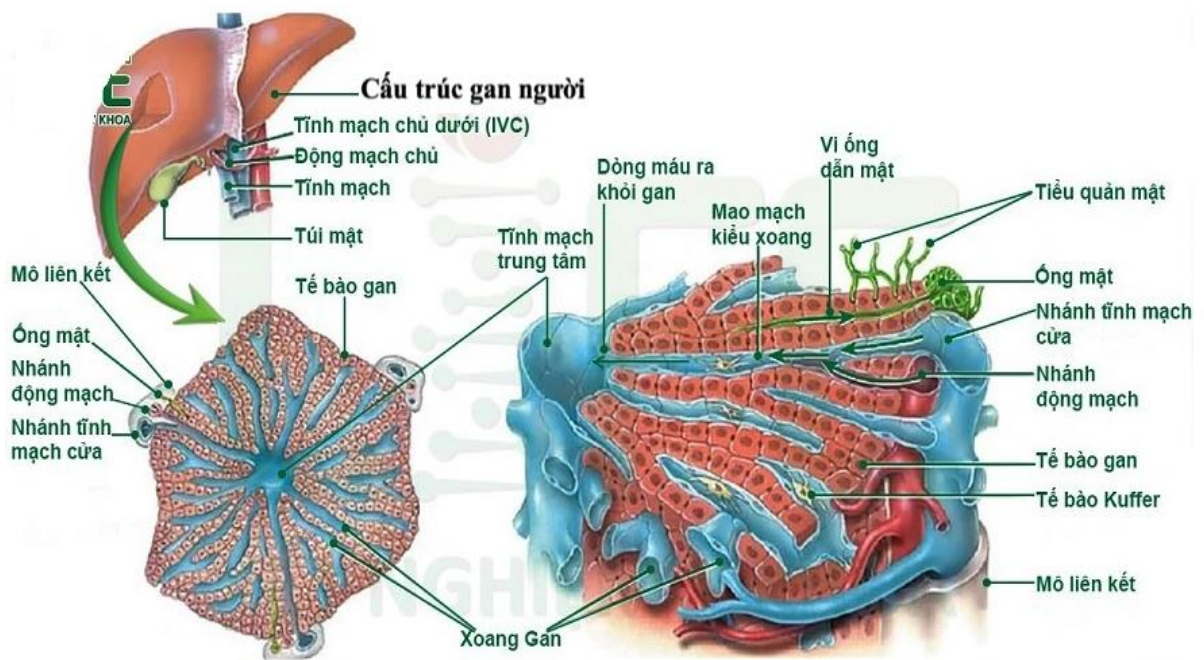
### **1.2.1. Cấu trúc của gan**

Gan là một cơ quan của các động vật có xương sống. Cơ quan này trong cơ thể có vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hoá các chất và một số chức năng khác như dự trữ glycogen, tổng hợp protein huyết tương và thải độc. Gan là cơ quan lớn nhất của cơ thể người, gan sản xuất dịch mật, một dịch thể quan trọng trong quá trình tiêu hoá, làm tăng khả năng hoà tan mỡ. Nhiệm vụ quan trọng nhất của gan là giảm và loại bỏ chất độc có trong máu. Gan vừa là tuyến ngoại tiết vừa là tuyến nội tiết kiểu lưới. Gan là một trong những nội tạng của cơ thể có khả năng tái tạo lại lượng nhu mô bị mất [33].

Gan nhận một nguồn cung cấp máu kép từ động mạch gan và tĩnh mạch cửa, 20% lưu lượng máu giàu oxy từ động mạch gan và 80% máu giàu chất dinh dưỡng từ tĩnh mạch cửa.

Về cấu trúc giải phẫu, gan có thể được chia thành 1 số tiểu thùy có kích thước và số lượng thay đổi theo các loài. Ở gan người được chia làm 4 thùy. Nhìn từ mặt trước, dây chằng kiềng của gan chia gan thành 2 phần: Thùy gan phải và thùy gan trái.

Phần lớn các tế bào trong gan là tế bào gan, chiếm hai phần ba khối lượng của gan. Các tế bào còn lại là tế bào Kupffer, tế bào sao, tế bào nội mô, tế bào mạch máu, tế bào ống mật và các cấu trúc hỗ trợ. Tế bào gan có 2 cực khác nhau. Một cực của tế bào gan lót khoang Disse và một cực tạo thành màng của tiểu quản mật, qua đó các thành phần của mật được tiết ra (hình 1.7).



**Hình 1.7.** Các loại tế bào trong mô gan [34]

### 1.2.2. Chức năng của gan

Gan thực hiện nhiều chức năng quan trọng khác nhau trong cân bằng nội mô và sức khỏe. Các chức năng này bao gồm tổng hợp hầu hết các protein cần thiết trong huyết thanh (albumin, protein vận chuyển, các yếu tố đông máu, yếu tố kích thích tăng trưởng và nội tiết tố), sản xuất và tiết mật cũng như các chất vận chuyển mật (acid mật, cholesterol, lecithin, phospholipid), điều hòa các chất dinh dưỡng (glucose, glycogen, chất béo, cholesterol, acid amin), chuyển hóa và kết hợp các hợp chất tan trong mỡ (bilirubin, anion, cation, thuốc) sau đó tiết qua mật và nước tiểu. Một số xét nghiệm thường được sử dụng để đánh giá các chức năng này như nồng độ bilirubin huyết thanh (xét nghiệm phản ánh sự kết hợp và tiết ở gan), nồng độ albumin huyết thanh và prothrombin time phản ánh chức năng tổng hợp protein [34].

### 1.2.3. Tế bào gan Chang (CCL-13)

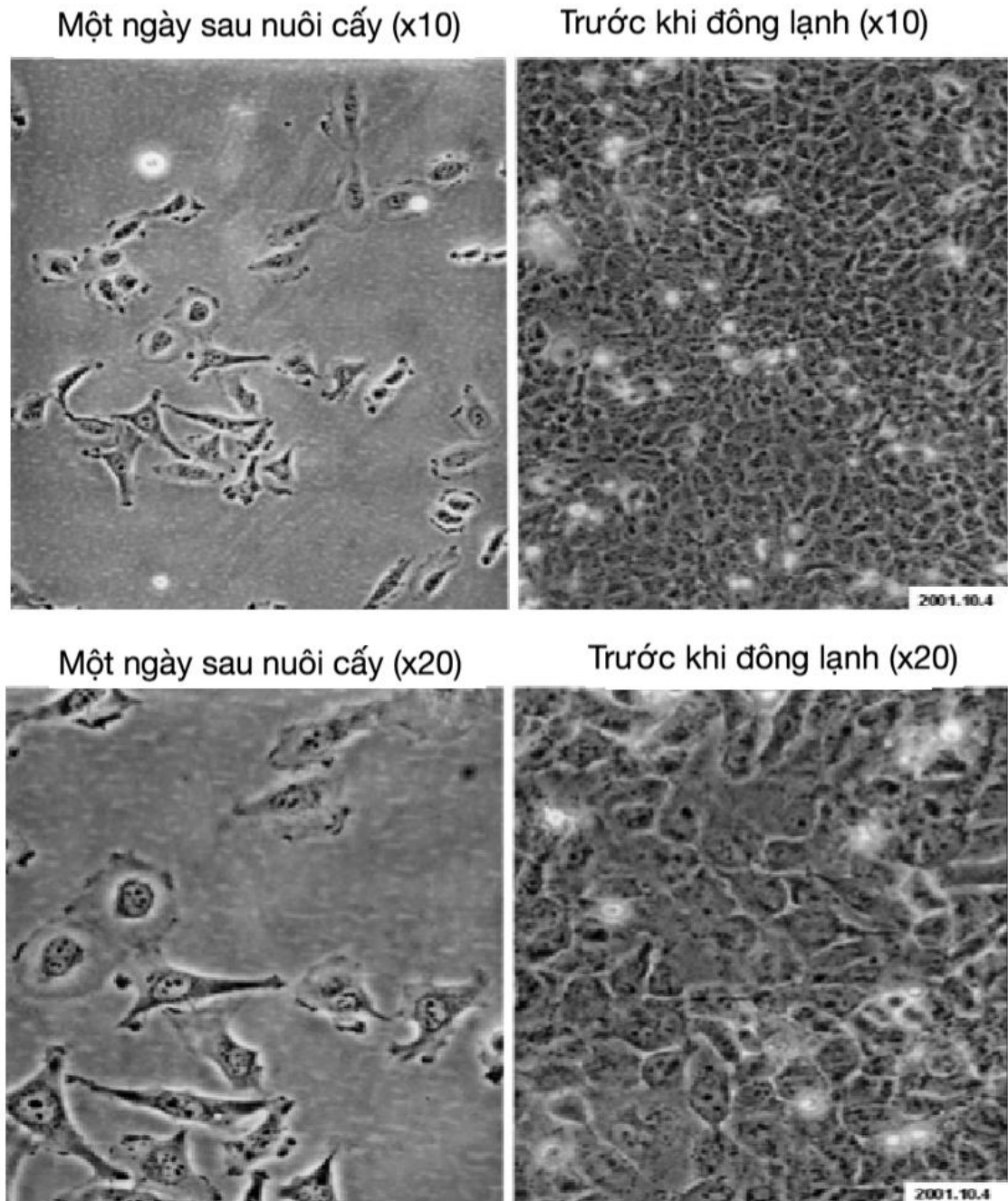
Dòng tế bào được gọi là tế bào “Chang liver” hay còn gọi là tế bào gan Chang bắt nguồn từ sinh thiết của một bệnh nhân trong một cuộc phẫu thuật mở bụng thăm dò vào đầu những năm 1950. Thông tin về bệnh nhân cung cấp dòng tế bào gan Chang được lấy thì rất ít: Theo Dr. Chang “Vì mục tiêu chỉ đơn thuần là thu được đủ số lượng tế bào hỗ trợ sự phát triển của một số loại virus đang được nghiên cứu, nên không có nỗ lực nào được thực hiện để ghi lại giới tính, chủng tộc, tuổi tác và chẩn đoán y tế của người hiến tặng mô”.

Dòng tế bào “Chang Liver” đã được gửi tại ATCC (American Type Culture Collection) vào tháng 12 năm 1962 (danh mục ATCC® # CCL-13™). “Chang Liver” đã được ký gửi để phân phối cho các nhà khoa học khác, những người đang



ngiên cứu riêng của họ, đang cần một mô hình *in vitro* “gan bình thường” bất tử, một loại hàng hóa rất hiếm trong những năm đầu tiên khi các kỹ thuật nuôi cấy tế bào đang được phát minh và thực hiện [35]. Dòng tế bào gan Chang có đặc điểm như tế bào gan bình thường.

Trong những năm gần đây, dòng tế bào gan Chang (CCL-13 của ATCC: American Type Culture Collection) đã được sử dụng rộng rãi như một mô hình tế bào gan bình thường của con người trong nhiều nghiên cứu *in vitro* khác nhau, ATCC tiếp tục bán tế bào “gan Chang” theo số danh mục ban đầu (hình 1.8) [18].



**Hình 1.8.** Tế bào gan Chang (JCRB9066: Changliver (08242001))  
<https://cellbank.nibiohn.go.jp/legacy/pictures/clp04574.jpg>

Việc sử dụng các tế bào gan nguyên phát trong nghiên cứu có thể gặp vấn đề do tính sẵn có không thể đoán trước, nguồn cung hạn chế và khả năng tự đổi mới, tính biến đổi phụ thuộc vào người hiến tặng và độ nhạy cảm chung của chúng trong quá trình phân lập và nuôi cấy thường đòi hỏi các chất dinh dưỡng bổ sung, đôi khi tốn kém, không có trong môi trường cổ điển [36]. Hơn nữa, sự mong manh và tốc độ tăng trưởng chậm của chúng hạn chế việc vận chuyển hiệu quả các axit nucleic ngoại lai, do đó cản trở ứng dụng của chúng trong các nghiên cứu về chức năng gene và protein. Trong khi đó, tế bào gan Chang phát triển liên tục có tầm quan trọng cơ bản đối với các nghiên cứu về sinh học virus viêm gan, sự hấp thu và chuyển hóa thuốc ở gan, nghiên cứu độc tính và điều tra chức năng tế bào gan [37, 38]. Đồng thời, trong nghiên cứu về gan, các dòng tế bào bất tử đóng một vai trò quan trọng trong nghiên cứu các quá trình sinh lý và bệnh lý nói chung [39].

### **1.3. Sự sinh trưởng tế bào**

#### ***1.3.1. Sự tăng sinh của tế bào***

Tế bào là một đơn vị cơ sở của sự sống và có thể phân chia một cách độc lập. Mỗi tế bào là một hệ thống mở, có khả năng trao đổi chất và chuyển hóa các chất nhằm tổng hợp năng lượng sử dụng cho các hoạt động sống. 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. Quá trình sinh trưởng của tế bào diễn ra nhờ vào sự lớn lên và phân chia không ngừng của các tế bào trong cơ thể sống, còn gọi là sự phát triển và tăng sinh của tế bào [40].

#### ***1.3.2. Chu kỳ phân chia tế bào***

Trong đời sống của tất cả sinh vật, sinh sản và bảo đảm tính ổn định di truyền của giống loài là một đặc trưng quan trọng để kéo dài sự sống. Vật chất di truyền được truyền từ đời này sang đời khác. Trong quá trình này, sự phân tách tế bào là điều kiện tiên đề của mọi hoạt động đời sống.

##### ***Khái niệm chu kỳ tế bào:***

Chu kỳ tế bào, hay chu kỳ phân chia tế bào, là chuỗi các sự kiện diễn ra trong một tế bào khiến nó phân chia thành hai tế bào con. Những sự kiện này bao gồm sự tự sao chép DNA và một số bào quan, sau đó là phân vùng tế bào chất và các thành phần khác thành hai tế bào con trong một quá trình gọi là phân chia tế bào hay phân bào [41].

Quá trình phân chia tế bào gồm phân bào nguyên nhiễm (nguyên phân) và phân bào giảm nhiễm (giảm phân).

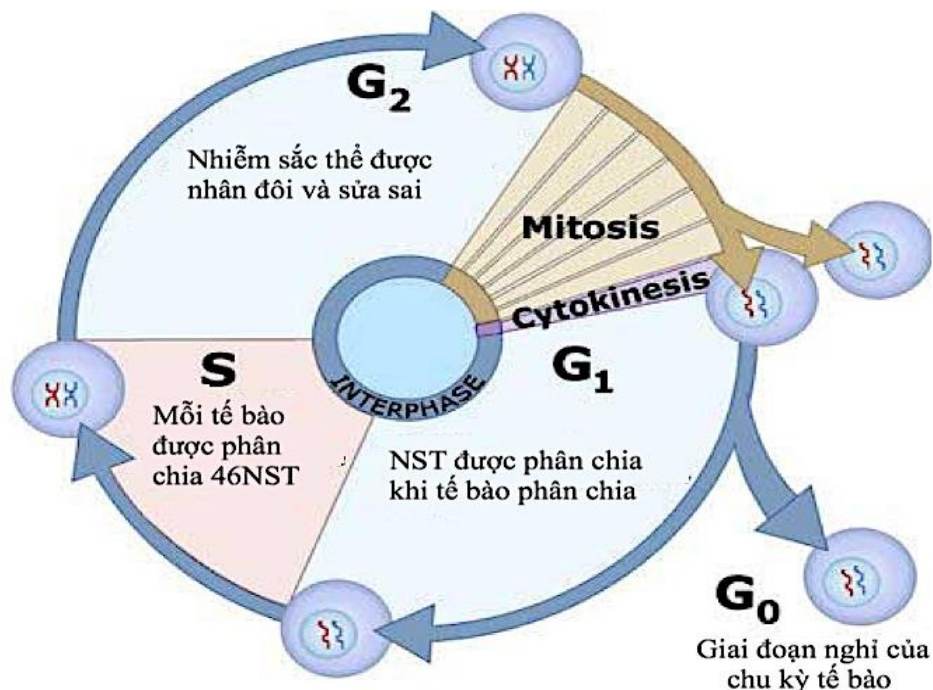
- Giảm phân: là quá trình phân bào xảy ra ở các tế bào sinh dục như tế bào trứng và tế bào tinh trùng.

- Nguyên phân: là quá trình phân bào xảy ra ở các tế bào sinh dưỡng, tạo ra hai tế bào mới giống hệt nhau và giống như tế bào ban đầu. Quá trình này tham gia vào sự tăng trưởng và phát triển của cơ thể sinh vật, đồng thời thay thế các tế bào già bị chết, bệnh lý hoặc các tế bào bị lão hóa. Đặc điểm của quá trình nguyên phân là biến đổi hình thái nhiễm sắc thể trong chu kỳ tế bào. Quá trình nguyên phân bao gồm 4 kỳ: kỳ đầu, kỳ giữa, kỳ sau và kỳ cuối. Nhiễm sắc thể (NST) của tế bào có những biến đổi về hình thái khác nhau qua các kỳ phân chia của chu kỳ tế bào.

#### **Các giai đoạn trong chu kỳ tế bào:**

Chu kỳ tế bào nhân chuẩn bao gồm bốn giai đoạn riêng biệt: pha  $G_1$ , pha S (tổng hợp), pha  $G_2$  và pha M (bao gồm nguyên phân và phân bào) (hình 1.9).

Pha M: gồm hai quá trình là nguyên phân và giảm phân. Trong đó, nhân của tế bào phân chia và cytokinesis, trong đó tế bào chất của tế bào phân chia tạo thành hai tế bào con. Quá trình phân chia tế bào chỉ chiếm khoảng 5% vòng đời của mỗi tế bào, 95% còn lại là giai đoạn trung gian (interphase), bao gồm các pha  $G_1$ , pha S và pha  $G_2$ . Ngoài ra, một số tế bào đặc thù sẽ đi vào trạng thái không hoạt động được gọi là pha  $G_0$ , ở đó các tế bào sẽ ngừng phân chia tạm thời hoặc vĩnh viễn [41].



**Hình 1.9.** Chu kỳ tế bào [41]

#### **(1). Giai đoạn trung gian:**

Giai đoạn trung gian (interphase) 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). Thông thường giai đoạn trung gian kéo dài khoảng 95% tổng thời gian cần thiết cho chu kỳ tế bào và chia thành ba quá trình nhỏ, gọi là các pha  $G_1$ , pha S và pha  $G_2$ .

Pha  $G_1$  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  $G_1$  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 giai đoạn này, tế bào tăng cung cấp protein, tăng số lượng bào quan (như ty thể, ribosome) và tăng kích thước. Trong pha  $G_1$ , 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  $G_0$  để bắt đầu quá trình biệt hóa, hoặc dừng lại ở pha  $G_1$  và có thể đi vào  $G_0$  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  $G_1/S$  cyclins. Thông tin truyền qua điểm kiểm tra  $G_1$  sẽ thúc đẩy tế bào phân chia [42].

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 trong giai đoạn này, ngoại trừ sản xuất protein histone chủ yếu xảy ra trong pha S [43, 44].

Pha  $G_2$  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  $G_2$  xem có bất kỳ tổn thương DNA nào trong nhiễm sắc thể hay không. Điểm kiểm tra  $G_2$  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 [41].

#### (2). 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: prophase (kì đầu), prometaphase (kì trước giữa), metaphase (kì giữa), anaphase (kì sau), telophase (kì 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 bố mẹ. Quá trình này chiếm khoảng 10% thời lượng chu kỳ tế bào.

### (3). *Pha nghỉ (G<sub>0</sub>)*

Pha G<sub>0</sub> 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 G<sub>0</sub> không hoạt động từ G<sub>1</sub> 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). Điều này rất phổ biến đối với các tế bào được phân biệt hoàn toàn. Một số tế bào bước vào giai đoạn G<sub>0</sub> 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 nhập G<sub>0</sub> 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 thường tạo thành một vụ bắt giữ trong G<sub>1</sub>. Lão hóa tế bào có thể làm cho con cháu của tế bào không thể sống được; nó thường là một sự thay thế sinh hóa cho sự tự hủy của một tế bào bị hư hỏng như vậy bởi apoptosis.

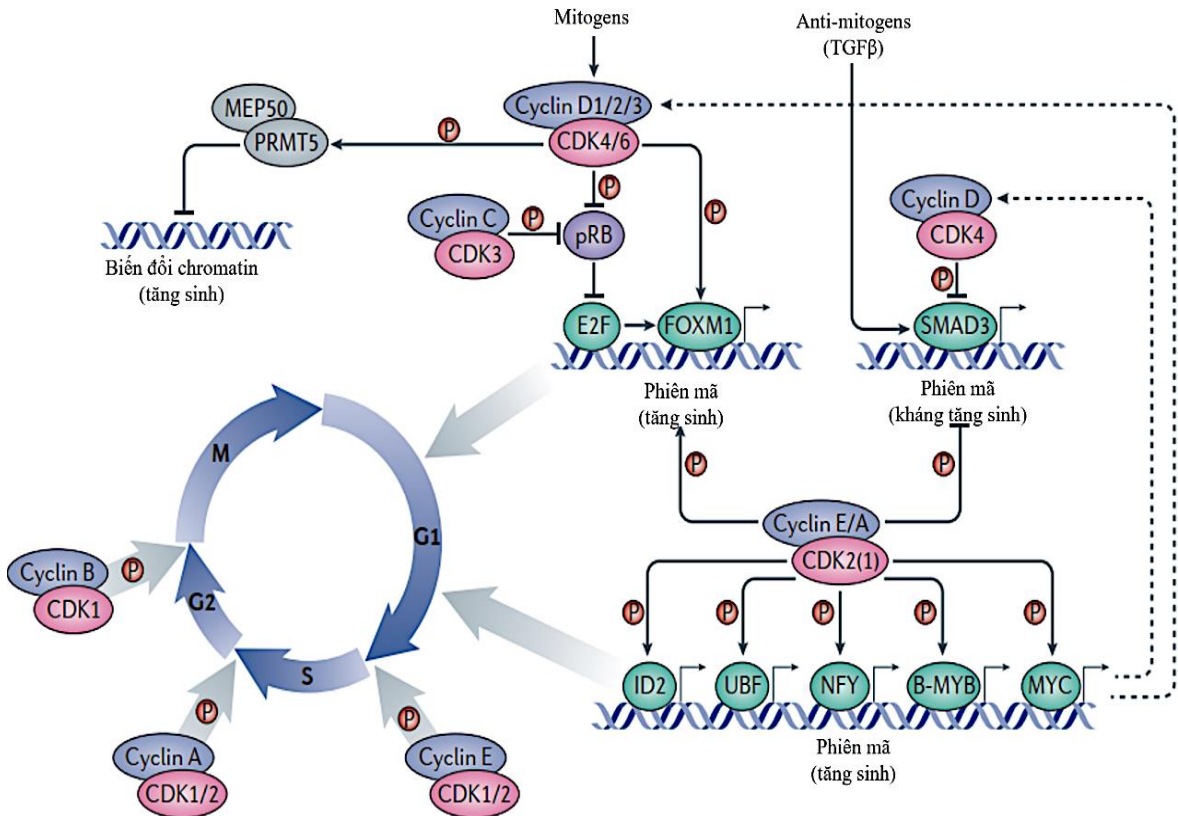
### ***Điều hòa chu kỳ tế bào:***

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 G<sub>0</sub> vào G<sub>1</sub> sớm. Tế bào đáp ứng với kích thích bên ngoài, tương tác thông qua hoạt động phosphoryl hóa thác đồ nội bào, bởi sự tăng điều hòa biểu hiện của kinase phụ thuộc cyclin (CDK). Chu kỳ tế bào bị thúc đẩy bởi một loạt các protein kinase, phức hợp CDK với cyclin tương ứng, lần lượt được phosphoryl hóa hoạt bởi kinase. Cyclin là đơn vị điều hòa và CDK là thành phần xúc tác. 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 G<sub>0</sub> và qua pha G<sub>1</sub>. Khi không có tín hiệu phân bào, tế bào có thể trải qua quá trình biệt hóa, apoptosis, hoặc đi vào lại pha G<sub>0</sub>. Chu kỳ bắt đầu ở G<sub>1</sub> 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 G<sub>1</sub> 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:**

Trong mô hình điều hòa chu kỳ tế bào hiện tại, chức năng chính của phức hợp Cyclin D-CDK4 và Cyclin-CDK6 là phosphoryl hóa và bất hoạt protein pocket, bằng cách đó cho phép phiên mã các gene cần thiết cho tiến trình chu kỳ tế bào. Phức hợp Cyclin D-CDK4 phosphoryl hóa SMAD3, ức chế tác dụng kháng tăng sinh thông qua tín hiệu TGF-β. Phức hợp Cyclin D-CDK4 và Cyclin-CDK6 hoạt hóa nhân tố phiên mã FOXM1 điều hòa biểu hiện nhiều chất điều hòa chu kỳ tế bào khác nhau, bao gồm các protein chỉ phối chuyển dịch pha G2-M [47]. Cyclin E và Cyclin A có liên quan đến thúc đẩy phiên mã thông qua quá trình phosphoryl hóa phụ thuộc CDK của một số nhân tố liên kết DNA, bao gồm SMAD3 và FOXM1, chất ức chế DNA binding 2 (ID2), nhân tố UBF và nhân tố phiên mã nhân Y (NFY). Phức hợp Cyclin A/E-CDK2 phosphoryl hóa nhân tố phiên mã MYC và B-MYC, bằng cách đó tăng cường khả năng của những protein này để hoạt hóa gene mục tiêu trong suốt chu kỳ tế bào. Trong khối u biểu hiện quá mức MYC, hoạt động của CDK2 dường như là cần thiết để ngăn chặn lão hóa tế bào và cho phép sự bất tử hóa ở tế bào ung thư [48].



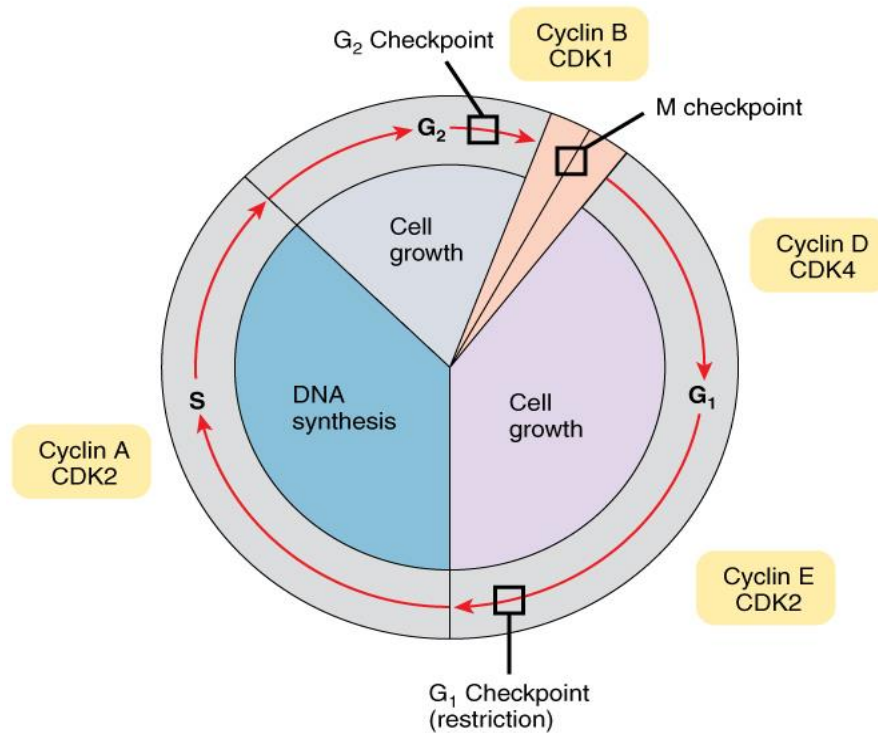
**Hình 1.10.** Vai trò của Cyclin và CDK trong chu kỳ tế bào [49]

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 gene trong chu kỳ tế bào.

Chức năng phiên mã trực tiếp của CDK6. Chức năng chính của CDK6 vẫn là hình thành phức hợp điều hòa phiên mã với Cyclin D và CDK4, một số nghiên cứu khác đã chỉ ra vai trò không phụ thuộc kinase của CDK6. CDK6 tương tác vật lý và ức chế hoạt động phiên mã của RUNX1 trong kiểu hoạt động độc lập kinase và bằng cách đó ngăn chặn quá trình biệt hóa. Không như CDK4, CDK6 hoạt hóa JUN và STAT3 cảm ứng phiên mã CDKN2a (mã hóa chất ức chế CDK4/6 p16<sup>INK4a</sup>) và nhân tố tăng trưởng nội mô mạch máu VEGFa. Trong khi ảnh hưởng của CDK6 lên biểu hiện p16<sup>INK4a</sup> cản sự hiện diện của Cyclin D, thì CDK6 tác động lên sự biểu hiện của VEGFa không phụ thuộc vào Cyclin D. Mặc dù Cyclin D cũng góp phần vào phiên mã gene VEGFa, cả CKD6 và Cyclin D đều điều hòa quá trình hình thành mạch thông qua những con đường khác nhau. Quan sát thấy rằng CDK6 điều hòa tăng chất ức chế của nó là p16<sup>INK4a</sup> chứng tỏ đã có một vòng phản hồi âm tính, theo đó CDK6 bảo vệ tế bào khỏi tăng sinh mất kiểm soát bằng cách kích hoạt biểu hiện quá mức CDK6 [50].

Cyclin A có thể kích hoạt hai CDK khác nhau và hoạt động trong cả pha S và nguyên phân. Sự tăng biểu hiện của cyclin A xảy ra ở giai đoạn chuyển tiếp G<sub>1</sub> / S và duy trì qua pha S. Với sự liên kết của cyclin A với CDK2, quá trình tổng hợp DNA được tiến hành. Trong giai đoạn sau của S, cyclin A liên kết với CDK1. Một checkpoint trong G<sub>2</sub> phản ứng với sự phá hủy DNA hoặc sự tổng hợp DNA không hoàn chỉnh: trì hoãn quá trình nguyên phân để sửa chữa DNA hoặc hủy bỏ chu kỳ. Cyclin A và B tăng tạo phức hợp với CDK1 thúc đẩy tế bào qua nguyên phân [51].

Có nhiều điểm kiểm soát điều hòa chu kỳ phân chia tế bào, trong đó có ba điểm kiểm soát chính là: điểm kiểm soát G<sub>1</sub>, còn gọi là điểm kiểm soát khởi đầu hoặc điểm kiểm soát giới hạn; điểm kiểm soát G<sub>2</sub>/M và điểm kiểm soát chuyển tiếp kỳ giữa – kỳ sau, còn gọi là điểm kiểm soát thoi vô sắc [50]. Hoạt động của các điểm kiểm soát được quyết định phần nhiều nhờ hoạt động của các kinase phụ thuộc cyclin điều hòa bởi các tiểu phần protein là các cyclin, mỗi dạng cyclin khác nhau được tạo ra ở mỗi giai đoạn khác nhau của chu kỳ tế bào và kiểm soát các hoạt động trong giai đoạn đó [51].



**Hình 1.11.** Mối quan hệ của các protein họ cyclin và CDK với mỗi pha trong chu kỳ tế bào. Điểm kiểm soát giới hạn nằm giữa pha G<sub>1</sub> và pha S của gian kỳ. Điểm kiểm soát G<sub>2</sub>-M nằm giữa pha G<sub>2</sub> và pha M. Điểm kiểm soát thoi vô sắc xảy ra giữa pha M [50].

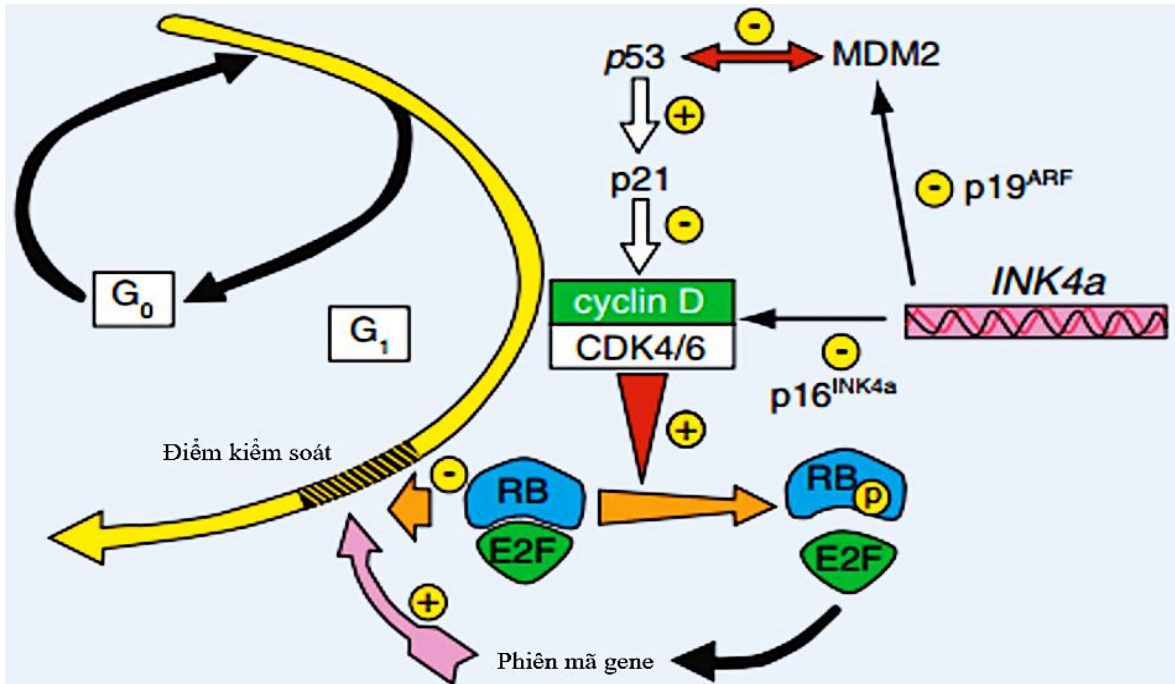
**- p53/p21 trong điều hòa chu kỳ tế bào:**

Tính toàn vẹn của bộ gene tế bào được theo dõi bởi nhân tố phiên mã p53. Khi xuất hiện tổn thương trong hệ thống di truyền, p53 làm gián đoạn chu kỳ tế bào cho phép tế bào có thời gian kích hoạt các con đường chỉnh sửa DNA, được hoàn thành khi phosphoryl hóa Rb ức chế p53. Trong điều kiện bình thường, khi tế bào nhân đôi mức p53 trong tế bào thường thấp hoặc không phát hiện, giúp cho quá trình phân chia tế bào có thể tiếp tục mà không bị cản trở. P53 được điều hòa âm tính bởi protein MDM2 (murine double-minute 2), và MDM2 cũng bị điều hòa bởi p53. MDM2 có hai chức năng: bình thường MDM2 điều hòa giảm p53, MDM2 bám lên p53 và làm giảm hoạt tính của nó, đem p53 từ nhân ra ngoài tế bào chất, sau đó được ubiquitin và phân giải. Khi xuất hiện tổn thương DNA, p53 bám lên vùng trình tự đặc hiệu trên DNA, cảm ứng sinh tổng hợp p53. p53 sau đó kích hoạt protein, đồng thời giảm khả năng liên kết và bất hoạt bởi MDM2 làm kéo dài gấp đôi thời gian bán hủy của p53. Kết quả hoạt tính của p53 tăng lên nhiều lần (hình 1.12).

p53 kiểm soát hoạt động chu kỳ tế bào thông qua sự tăng điều hòa phiên mã của chất ức chế CDK (CKI) p21, một chất ức chế hoạt động của CDK4, CDK6 và CDK2. Ức chế hoạt tính kinase ngăn phosphoryl hóa Rb, do đó tế bào duy trì G<sub>1</sub>



cho phép tế bào có thời gian sửa chữa DNA. Khi tổn thương DNA vượt quá khả năng chỉnh sửa của tế bào, lúc này p53 kích hoạt tế bào chết theo chương trình bằng cách cảm ứng biểu hiện các gene tiền apoptosis.



**Hình 1.12.** p53/p21 trong điều hòa chu kỳ tế bào [51]

Hai họ protein ức chế CDK liên quan đến điều hòa chu kỳ tế bào là Cip/kip cảm ứng chất ức chế p21 và p27, hoạt động tại một số vị trí trong chu kỳ tế bào, mục tiêu vào CDK4, CDK6 và CDK2. Họ thứ hai bao gồm các gene INK4 mã hóa hai vùng phiên mã riêng biệt là p16<sup>INK4a</sup> và p19<sup>ARF</sup>. p16<sup>INK4a</sup> ức chế đặc hiệu CDK4/6 trong khi p19<sup>ARF</sup> bám lên MDM2 và ngăn nó phân giải p53. Trong đáp ứng điều hòa tăng của p53, p21 tăng theo bởi CDK4/6 bị ức chế. Con đường phosphoryl hóa Rb bị ức chế và do đó duy trì tế bào ở G1 [51].

### 1.3.3. Vi trọng lực và sự tăng sinh của tế bào

Sự sống trên Trái Đất của chúng ta đã tồn tại cách đây hàng tỷ năm và sự sống vẫn tồn tại cho đến ngày nay trong sự ảnh hưởng không ngừng của trọng lực. Vì vậy, con người đã đặt ra câu hỏi liệu ở trong trạng thái không trọng lực hoặc vi trọng lực có ảnh hưởng đến quá trình phát triển cũng như các cơ chế trong hoạt động sống của các sinh vật trên Trái Đất hay không. Các nhà khoa học đã thực hiện nhiều chuyến bay đi vào không gian mang theo mô hình động vật cũng như các loại tế bào để trả lời cho câu hỏi này [52]. Tuy nhiên, do hạn chế về mặt chi phí và thời gian nên các nghiên cứu về tác động của vi trọng lực lên cơ thể và tế bào động vật trong không gian vẫn còn gặp nhiều giới hạn. Điều này đã thúc đẩy sự phát triển của các công cụ giúp mô phỏng tình trạng vi trọng lực ngay trên mặt đất.

Một số thiết bị mô phỏng vi trọng lực được sử dụng phổ biến hiện nay có thể

kê đến như tháp rơi (drop tower), 2-D clinostat, buồng quay (RWV), máy định vị ngẫu nhiên (RPM) hay 3-D clinostat,... Trong số đó, máy định vị ngẫu nhiên hay 3-D clinostat là thiết bị được sử dụng phổ biến để đánh giá tác động của vi trọng lực mô phỏng lên các tế bào trong hàng giờ [53].

Tế bào sinh vật cần phân chia để phát triển. Sự phân chia tế bào là cần thiết cho sự tăng sinh tế bào. Vi trọng lực mô phỏng có thể ảnh hưởng đến sự tăng sinh tế bào theo những cách khác nhau, tùy thuộc vào các hệ thống mô phỏng được sử dụng và dòng tế bào. Có một số nghiên cứu trên thế giới đã đánh giá được mức độ ảnh hưởng của vi trọng lực lên sự tăng sinh của các tế bào động vật như những thay đổi trong sự biểu hiện gene, sự chết theo chương trình, hình thái và chu kỳ tế bào [54].

Chu kỳ tế bào là chuỗi sự kiện diễn ra trong vòng đời của tế bào bao gồm quá trình phát triển và phân chia của chúng. Tế bào dành phần lớn thời gian cho giai đoạn trung gian (interphase), ở đó chúng lớn lên, nhân đôi nhiễm sắc thể để chuẩn bị cho quá trình phân chia. Tế bào sau đó đi vào quá trình nguyên phân để phân chia thành hai tế bào con. Các tế bào con này lại tiếp tục bước vào giai đoạn trung gian và bắt đầu chu kỳ của chúng [55]. Cyclins và CDKs (Cyclin-Dependent kinases) là hai nhóm phân tử đóng vai trò chính trong việc điều hòa chu kỳ tế bào [56]. Cyclin là những protein mang chức năng điều hòa, trong khi đó CDK là những enzyme xúc tác. Trong các giai đoạn của chu kỳ tế bào, Cyclins kích hoạt CDKs tạo ra phản ứng phosphoryl hóa nhằm kích hoạt hoặc bất hoạt các protein mục tiêu để điều phối diễn tiến của chu kỳ tế bào [57].

Gan là một trong những cơ quan có kích thước lớn ở người. Gan có chức năng quan trọng trong các quá trình chuyển hóa carbohydrate, protein và lipid. Tế bào gan chiếm khoảng 80% thể tích gan [58]. Cho đến nay đã có rất nhiều các công trình nghiên cứu về các hoạt động và chức năng của tế bào gan. Hầu hết các nghiên cứu thường được thực hiện trên tế bào gan Chang, là dòng tế bào đã được thương mại hoá và đã được nghiên cứu cho thấy có các đặc điểm sinh học và chức năng tương tự như các tế bào gan bình thường [59]. Tuy nhiên, Các nghiên cứu về tác động của vi trọng lực mô phỏng lên của tế bào gan người đến nay vẫn chưa được đặc trưng và rõ ràng. Những thay đổi của tế bào gan Chang trong hệ thống 3-D clinostat vẫn chưa được chứng minh. Sự thay đổi mật độ, diễn tiến của chu kỳ tế bào cũng như các yếu tố điều hòa chu kỳ của các tế bào này vẫn chưa được làm rõ. Do đó, nghiên cứu này tập trung đánh giá ảnh hưởng của môi trường vi trọng lực mô phỏng đối với sự tăng sinh của tế bào gan Chang, đặc biệt là trong quá trình phát triển chu kỳ tế bào và biểu hiện của các protein điều hòa hoạt động chu kỳ tế bào.

#### 1.4. 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 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 [60].

Quá trình 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 chẽ. Quá trình này được đặc trưng bởi sự co rút các thành phần trong tế bào, hạt nhân bị phân mảnh với cô đặc nhiễm sắc chất, nén chặt bào quan, phá vỡ nhân, tế bào chất bị phân mảnh hoặc ngưng tụ và hình thành các thể apoptotic [61]. Số lượng tế bào apoptotic 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 tác dụng procaspase).

Trong quá trình apoptosis hình thái nhân tế bào thay đổi bao gồm việc gãy vụn nhiễm sắc chất (trong nhiều trường hợp có hình lưới liềm hoặc hình dạng nửa mặt trăng), tiến tới sự cô đọng nhiễm sắc chất, sự co lại của toàn bộ hạt nhân thành một bóng duy nhất. Trong nhiều trường hợp khác chất nhiễm sắc nảy ra bên ngoài thành các bóng nhỏ, với mỗi bóng được bao quanh bởi màng hạt nhân. Những bóng nhỏ này gọi là các thể apoptotic, trong các thể này chỉ chứa DNA hoặc chỉ chứa RNA. Lớp vỏ hạt nhân vẫn còn giữ nguyên hình thái mặt dù lỗ nhân được phân phối lại bằng cách trượt ra khỏi bề mặt của vùng đóng xoắn nhiễm sắc chất và tích tụ lại. Những thay đổi hạt nhân apoptotic có thể được hình dung do cả sự phân mảnh DNA và sự phân giải polypeptide quan trọng của hạt nhân [62]. Do đó những thay đổi về mặt hình thái nhân tế bào có liên quan rõ rệt trong quá trình apoptosis.

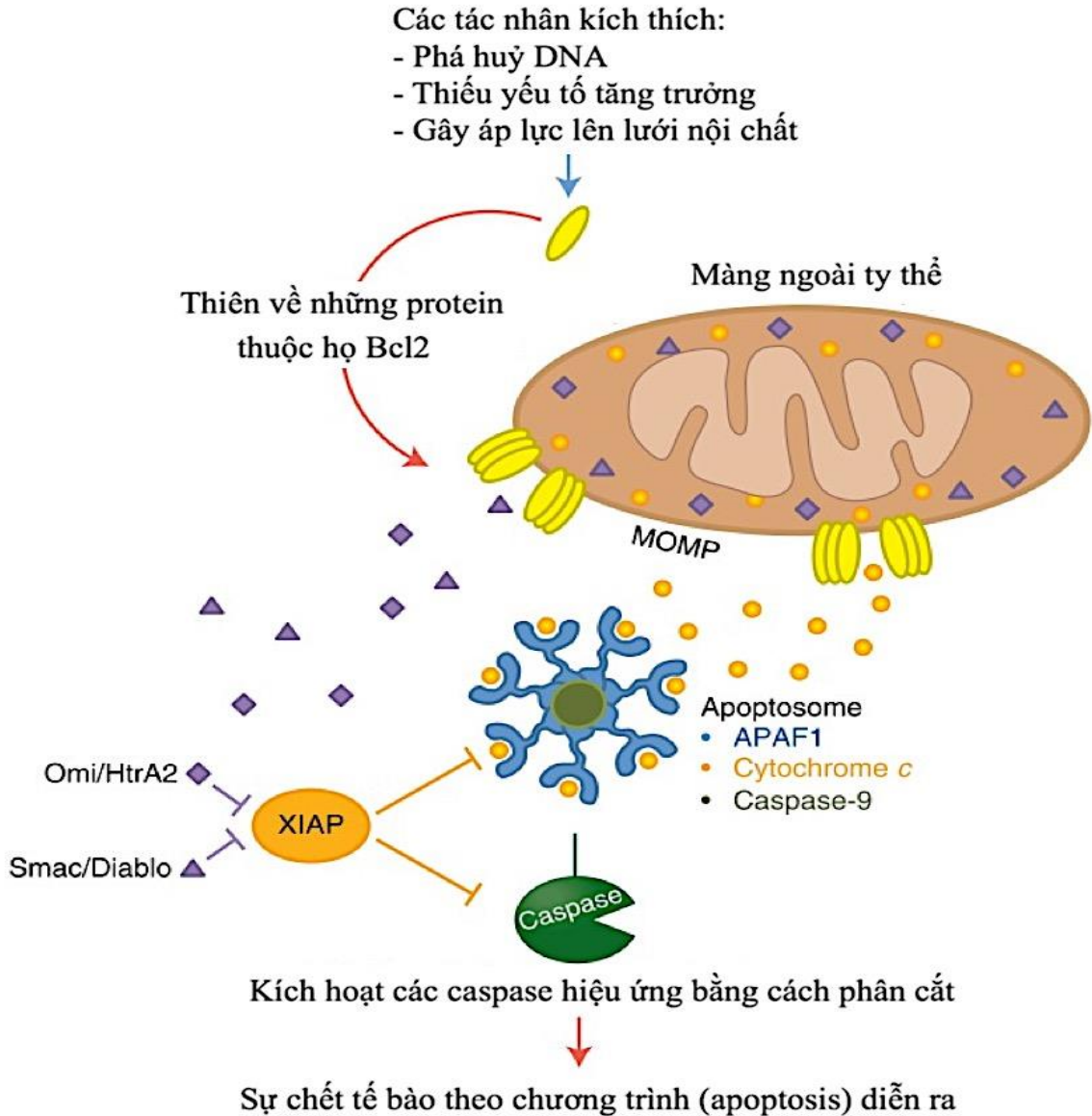
##### 1.4.1. Con đường apoptosis

###### *Con đường apoptosis nội sinh*

Con đường apoptosis nội bào hay apoptosis thông qua ty thể là cơ chế apoptosis phổ biến nhất ở động vật có xương sống. Nó được kích hoạt để đáp ứng lại nhiều loại stress của tế bào bao gồm các tổn thương DNA, thiếu hụt tín hiệu tăng trưởng và phát triển,... Trong con đường này, các pro-caspase 9 sẽ tập hợp lại thành

thể apoptosome và các pro-caspase 9 trong apoptosome sẽ tự hoạt hóa chính nó và phân cắt để trở thành dạng hoạt động là caspase 9. Sau đó, caspase 9 sẽ kích hoạt một loạt caspase hành sự phía sau dẫn tới quá trình apoptosis nội sinh [63].

Ở hình 1.13, tác nhân kích thích là các loại stress của tế bào làm cho các protein thuộc họ Bcl-2 cảm ứng tính thấm của màng ngoài ty thể (MOMP) và cho phép giải phóng các yếu tố proapoptosis bao gồm cytochrome c, Smac và Omi vào cytosol.



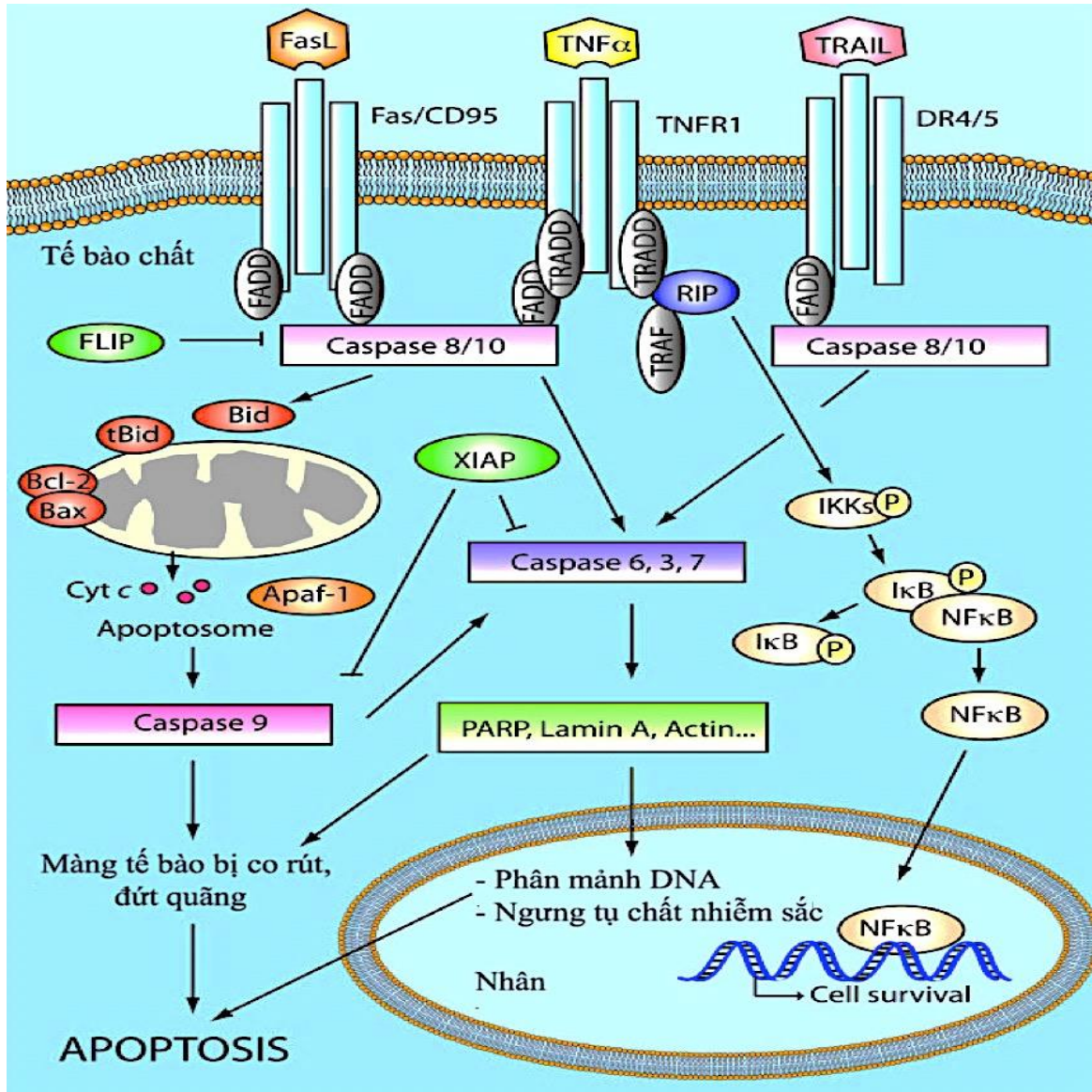
**Hình 1.13.** Con đường apoptosis nội sinh [63]<sup>[SEP]</sup>

Smac (còn được gọi là Diablo) và Omi (còn được gọi là HtrA2) giúp tăng cường hoạt động của apoptosome bằng cách bất hoạt chất ức chế caspase là XIAP. Khi không có Smac và Omi, XIAP liên kết và ức chế hoạt động xúc tác của caspase 9 và dẫn tới ức chế caspase 3 và caspase 7. Trong khi đó ở cytosol, cytochrome c liên kết với APAF1 và kích hoạt quá trình oligome hóa 7 tiểu phần APAF1–dATP–cytochrome c tạo thành thể apoptosome hoạt động. Tại phần lõi của apoptosome, caspase 9 được chiêu mộ và hoạt hóa bởi APAF1. Các caspase 9 hoạt hóa sau đó

xúc tác cho quá trình phân cắt và kích hoạt các caspase hành sự là caspase 3 và caspase 7 gây ra quá trình apoptosis nội sinh [63].

**Con đường apoptosis ngoại sinh**

Con đường apoptosis ngoại sinh được kích hoạt khi phối tử FasL, TRAIL, TNF $\alpha$  liên kết với các thụ thể chết DR (Fas/CD95, DR4/5, TNFR1) (hình 1.14).



**Hình 1.14.** Con đường apoptosis ngoại sinh [64]<sup>[1]</sup><sub>S&P</sub>

Cụ thể khi FasL, TRAIL và TNF $\alpha$  liên kết với các thụ thể Fas/CD95, DR4/5 và TNFR1 sẽ tạo thành phức hợp DISC. Sau đó, các adaptor protein FADD và TRADD đóng vai trò hỗ trợ trong việc chiêu mộ và kích hoạt caspase 8 và caspase 10. Tới lượt mình, caspase 8 và caspase 10 sẽ phân cắt và kích hoạt các caspase hành sự ở phía sau là caspase 3, caspase 6 và caspase 7. Tiếp theo, caspase 6 xúc tác cho sự phân cắt lamin A còn caspase 3 và caspase 7 lại xúc tác cho sự phân cắt của poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) dẫn tới sự co lại của tế bào, hình thành bóng màng, phân mảnh DNA, cô đặc nhiễm sắc chất và cuối cùng là quá trình apoptosis

ngoại bào. Bên cạnh đó, TNFR1 cũng có thể kích thích các con đường tiền viêm dẫn đến sự hoạt hóa NF $\kappa$ B thông qua việc chiêu mộ RIP. Khi NF $\kappa$ B được kích hoạt bằng TNF $\alpha$  sẽ làm cho phức hợp I $\kappa$ B kinase (IKK) bị phosphoryl hóa và làm cho các protein ức chế I $\kappa$ Bs bị thoái hóa. Sự thoái hóa của I $\kappa$ Bs xúc tác cho sự chuyển vị của NF $\kappa$ B đến nhân giúp tế bào tiếp tục sống sót. Như vậy, sự kết hợp của TNF $\alpha$  và TNFR1 có lợi cho cả sự sống sót của tế bào và quá trình apoptosis, tùy thuộc vào loại tế bào và bối cảnh sinh học [63, 64].

#### ***1.4.2. Tác động của vi trọng lực đến quá trình apoptosis***

Vi trọng lực được biết có ảnh hưởng đáng kể đến tất cả các khía cạnh của chức năng sinh sản trong các mô hình động vật. Nghiên cứu của Chidananda S. Sharma và cộng sự đã chỉ ra rằng điều kiện vi trọng lực đã gây ra những thay đổi ở cấp độ tế bào bao gồm cả quá trình apoptosis. Nhóm đã nghiên cứu ảnh hưởng của vi trọng lực mô phỏng lên hoạt động của caspase 8 và caspase 3 và yếu tố phiên mã NF $\kappa$ B trong con đường apoptosis ở tế bào tinh hoàn chuột. Kết quả họ đã nhận thấy hoạt động của caspase 8 và caspase ở nhóm tế bào tinh hoàn chuột trong điều kiện vi trọng lực tăng lần lượt gấp 1,4 và 5,1 lần so với nhóm đối chứng. Bên cạnh đó, nhóm tế bào ở môi trường vi trọng lực cũng tăng hoạt động của nhân tố phiên mã NF $\kappa$ B gấp 1,33 lần so với nhóm đối chứng [65]. Trong một nghiên cứu khác của Chun Yan Kang và cộng sự trên dòng tế bào nội mô mạch máu phổi người (HPMEC) đã phát hiện mức độ biểu hiện của cả hai gene Bax và caspase 3 cao hơn đối với các tế bào HPME nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực ở 72 giờ so với các tế bào HPME nuôi cấy ở điều kiện bình thường. Ngược lại, mức độ biểu hiện của gene Bcl-2 lại thấp hơn đối với các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng so với các tế bào đối chứng. Bên cạnh đó, sự hoạt hóa của PI3K và pAkt đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì khả năng tồn tại của các tế bào bằng cách chặn các con đường apoptosis. Chun Yan Kang và cộng sự cũng phát hiện sự biểu hiện của protein PI3K và pAkt đã giảm ở các tế bào được nuôi cấy trong 72 giờ ở mô phỏng vi trọng lực so với các tế bào đối chứng. Những điều này chỉ ra rằng môi trường vi trọng lực mô phỏng đã ảnh hưởng đến quá trình apoptosis ở các tế bào HPME [66]. Một nghiên cứu khác của Daniela Grimm và cộng sự trên dòng tế bào ML-1 đã cho thấy rằng ở điều kiện bình thường, chỉ có 2% tế bào ML-1 biểu hiện protein Fas khi phân tích flow cytometry. Sau 24 và 72 giờ tiếp xúc với môi trường vi trọng lực mô phỏng, lượng tế bào dương tính với Fas đã tăng lên tới 20% và 15%. Protein ức chế khối u p53 chỉ biểu hiện ở 1,5% tế bào ML-1 đối chứng đã tăng đáng kể lên đến 19% sau 24 giờ và 25% sau 72 giờ trong môi trường vi trọng lực. Ngoài ra, có 17,5% tế bào ML-1 đối chứng biểu hiện protein Bcl-2 trong khi

các tế bào ML-1 thí nghiệm đã giảm đáng kể sự biểu hiện của Bcl-2 (24 giờ: 8,1% và 72 giờ: 5,9%). Nhóm nghiên cứu cũng quan sát thấy việc tiếp xúc với môi trường vi trọng lực cảm ứng sự phân cắt của polymerase poly (ADP-ribose) 116 kDa thành đoạn 85 kDa là một dấu hiệu sớm của apoptosis [67].

## **1.5. Bộ khung xương tế bào**

### **1.5.1. Khái niệm**

Bộ xương tế bào là một cấu trúc vững chắc, giúp duy trì hình dạng của tế bào, bảo vệ tế bào và giúp tế bào di động (các cấu trúc lông và roi). Ngoài ra, nó còn có vai trò quan trọng không những trong sự vận chuyển bên trong tế bào (lấy ví dụ như các chuyển động của các túi màng và các bào quan) mà còn trong sự phân chia tế bào. Đây là một cấu trúc giống như bộ xương động vật và nổi trong tế bào chất.

Bộ xương tế bào, bộ khung nâng đỡ của tế bào, cũng như mọi bào quan khác, nó nằm trong tế bào chất. Bộ khung xương tế bào được xem là một cấu trúc vững chắc, giúp nâng đỡ màng nguyên sinh chất, duy trì hình dạng và bảo vệ tế bào. Ngoài ra, nó còn có vai trò quan trọng trong sự phân chia tế bào. Khung xương tế bào bao gồm ba thành phần chính là vi sợi (sợi actin), sợi trung gian và vi ống. Tất cả các thành phần này đều có khả năng tăng trưởng nhanh hoặc tháo gỡ phụ thuộc vào yêu cầu của tế bào [68].

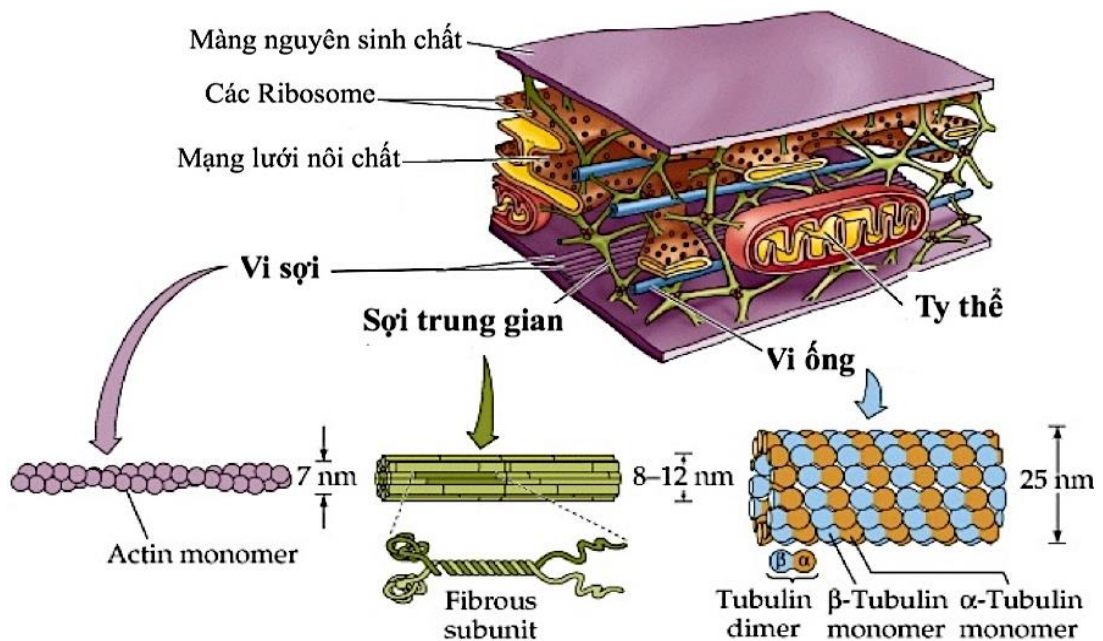
Hiện nay, có nhiều nghiên cứu nền tảng về bộ khung xương tế bào. Các nhà nghiên cứu đã sử dụng kính hiển vi với độ chính xác cao nhằm xác định vị trí và động năng của các protein trong khung xương tế bào ở các quá trình phân chia và di chuyển của tế bào. Ví dụ, hơn 150 protein đã được tìm thấy có chứa các vùng liên kết (binding domain) cho các protein actin được polymer hóa để tạo thành một trong các vi sợi chủ chốt trong khung xương tế bào [69]. Những protein điều hòa actin tạo thành một tổ hợp đại phân tử gọi là phức hợp WAVE thúc đẩy việc lắp ráp các mạng vi sợi actin ở mép dẫn hướng (leading edge) của các tế bào di động [70]. Năm 2007, khi quan sát các bạch cầu di động dưới kính hiển vi ánh sáng với độ phân giải cao, Weiner và cộng sự đã nhận thấy các phức hợp WAVE này hình thành những làn sóng có tính kết hợp cao tương quan với sự co thắt di động của tế bào [71].

Những quan sát như vậy trong các tế bào sống có thể kích thích sự hình thành các giả thuyết chi tiết về cách các phân tử phối hợp để hình thành các cấu trúc khung xương tế bào, nhưng để kiểm tra giả thuyết này một cách xác đáng, các thành phần phải được cô lập từ các tế bào và tinh chế. Đáng chú ý, các thí nghiệm kết hợp một số lượng nhỏ các protein tinh chế đã chứng minh rằng nhiều cấu trúc khung

xương phức tạp quan sát thấy trong tế bào có thể được tái tạo trong môi trường in vitro từ các thành phần tinh chế. Ví dụ, có ba protein làm nhiệm vụ chủ động theo dõi và vận chuyển vật chất vào đầu phát triển của vi ống, được hình thành bởi quá trình polymer hóa của các tiểu đơn vị bao gồm  $\alpha$ ,  $\beta$ -Tubulin dị nhị phân (heterodimers) và một số vi sợi chủ chốt trong tế bào [72]. Mặc dù danh sách các protein gắn liền với bộ khung tế bào vẫn đang tiếp tục được nghiên cứu bổ sung, nhưng mục tiêu cuối cùng chúng ta nên hướng tới vẫn là hiểu được sự tương tác của các phân tử cá thể trong khung xương tế bào như thế nào dẫn đến các biểu hiện quy mô lớn phụ thuộc vào chúng.

### 1.5.2. Cấu trúc bộ khung xương tế bào

Khung xương tế bào được cấu tạo bởi ba loại protein (vi sợi, sợi trung gian và vi ống). Mỗi loại protein có cấu trúc riêng biệt và được cấu thành từ các tiểu đơn vị protein khác nhau [73]. Sợi trung gian được cấu tạo từ các tiểu đơn vị protein dạng sợi, vi ống được cấu tạo từ các tiểu đơn vị dạng hình cầu Tubulin còn vi sợi được hình thành từ các tiểu đơn vị Actin hình cầu (Hình 1.15).



**Hình 1.15.** Thành phần cấu trúc khung xương tế bào [74]

Trong mỗi loại protein của khung xương có hàng ngàn tiểu phần tập hợp lại thành các sợi mảnh chạy dài xuyên suốt, nằm dưới màng nguyên sinh chất và kéo dài vào tới nhân tế bào [74].

Polymer hóa và khử polymer hóa của vi sợi actin và vi ống tạo ra các lực định hướng làm thay đổi hình dạng tế bào, cùng với các động cơ phân tử di chuyển dọc theo các vi sợi actin và vi ống, hướng dẫn tổ chức các thành phần của tế bào. Kiến trúc của các mạng lưới được hình thành bởi polymer khung xương tế bào được kiểm soát bởi một số lớp protein điều hoà: nhân tố thúc đẩy nhân, khởi động sự



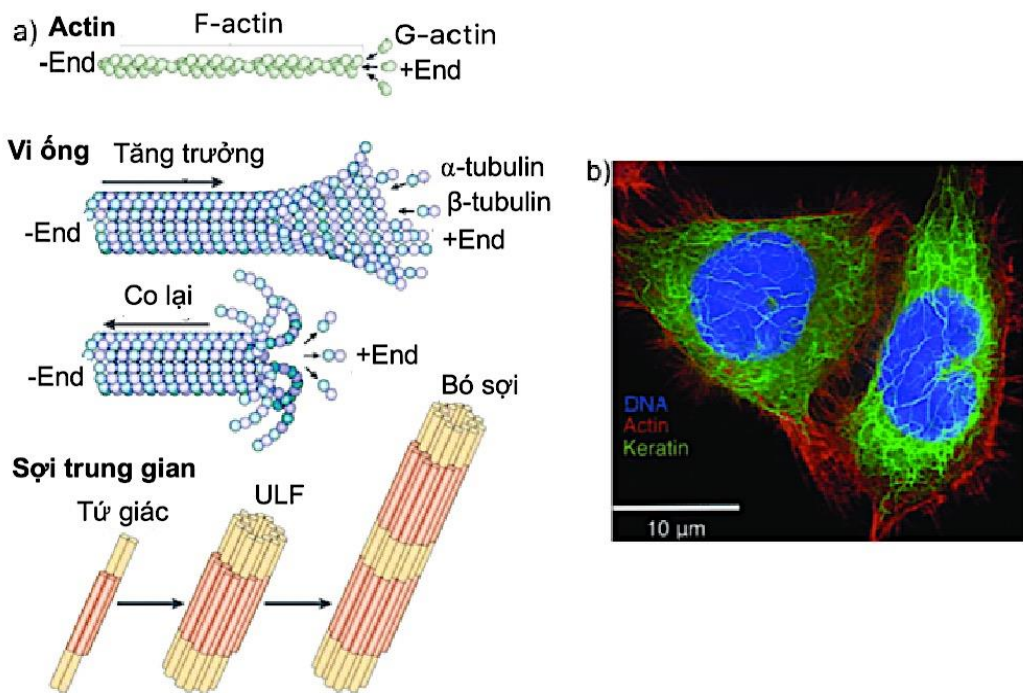
hình thành vi sợi; protein chụp đầu (capping protein), kết thúc sự phát triển của vi sợi; polymerase, thúc đẩy tăng trưởng vi sợi nhanh hơn hoặc lâu hơn; các yếu tố khử trùng hợp và các yếu tố phân cắt, dùng để tháo rời vi sợi; liên kết chéo và protein ổn định, có nhiệm vụ tổ chức và củng cố các cấu trúc mạng bậc cao. Các lực cơ học từ bên trong hay bên ngoài tế bào có thể ảnh hưởng đến hoạt động của các yếu tố điều hòa này và sau đó là tổ chức các vi sợi trong mạng lưới. Sự khác biệt quan trọng nhất giữa ba loại polymer khung xương tế bào, phân biệt cấu trúc và chức năng của các mạng tạo thành, đó là độ cứng cơ học, động lực lắp ráp, độ phân cực, và loại động cơ phân tử mà chúng liên kết [75].

**Vi ống (microtubules)** là các cấu trúc dài, hình trụ đường kính ngoài khoảng 25 nm và đường kính trong 15 nm. Chúng được trùng hợp bởi 2 protein hình cầu là dimer của  $\alpha$ -Tubulin và  $\beta$ -Tubulin tạo thành protofilaments. Cuối cùng các protofilaments tạo thành một ống bởi sự liên kết của 13 protofilaments. Các vi ống có liên quan đến sự vận chuyển nội bào, vận động và hình dạng tế bào [76].

**Sợi trung gian (intermediate filaments)** có đường kính khoảng 10nm, là loại sợi cứng nhất và bền nhất trong 3 loại khung xương tế bào. Chúng không liên quan trực tiếp đến sự di chuyển của tế bào nhưng đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp sức mạnh cơ học cho các tế bào và mô. Các sợi trung gian bao gồm nhiều loại protein, có hơn 50 protein sợi trung gian khác nhau đã được xác định và phân loại thành bốn nhóm khác nhau: (1) Sợi keratin trong các tế bào biểu mô (epithelial cells); (2) Vimentin và các sợi liên quan đến vimentin trong các tế bào mô liên kết, tế bào cơ (desmin) và tế bào thần kinh đệm (glial cells); (3) Neurofilament trong các tế bào thần kinh; (4) Lamina hạt nhân, hiện diện xung quanh nhân tế bào, lớp này sẽ phân tách và hình thành lại ở mỗi lần phân chia tế bào [76].

**Vi sợi (microfilaments) hay sợi actin** là những sợi mỏng nhất của khung xương tế bào, vi sợi có mặt ở hầu hết các tế bào cơ thể động vật có vú. Monomer của actin là protein hình cầu gọi là G-Actin có khối lượng phân tử 41800 Dal. G-Actin có thể trùng hợp một cách vô điều kiện tạo các actin hình sợi gọi là F-Actin. Các sợi actin gồm 2 chuỗi phân tử hình cầu được xoắn thành chuỗi xoắn với khoảng cách lặp lại khoảng 36 nm. Sợi Actin không đối xứng nhau với đầu cộng (đầu tăng trưởng) và một đầu trừ. Mỗi sợi Actin có đường kính 3,5 nm do đó F-Actin có đường kính khoảng 7 nm. Vi sợi Actin tham gia vào nhiều hoạt động quan trọng trong tế bào như co cơ, vận động tế bào, phân chia nhân và tế bào chất trong nguyên phân, vận chuyển nội bào và các bào quan, tham gia vào con đường truyền tín hiệu và thiết lập duy trì hình dạng và chức năng tế bào. Một trong số các quá trình này được trung gian bởi sự tương tác mật thiết giữa actin với màng tế bào [76].

Tóm lại, bộ khung xương tế bào đóng vai trò rất quan trọng trong kết dính tế bào, quy định hình dạng tế bào, và di chuyển của tế bào cũng như các chức năng khác như tổ chức phân bố bào quan trong tế bào, vận chuyển nội bào và phân chia tế bào [77]. Khung xương tế bào là mạng lưới các vi sợi và vi ống kéo dài khắp tế bào. Khung xương tế bào hỗ trợ tế bào, tạo cho nó hình dạng, tổ chức và sắp xếp các bào quan và có vai trò trong vận chuyển phân tử, phân chia tế bào và tín hiệu tế bào [78]. Hơn nữa, một số báo cáo cũng cho thấy rằng, các protein của khung xương tế bào trực tiếp hoặc gián tiếp tham gia vào con đường truyền tín hiệu liên quan đến sự tăng trưởng tế bào, chuyển hóa vật chất, chuyển đổi tín hiệu và apoptosis [78].



**Hình 1.16.** a) Ba thành phần chính của bộ xương tế bào. b) tế bào được nhuộm huỳnh quang (sợi actin: đỏ, DNA: xanh dương và Keratin: xanh lá) [79]

### 1.5.3. Các tác động của vi trọng lực lên cấu trúc khung xương tế bào

Khi vi ống và các protein khác của khung xương tế bào có các hoạt động bất có thể gây ảnh hưởng bất lợi đến sự tồn tại cũng như các biểu hiện đặc điểm sống của mỗi tế bào. Bộ khung xương tế bào giúp hình thành cấu trúc, hình dáng của chính tế bào đó và bao gồm sự tương tác chặt chẽ giữa các cấu trúc của vi sợi, vi ống, sợi trung gian và cả với các protein ngoại vi [80]. Do đó, khi khung xương tế bào không bình thường sẽ ảnh hưởng rất lớn đến hình dạng tế bào [81].

Hình dạng tế bào và khung xương tế bào thay đổi trong điều kiện vi trọng lực. Hoạt động của nhân và tế bào là những quá trình diễn ra phụ thuộc vào các vi ống. Vi ống tạo thành một phần của tâm động, liên quan đến sự hình thành thoi vô sắc và co thắt màng tế bào trong quá trình phân chia tế bào [82]. Hơn nữa, các vi

ống dường như có vai trò di chuyển các cơ quan tế bào như ty thể, vận chuyển các túi nội bào và các thành phần tế bào khác bên trong tế bào [83].

Tất cả các thành phần khung xương tế bào bao gồm các vi ống (MT), vi sợi trung gian (IF) và vi sợi (MF), trở nên vô tổ chức. Khung xương tế bào được tổ chức lại sau một thời gian trong điều kiện vi trọng lực từ 20 đến 72 giờ, nhưng không phải lúc nào cũng có cùng cấu hình giống như trước đây [84]. Trong tế bào ung thư vú, mạng lưới khung keratin quanh nhân (perinuclear cytotokeratin network) và cấu trúc nhiễm sắc thể trở nên lỏng lẻo hơn dưới điều kiện vi trọng lực [85]. Năm 1999, một thí nghiệm trên tế bào thận người trong môi trường vi trọng lực được thực hiện để theo dõi biểu hiện gene. Người ta phát hiện ra rằng hơn 1.632 gene đã thay đổi biểu hiện bao gồm những thay đổi lớn trong các yếu tố phiên mã [86].

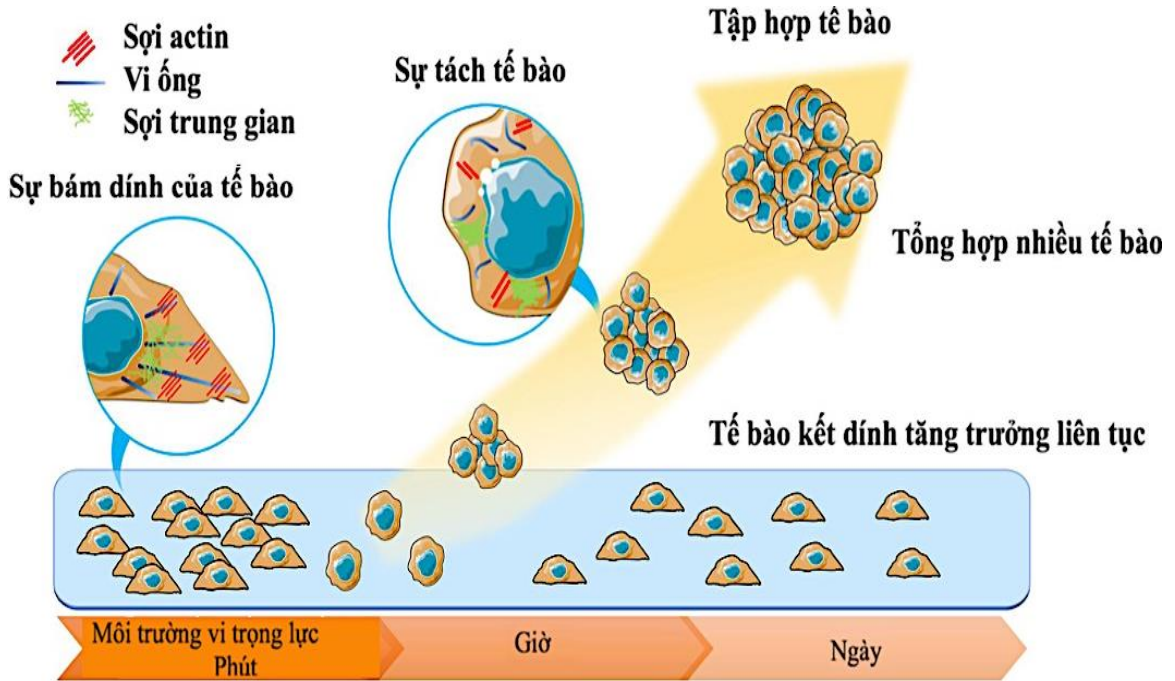
Một số nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện clinostat cũng đã thấy sự ảnh hưởng trên tế bào người như thay đổi cấu trúc khung xương, dẫn đến sự chết của tế bào ở tế bào nguyên bào xương ROS 17/2.8; Giảm sự di cư định hướng, giảm F-actin và thay đổi cấu trúc khung xương tế bào ở tế bào tiền thân tạo máu từ tủy xương BM CD344 sau 14 ngày nuôi cấy; Tổ chức vi ống bị rối loạn, tăng gấp đôi sự chết theo chu trình (apoptosis) trong tế bào T (T lymphocyte) sau 2 giờ nuôi cấy...[83].

Một số thí nghiệm dựa trên ảnh hưởng của vi trọng lực lên các vi ống cho thấy sự khác biệt đáng chú ý trong tổ chức trọng lực thực 1 g của Trái Đất và vi trọng lực. Trong môi trường vi trọng lực *in vitro*, các vi ống có thể phát triển và tổ chức trong một mô hình đồng nhất hoặc ngẫu nhiên. Trong khi đó, trong điều kiện trọng lực thực, chúng phát triển và tự tổ chức theo dạng sọc [87].

Những thay đổi về hình thái và sinh lý của các tế bào phát triển kết dính sau khi tiếp xúc với vi trọng lực. Các thành phần bộ xương tế bào của actin, vi ống và sợi trung gian được hiển thị trong các vòng tròn trong. Trong tế bào kết dính, các vi ống hình thành sự sắp xếp bức xạ gần nhân. Sợi actin neo vào màng tế bào. Sợi trung gian tạo thành mạng lưới lỏng lẻo xung quanh hạt nhân. Trong số các tế bào chịu ảnh hưởng của vi trọng lực, các vi ống ngắn lại và cong. Ít sợi actin hơn nhưng quan sát thấy nhiều sợi trung gian ngưng tụ hơn như hình 1.17 khi nuôi cấy tế bào tuyến giáp trong môi trường mô phỏng vi trọng lực [88].

Vi ống thường phát triển (polymer hóa) thành các polymer hình ống dài bao gồm các nhị phân alpha và beta-tubulin gắn với nhau theo một hướng cụ thể. Quá trình tổng hợp tạo ra vi ống bị ảnh hưởng bởi lực hấp dẫn bởi vì chúng có xu hướng trôi theo hướng thẳng đứng hơn là ở hướng bên [89].

Vi sợi liên kết với mạng lưới vi tế bào trong cơ thể để tạo thành một cấu trúc vững bền [89]. Theo nhiều nghiên cứu, cũng như vi ống, vi sợi có thể thay đổi trong môi trường vi trọng lực [90]. Vi ống có khả năng co cứng để chống lại sự đứt gãy do gắn kết với vi sợi trung gian trong cơ thể [91]. Vi sợi trung gian cũng có thể bị ảnh hưởng tương tự vi ống do sự thay đổi trọng lực.

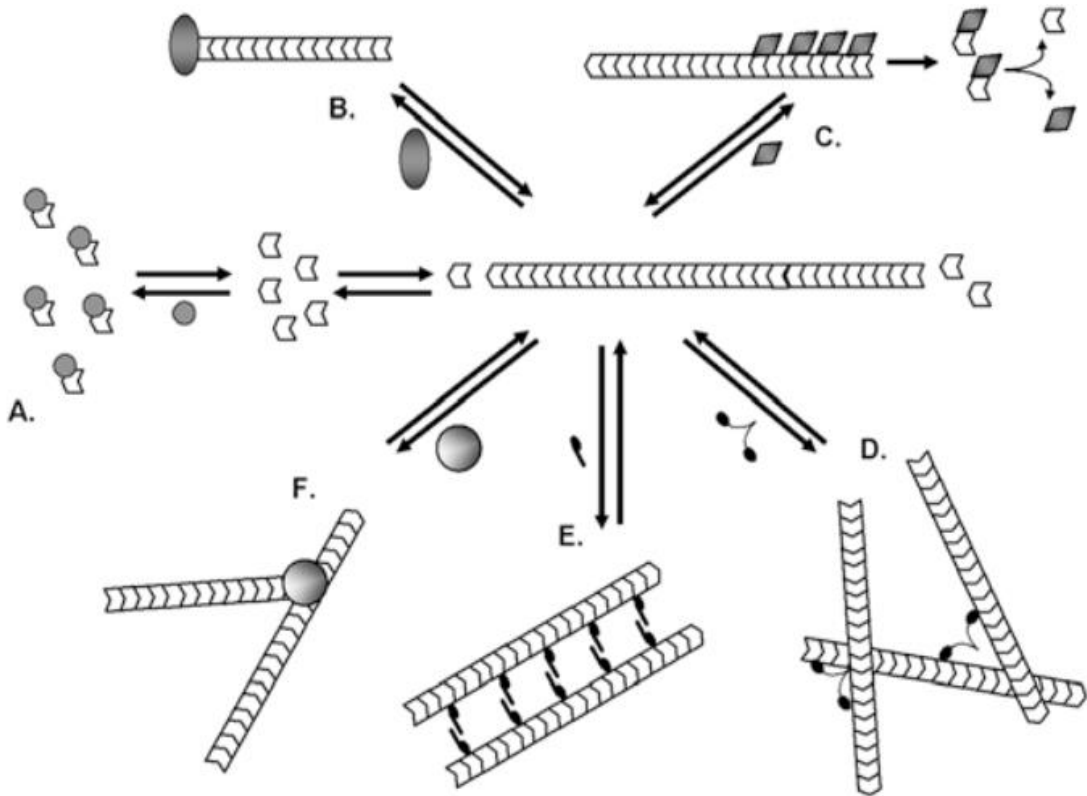


**Hình 1.17.** Sự thay đổi của tổ chức khung xương tế bào khi nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực [88]

Trong các nghiên cứu về vi trọng lực cho thấy phần lớn các tế bào có xu hướng tròn lại trong điều kiện vi trọng lực. Hơn nữa, việc làm tròn tế bào phần lớn được xác định bởi hệ thống vi sợi actin. Nghiên cứu cho thấy, các tín hiệu cascade dễ thay đổi trong điều kiện vi trọng lực, sự truyền tín hiệu qua trung gian PKC (Protein kinase C) được chứng minh là có liên quan đến actin. Đó là lý do tại sao khung xương actin có thể là thành phần trong tế bào rất nhạy cảm với vi trọng lực. Vi trọng lực có thể tác động đến hành vi của actin một cách trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua các protein liên kết với actin. Đến lượt mình actin có thể tác động đến dòng tín hiệu qua trung gian PKC [92].

Nhiều protein tương tác với actin và xác định hành vi của actin. Các protein này được mô tả dựa trên chức năng của chúng bao gồm các protein liên kết chéo như  $\alpha$ -actinin và filamin, protein cắt như nhân tố khử sợi actin (Actin-depolymerization factor ADF) và cofilin, protein gắn mũ như gelsolin, protein liên kết monomer như profilin và protein liên kết màng như thụ thể EGF. Các protein liên kết Actin này cùng nhau điều chỉnh động lực học khung xương actin trong tế bào (Hình 1.18). Vì vậy, các protein liên kết với actin và actin tạo thành một mạng

lưới phức tạp và rất quan trọng đối với nhiều quá trình trong tế bào như tăng sinh, apoptosis, vận động [92].

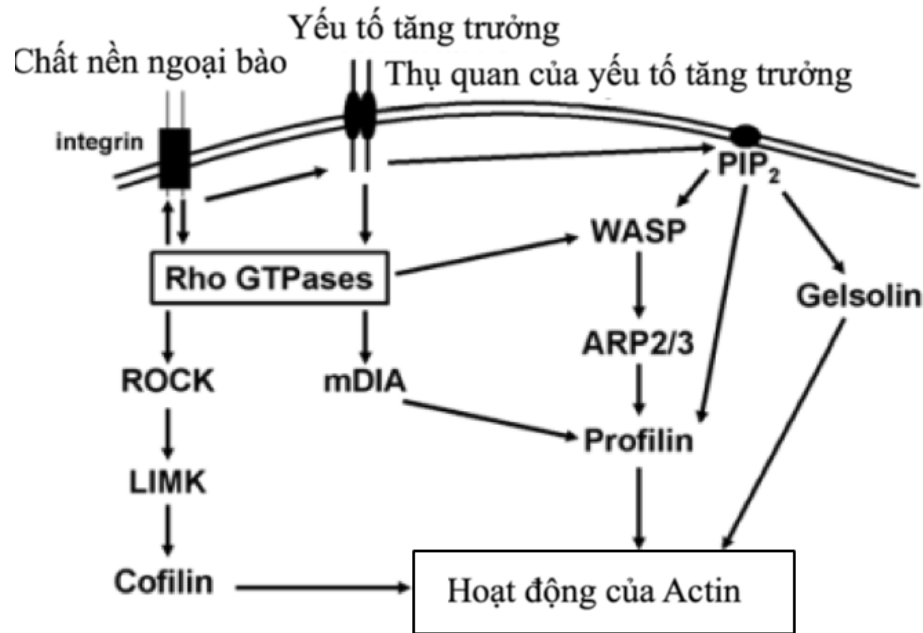


**Hình 1.18.** Các protein liên kết với actin ảnh hưởng đến hoạt động của Actin theo nhiều cách khác nhau [92].

*A: Protein liên kết với monomer giữ cho số lượng tiểu đơn vị actin ở trạng thái polymer hóa thấp, để ngăn chặn sự hình thành các sợi F-Actin; B: Khi một sợi Actin được hình thành, nó có thể được giới hạn bởi một protein khác để ngăn chặn kéo dài sợi tạo thành sợi ngắn có gắn mũ; C: Gia tăng protein phân cắt quá trình khử polymer hóa sợi Actin; D: Các protein liên kết ngang có thể tổ chức các sợi actin thành mạng lưới giống như gel hoặc bó sợi như hình E; F: Protein phân nhánh khởi đầu sự tăng trưởng của sợi mới dẫn đến việc phân nhánh mạng lưới Actin.*

Các protein liên kết với actin cũng được điều hòa theo nhiều cách khác nhau (hình 1.19). Các tăng tín hiệu khác nhau có nguồn gốc từ cả hai integrins và các thụ thể của yếu tố tăng trưởng đều kích thích hoặc kìm hãm protein liên kết với actin dẫn đến việc tu sửa lại các khung xương actin. Integrin liên kết khung xương actin với chất nền ngoại bào và bằng cách đó đóng một vai trò trong việc gắn tế bào. Các thụ thể của nhân tố tăng trưởng cảm nhận môi trường tế bào bằng cách liên kết với nhân tố tăng trưởng từ bên ngoài. Cả integrins và các thụ thể của nhân tố tăng trưởng đều chuyển đổi tín hiệu ngoại bào này qua màng vào tế bào. Các tế bào phản

ứng bằng cách định hình lại khung xương của nó và cuối cùng làm thay đổi biểu hiện gene [93].



**Hình 1.19.** Tổng quan về tương tác chuyển đổi tín hiệu và tu sửa actin [93]

Nghiên cứu hình ảnh trên các tế bào bám dính cho thấy rằng sự phân bố vi sợi bị thay đổi do gia tăng hoặc giảm trọng lực. Những thí nghiệm trên các trạm không gian ISS và vi trọng lực mô phỏng cho thấy mật độ vi sợi F – actin trong tế bào chất giảm mạnh và gia tăng mạng lưới vi sợi trong các tế bào [94]. Chứng tỏ hệ thống khung xương tế bào rất nhạy cảm với vi trọng lực, có thể tác động đến nhiều quá trình khác như sự tăng sinh, tăng trưởng tế bào, apoptosis...

Hình dạng tế bào và bộ xương tế bào bị thay đổi trong điều kiện vi trọng lực, karyokinesis và cytokinesis là các quá trình tế bào phụ thuộc vào vi ống. Các vi ống tạo thành một phần của tâm động và tham gia vào quá trình hình thành trục chính và màng tế bào co thắt trong quá trình phân chia tế bào [95]. Hơn nữa, các vi ống dường như có một cố vai trò vận động các bào quan của tế bào như ti thể, vận chuyển túi nội bào và các thành phần tế bào khác bên trong tế bào [96].

Nhiều nghiên cứu cho thấy vi trọng lực có thể gây ra các rối loạn trong quá trình chuyển hóa các cơ quan và các loại tế bào khác nhau [97]. Đồng thời làm phát sinh những tác động tiêu cực đến cơ thể con người như loãng xương, thay đổi cấu trúc tim mạch và các cơ quan thần kinh [98]. Thay đổi cấu trúc và chức năng của các tế bào động vật có vú đã được nghiên cứu trên các hệ thống mô phỏng khác nhau như 2-D clinostat [99], 3-D clinostat [100] hoặc máy định vị ngẫu nhiên (RPM) [101]. Điều kiện vi trọng lực gây ra sự sắp xếp lại tế bào của các tế bào nội mô bằng cách sửa đổi biểu hiện gelsolin và  $\alpha$ -tubulin [102].

## Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Tế bào gan Chang (CCL-13) được cung cấp bởi công ty ACCT (American Type Culture Collection) và được nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực 3-D clinostat.

Đề tài được thực hiện tại Viện Sinh học Nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh từ 10/12/2020 đến 10/12/2023.

### 2.2. Vật liệu

#### 2.2.1. Thiết bị và dụng cụ

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	Nanovue	GE Healthcare	Mỹ
9	Máy chụp hình tế bào Cytell™	GE Healthcare	Mỹ
10	Hệ thống điện di Western blot	GE Healthcare	Mỹ
11	Flow cytometer	BD Bioscience	Mỹ
12	Tủ -80°C	Panasonic	Nhật
13	Tủ -30°C	Panasonic	Nhật
14	Bể ổn nhiệt	Memmert	Đức
15	Máy quang phổ GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader	Promega	Mỹ
16	Máy BD Accuri C6 flow cytometer	BD Biosciences	Mỹ

**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 ml)	Schott	Đức
2	Erlen (100 ml, 250 ml)	Schott	Đức
3	Ống ly tâm 15 ml	Corning	Hoa Kỳ

4	Micropipette (100-1000 $\mu$ l, 10-100 $\mu$ l, 5-50 $\mu$ l)	Nychiro	Nhật
5	Eppendorf (1500 và 2000 $\mu$ l)	Eppendorf	Đức
6	Đầu tip 20 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l	Eppendorf	Đức
7	Bình nuôi T25	Thermo Scientific	Mỹ
8	Đĩa 96 giếng	Thermo Scientific	Mỹ
9	Ống đông lạnh	Corning	Mỹ

### 2.2.2. Môi trường và hóa chất sử dụng

Môi trường và hóa chất được sử dụng trong đề tài được liệt kê ở Bảng 2.3.

**Bảng 2.3.** Môi trường, hóa chất sử dụng trong đề tài

STT	Tên dụng hóa chất	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
1	Kháng sinh (penicillin/ streptomycin)	Gibco BRL	Mỹ
2	DMEM/Ham's F-12 with L-Glutamine	Capricorn Scientific	Đức
3	Phalloidin CruzFluor™ 488 Conjugate	Santa Cruz Biotechnology	Mỹ
4	Fetal bovine serum (FBS)	Capricorn Scientific	Đức
5	Trypsin EDTA	Capricorn Scientific	Đức
6	Phosphate buffered saline (PBS)	Capricorn Scientific	Đức
7	Hoechst 33342	Sigma-Aldric	Đức
8	4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution	Nacalai Tesque	Nhật Bản
9	ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System	Promega	Mỹ
10	Cồn	Merk	Đức
11	FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences	Mỹ
12	PCRBIO 1-Step RT-PCR Kit	PCR Biosystems	Mỹ
13	Môi trường đông lạnh HyCryo-STEM	GE Healthcare Life Sciences	Mỹ
14	Human MSC analysis kit	BD Biosciences	Mỹ
15	WST-1	Roche	Thụy Sĩ



16	2x qPCR SyGreen 1-Step Go Hi-ROX kit	PCRBiosystem	Anh
17	Optiblot LDS Sample Buffer	Abcam	Mỹ
18	Precast Gel SDS-PAGE 4-12 %	Abcam	Mỹ
19	Optiblot SDS Run Buffer	Abcam	Mỹ
20	Màng PVDF	Abcam	Mỹ
21	Giấy lọc Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad	Mỹ
22	Blocking Buffer	Abcam	Mỹ
23	Kháng thể Western Blot	Abcam	Mỹ
24	ECL Western Blotting Substrate Kit	Abcam	Mỹ
25	AUTOMATIC X-RAY kit	Fujifilm	Nhật Bản
26	CL-XPosure Film	Thermo Scientific	Mỹ
27	Triton	Sigma-Aldrich	Mỹ
28	SiR-Tubulin Kit	Cytoskeleton	Mỹ

### 2.2.3. Tế bào gan Chang (CCL-13)

Tế bào gan Chang (CCL-13) được cung cấp bởi Công ty ATCC (American Type Culture Collection). Dòng này ban đầu được cho là có nguồn gốc từ mô gan bình thường, nhưng sau đó dựa trên phân tích isoenzyme, nhiễm sắc thể đánh dấu HeLa và dấu vân tay DNA, người ta phát hiện ra rằng nó có thể được thiết lập thông qua sự lây nhiễm tế bào HeLa.

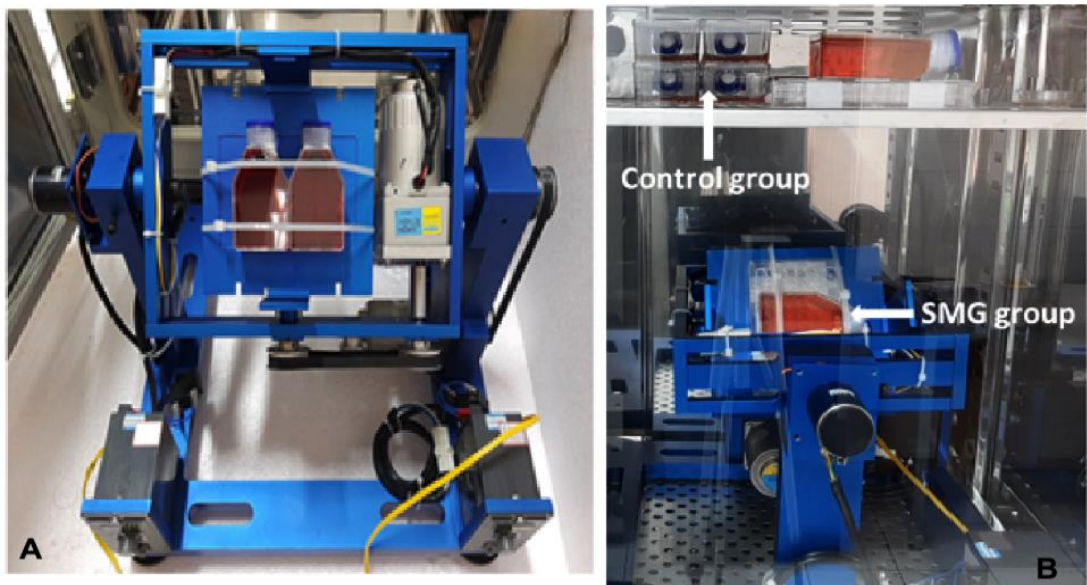
### 2.2.4. Hệ thống vi trọng lực mô phỏng (clinostat 3D)

Hệ thống máy 3-D clinostat sử dụng trong nghiên cứu để tạo môi trường vi trọng lực mô phỏng đã được thiết kế và chế tạo trong đề tài: “Nghiên cứu đánh giá sự thay đổi trong cấu trúc bộ khung tế bào cơ thể sống trong điều kiện mô phỏng trạng thái vi trọng lực (simulated microgravity)”. Đề tài này thuộc “Chương trình Khoa học công nghệ vũ trụ” với mã số là: VT-CB.15/18-20 (Hình 2.1).

Hệ thống 3-D clinostat có các khung được làm bằng hợp kim nhôm và được anode hóa. Cấu trúc máy bao gồm khung bên ngoài và khung bên trong có thể xoay độc lập. Hai động cơ được sử dụng để điều khiển hai khung. Tốc độ của hai động cơ được điều khiển bởi bộ điều khiển tốc độ. Vòng tiếp điện được sử dụng để cho phép kết nối tín hiệu giữa bộ điều khiển tốc độ 2 và động cơ 2 bên trong (Hình 2.1).

Trong nghiên cứu này, hệ thống 3-D clinostat tạo ra một môi trường tương tự như môi trường bên ngoài không gian với gia tốc trọng trường  $1,3 \times 10^{-3}$  g bằng cách quay hai khung trong vào ngoài với vận tốc 1 vòng/phút. Điều này dẫn đến sự phân tán đồng đều của vector trọng lực trong một thể tích hình cầu với vận tốc góc không đổi. Các điều kiện này đã tạo ra một môi trường vi trọng lực với gia tốc  $1,3 \times$

$10^{-3}$  g và nó được định nghĩa là môi trường vi trọng lực mô phỏng. Máy 3-D clinostat có thể được đặt trong tủ nuôi tế bào động vật có dung tích từ 160 lít trở lên.



**Hình 2.1.** Cấu trúc máy 3-D clinostat

A: Mẫu tế bào lắp đặt trên hệ thống 3-D clinostat; B: Hệ thống 3-D clinostat trong tủ nuôi tế bào động vật (Viện Sinh học nhiệt đới, Mã đề tài: VT-CB.15/18-20)

### 2.3. Nội dung nghiên cứu

Đề tài tập trung vào việc đánh giá sự cảm ứng của tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat) với các nội dung sau.

#### 2.3.1. Nội dung nghiên cứu 1

Đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào gan Chang (CCL-13) trong hệ thống vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat).

**Mục đích:** Xác định được sự thay đổi trong quá trình tăng trưởng và phát triển của tế bào được nuôi cấy trong 2 điều kiện khác nhau (SMG và đối chứng).

**Chỉ tiêu đánh giá:**

- Sự thay đổi mật độ tế bào CCL-13 trong điều kiện vi trọng lực;
- Ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực lên chu kỳ tế bào CCL-13.

#### 2.3.2. Nội dung nghiên cứu 2

Đánh giá sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào gan Chang (CCL-13) trong hệ thống vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat).

**Mục đích:** Xác định được quá trình chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào gan Chang (CCL-13) trong hệ thống 3-D clinostat.

**Chỉ tiêu đánh giá:**

- Sự thay đổi hình thái nhân và tế bào chất;
- Tỷ lệ tế bào apoptosis;

- Sự thay đổi biểu hiện các gene họ BCL2 (Bax, Bcl-2).

### 2.3.3. Nội dung nghiên cứu 3

Đánh giá sự thay đổi cấu trúc khung xương tế bào gan Chang (CCL-13) trong hệ thống vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat).

**Mục đích:** Đánh giá được sự thay đổi biểu hiện các gene mã hóa cho protein cấu tạo bộ xương tế bào và sự thay đổi cấu trúc thành phần của khung xương tế bào gan Chang (CCL-13) khi phân bào trong hệ thống 3-D clinostat.

#### **Chỉ tiêu đánh giá:**

- Thay đổi ở mức phiên mã và dịch mã của các gene mã hóa cho protein hình thành cấu trúc bộ khung xương tế bào CCL-13:

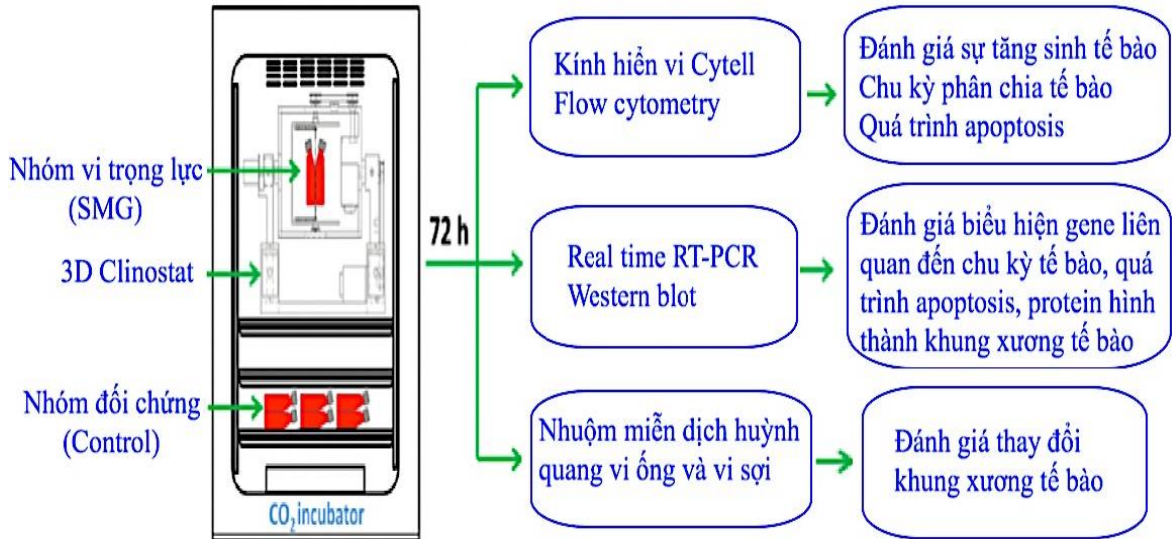
- + Sự thay đổi biểu hiện gene cấu trúc vi ống (microtubule).
- + Sự thay đổi biểu hiện gene cấu trúc vi sợi (microfilament).

- Thay đổi cấu trúc thành phần của khung xương tế bào CCL-13 khi phân bào:

- + Sự thay đổi hình thái cấu trúc vi ống (microtubule).
- + Sự thay đổi hình thái cấu trúc vi sợi (microfilament).

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

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



**Hình 2.2.** Sơ đồ nghiên cứu chung

#### 2.4.1. Nuôi cấy tế bào và thử nghiệm vi trọng lực mô phỏng

Tế bào gan Chang (CCL-13) được nuôi cấy với 2 loại dụng cụ là đĩa 96 giếng và bình flask T-25 nhằm phù hợp với các phương pháp nghiên cứu khác nhau như sau:

- Tế bào CCL-13 được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng (161093, Thermo Scientific, Hoa Kỳ) với mật độ  $2 \times 10^3$  tế bào / giếng. Mỗi giếng được lấp đầy với 395  $\mu$ l môi trường nuôi cấy DMEM/Ham's F-12 with L-Glutamine được bổ sung

15% FBS (FBS-HI-22B, Capricorn Scientific, Đức) và 1% Pen/ Strep (15140-122, Gibco, Mỹ). Băng parafilm đã được sử dụng để che các giếng. Kết quả nuôi cấy này được sử dụng đối với các phương pháp sử dụng kính hiển vi Cytell để đánh giá.

- Tế bào CCL-13 được nuôi trong flask T-25 (160430, Thermo Scientific, Mỹ) với mật độ  $1 \times 10^5$  tế bào/flask ở  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Môi trường sử dụng để nuôi tế bào là DMEM/Ham's F-12 with L-Glutamine bổ sung 15% FBS và 1% Pen/Strep. Flask chứa tế bào được đổ đầy môi trường nuôi cấy. Sau 72 giờ, các flask Tế bào CCL-13 được hút bỏ môi trường và rửa 3 lần với 5 ml PBS 1X (PBS-10XA, Capricorn Scientific, Đức) cho mỗi lần. Mỗi flask tế bào được ủ với 1 ml dung dịch Trypsin 0.25% (TRY-2B, Capricorn Scientific, Đức) trong 5 phút ở  $37^\circ\text{C}$ . Sau đó, 1 ml môi trường được cho thêm vào flask tế bào để bất hoạt Trypsin. Tế bào được thu hoạch và ly tâm với tốc độ 1.500 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ thường để thu tủa tế bào. Kết quả nuôi cấy tế bào này được sử dụng đối với hệ thống Flow cytometry, phân tích Real time – PCR và phân tích Western blot. Mốc 72 giờ nuôi cấy tế bào được chọn để thực hiện trong nghiên cứu. Theo nghiên cứu của giáo sư Theodore và cộng sự tại NASA, thời gian xảy ra những biến đổi về mặt sinh lý cơ thể diễn ra mạnh nhất từ ngày thứ nhất đến ngày thứ 3 khi phi hành gia đi vào trong không gian và chịu tác động của điều kiện vi trọng lực. Do đó, nghiên cứu này chọn mốc thời gian 72 giờ nhằm khảo sát những tác động của vi trọng lực lên một số đặc điểm sinh lý tế bào như sự tăng sinh, sức sống và cấu trúc.

Đồng thời các nội dung nghiên cứu được khảo sát, đánh giá và so sánh trên 2 nhóm tế bào CCL-13 nuôi cấy trong hai điều kiện môi trường về trọng lực khác nhau:

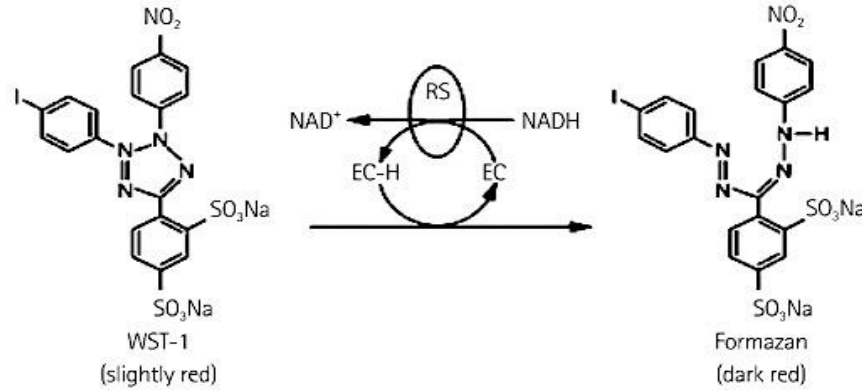
- Nhóm vi trọng lực mô phỏng (SMG): nhóm tế bào được nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực (hệ thống máy 3-D clinostat và quay ở chế độ  $10^{-3}$  g, được đặt trong tủ ấm  $\text{CO}_2$ , vận tốc góc của khung ngoài và khung trong là 1 vòng/phút. Vận tốc góc nhỏ hơn  $5,5^\circ/\text{s}$  và điều kiện cơ học bên trong bình quay có thể gần đúng với trạng thái gần như tĩnh [103].

- Nhóm điều kiện trọng lực 1 g (đối chứng: control): nhóm đối chứng, tế bào được nuôi ở điều kiện trọng lực bình thường (1g) trong cùng một tủ ấm  $\text{CO}_2$ .

Thử nghiệm vi trọng lực được tiến hành trong vòng 72 giờ (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 [30].

#### **2.4.2. Thử nghiệm WST-1**

Nguyên tắc của thử nghiệm WST1: Xét nghiệm này dựa trên sự phân cắt muối tetrazolium hơi đỏ WST-1 để tạo thành thuốc nhuộm formazan màu đỏ sẫm bởi các tế bào hoạt động trao đổi chất (Hình 2.3). Do đó, quá trình chuyển đổi này chỉ xảy ra ở các tế bào sống. Thuốc nhuộm formazan được tạo thành hòa tan trong dung dịch nước và được định lượng trực tiếp bằng máy quang phổ kế.



Hình 2.3: Phân cắt muối tetrazolium WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) thành formazan. EC = thuốc thử ghép electron; RS = hệ thống succinate-tetrazolium-reductase ty thể.

Thử nghiệm WST-1 được dùng để đánh giá mức độ tăng sinh của tế bào gan Chang (CCL-13) khi nuôi cấy trong môi trường vi trọng lực. Phương pháp dựa trên phản ứng đổi màu của muối tetrazolium trong dung dịch WST-1 với các enzyme dehydrogenase trong ti thể. Khi tế bào tăng sinh mạnh, mức độ hô hấp càng nhiều dẫn đến lượng enzyme tiết ra môi trường càng lớn, môi trường nuôi chứa WST-1 sẽ chuyển màu càng đậm. Sau thử nghiệm vi trọng lực, các giếng nuôi tế bào được rút bỏ môi trường và rửa với 200  $\mu$ l PBS 1X mỗi giếng (PBS-10XA, Capricorn Scientific, Đức). 100  $\mu$ l môi trường nuôi cấy và 10  $\mu$ l dung dịch WST-1 (11644807001, Roche, Thụy Sĩ) được cho vào mỗi giếng nuôi của mỗi nhóm và ủ trong 3,5 giờ ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Lắc 1 phút trên máy lắc. Đo giá trị OD ở bước sóng 450 nm bằng máy quang phổ GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader (Promega, Mỹ) [30].

#### 2.4.3. Phân tích bằng kính hiển vi Cytell

Hệ thống kính hiển vi Cytell (GE Healthcare, Hoa Kỳ) là 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. Hệ thống tạo cơ hội cho phòng thí nghiệm thu giữ, phân tích các hình ảnh tế bào, cấu trúc bên trong tế bào, đánh giá khả năng sống, số lượng tế bào và chu kỳ tế bào một cách dễ dàng.

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

- **Đánh giá mật độ tế bào CCL-13:** Sau 72 giờ, môi trường nuôi cấy được lấy ra. Các hạt nhân được nhuộm bằng Hoechst 33342 (14533, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) trong 15 phút. Tế bào được rửa ba lần bằng nước muối đệm phosphat (Gibco, Đức). Số lượng tế bào CCL-13 đã được đếm bằng Ứng dụng Chu kỳ tế bào của Kính hiển vi Cytell.

- **Đánh giá hình thái, diện tích và cường độ nhân của tế bào CCL-13:**

Trước tiên tế bào được rửa 3 lần bằng dung dịch PBS, mỗi lần 5 phút. Sau đó tế bào được cố định trong 4% paraformaldehyde trong 30 phút. Tế bào được rửa 3 lần bằng dung dịch PBS, mỗi lần 5 phút. Tế bào được xử lý với Triton X-100 0,1% (thể tích/thể tích) qua đêm ở 4°C. Tế bào được rửa 3 lần bằng dung dịch PBS, mỗi lần 5 phút. Nhân được nhuộm bằng Hoechst 33342 (14533, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) trong 15 phút. Tế bào được rửa ba lần bằng nước muối đệm phosphat (Gibco, Đức), mỗi lần 10 phút. Ứng dụng Cell Cycle của kính hiển vi Cytell để đánh giá diện tích hạt nhân, cường độ hạt nhân và hình dạng hạt nhân [104].

Sau khi nhuộm nhân, đặc điểm hình thái nhân và tế bào chất sẽ được xác định bằng phần mềm của hệ thống kính hiển vi huỳnh quang Cytell. Đặc điểm hình thái nhân như: diện tích nhân, cường độ biểu hiện, giá trị hình dạng nhân (nuclear shape value) được đánh giá bằng ứng dụng Cell Cycle App. Còn diện tích tế bào được đánh giá bằng Phần mềm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Mỹ). Ảnh chụp tế bào được chuyển đổi sang dạng 8-bit và thiết lập các thông số theo một ngưỡng chung để loại bỏ độ sáng nền trước khi tính toán [104].

- **Xác định sự thay đổi về cấu trúc, khả năng hoạt động của vi sợi và vi ống:**

Vi ống và vi sợi được nhuộm bằng phương pháp hoá tế bào miễn dịch (ICC). Tế bào gan Chang (CCL-13) được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với mật độ  $2 \times 10^3$  tế bào/giếng. Môi trường nuôi cấy được thêm vào 395  $\mu$ l/giếng. Vi ống được nhuộm bằng 2  $\mu$ l SiR-Tubulin (CY-SC002, Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA) với nồng độ 50 nM cho mỗi giếng. Phủ parafilm lên các giếng. Đối với nhuộm vi sợi actin, phủ parafilm lên các giếng, tế bào CCL-13 được cố định bằng paraformaldehyde 4% (Nacalai, Nhật Bản) trong 30 phút, sau đó được ngâm với Triton X-100 0,1% (Merck, Đức) qua đêm ở 4°C. Phalloidin CruzFluor™ 488 Conjugate (sc-363791, Santa Cruz Biotechnology, United States) được sử dụng để nhuộm sợi actin trong 1 giờ. Cấu trúc của các bó vi ống và vi sợi được đánh giá dưới kính hiển vi Cytell.

#### **2.4.4. Phương pháp flow cytometry**

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  $\mu\text{m}$ ) 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. Flow cytometry được ứng dụng trong đếm và phân loại tế bào, xác định đặc điểm và chức năng của tế bào, đo kích thước bộ gene, nhận diện chỉ thị sinh học và kỹ thuật protein, ứng dụng trong chẩn đoán các loại bệnh lý khác nhau như ung thư, bất thường về biến đổi gene.

Hệ thống máy BD Accuri C6 flow cytometer được sử dụng để phân tích những thay đổi của tế bào Gan Chang (CCL-13) khi nuôi trong môi trường mô phỏng vi trọng lực mô phỏng sau:

##### **- Đánh giá chu kỳ tế bào bằng hệ thống Flow cytometry**

Tế bào CCL-13 sau khi thu hoạch được xử lý với FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Mỹ) để kết hợp đánh giá tỉ lệ apoptosis và chu kỳ tế bào. Eppendorf chứa tế bào được ủ với dung dịch chứa 100 ml Binding Buffer 1X, 5  $\mu\text{l}$  PI và 5  $\mu\text{l}$  FITC trong 25 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Sau đó, mẫu tế bào được bổ sung thêm 400  $\mu\text{l}$  Binding Buffer 1X và được phân tích bởi hệ thống máy BD Accuri C6 flow cytometer.

**- Hình thái nhân tế bào CCL-13:** Các thay đổi về mặt hình thái nhân của tế bào CCL-13 trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng cũng được đánh giá thông qua kết quả đo chỉ số FSC (Forward Scatter) bằng phương pháp flow cytometry. Chỉ số này cho phép đo lường tia laser đi qua tế bào, từ đó có thể tính toán được kích thước tương đối của tế bào so với nhóm đối chứng.

**- Đánh giá tỉ lệ apoptosis của tế bào:** Tế bào được thu và ủ trong Binding Buffer có chứa Annexin-V-FITC và PI ở nhiệt độ phòng trong bóng tối 30 phút. Sau khi ly tâm loại dịch nổi, PBS sẽ được bổ sung vào tube chứa tế bào trước khi cho chạy qua hệ thống flow cytometry BD Accuri TM C6 Flow Cytometer. Những tế bào đang trong quá trình apoptosis sẽ được thể hiện bằng tỉ lệ các tế bào dương tính với Annexin-V-FITC và các tế bào dương tính với PI [30].

#### **2.4.5. Tách chiết RNA tổng**

Tế bào CCL-13 được tách bằng trypsin-EDTA (Ethylene diamine tetraacetic Acid) 0,25% và chuyển vào eppendorf 1,5 ml. Tế bào được ly giải bằng 250  $\mu\text{l}$  dung dịch ly giải RLT và được vortex trong 30 giây. 350  $\mu\text{l}$  Ethanol 70% được cho vào

ependorf chứa mẫu và dung dịch được huyền phù hoá. Toàn bộ 700 µl mẫu trên được chuyển vào cột RNeasy và đặt cột vào eppendorf 2 ml. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút 30 giây ở 4°C. Dịch ly tâm được loại bỏ và 700 µl dung dịch RW1 được cho vào cột RNeasy. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút ở 4°C. Dịch ly tâm được loại bỏ và 500 µl dung dịch RPE được cho vào cột RNeasy. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút 30 giây ở 4°C. Cột RNeasy được chuyển sang eppendorf mới. 50 µl nước không chứa RNase được chuyển vào cột RNeasy. Mẫu được ly tâm 11.000 vòng/phút, trong 1 phút 30 giây ở 4°C. Cột RNeasy được loại bỏ, thu mẫu RNA tổng được và bảo quản ở -80°C. RNA tổng được sử dụng trong phân tích sự biểu hiện ở mức phiên mã của các gene liên quan đến chu kỳ tế bào, quá trình apoptosis và các gene tham gia hình thành cấu tạo bộ khung xương của tế bào CCL-13.

#### **2.4.6. Phương pháp Real time PCR**

Phương pháp Real time qRT-PCR được sử dụng nhằm phân tích, đánh giá mức độ biểu hiện phiên mã của gene điều hoà chu kỳ tế bào, quá trình apoptosis và các gene điều hoà quá trình tổng hợp các protein (ví tổng tubulin, vi sợi actin) tham gia hình thành cấu trúc khung xương tế bào CCL-13. Phương pháp  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak) được sử dụng để định lượng tương đối sự biểu hiện của các gene. Sau đó chuẩn hóa giá trị  $C_t$  nhằm xác định sự biểu hiện của gene mục tiêu trong nhóm vi trọng lực và nhóm đối chứng.

Trong phương pháp  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  cả gene đích và gene tham chiếu đều được giả định mức khuếch đại có hiệu quả tương đương 100% và trong phạm vi 5% của mỗi gene. Để xác định sự khác biệt tương đối trong mức độ biểu hiện của gene đích ở các mẫu khác nhau, phương pháp  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  được thực hiện theo các bước sau:

+ Chuẩn hóa giá trị  $C_T$  của gene mục tiêu với gene tham khảo cho cả mẫu thí nghiệm và mẫu hiệu chỉnh:

$$\Delta C_{T(\text{mẫu})} = C_{T(\text{mục tiêu, mẫu})} - C_{T(\text{tham chiếu, mẫu})}$$

$$\Delta C_{T(\text{chuẩn})} = C_{T(\text{mục tiêu, chuẩn})} - C_{T(\text{tham chiếu, chuẩn})}$$

+ Chuẩn hóa giá trị  $\Delta C_T$  của mẫu thí nghiệm với  $\Delta C_T$  của mẫu chuẩn

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{mẫu})} - \Delta C_{T(\text{chuẩn})}$$

+ Cuối cùng, tỉ lệ biểu hiện được tính theo công thức

$$\text{Tỉ lệ biểu hiện} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Kết quả thu được là sự tăng (hay giảm) theo tỉ lệ của gene đích trong mẫu thí nghiệm tương quan với mẫu chuẩn và được chuẩn hóa theo sự biểu hiện của gene tham chiếu. Sự chuẩn hóa sự biểu hiện của các gene đích theo gene tham chiếu giúp loại những khác biệt về lượng tế bào mẫu [105].



Sự biểu hiện các gene ở mức phiên mã được định lượng bằng phương pháp Real time qRT-PCR với kit PCRBIIO 1-Step RT-PCR Kit (PCR Biosystems). Mỗi phản ứng PCR chứa 1 µl RNA mẫu, 2 µl môi, 10 µl Mix Ro-Lox và 1 µl RTase trong tổng thể tích 20 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng Real-time qRT-PCR: 1 chu kỳ ở 45°C (15 phút) nhằm huyền hóa RNA thành DNA, Tách mạch trong 95°C (2 phút); 40 chu kỳ ở 95°C (10 giây) và 62°C (15 giây), trừ mẫu ở 4°C (30 phút). Đường cong tan chảy được phân tích dựa trên bước tiến hành 60°C đến 95°C với mỗi bước đọc là 0,5°C (30 giây). Với các đánh giá sự điều hoà biểu hiện của các gene khác nhau trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng sẽ tương ứng với các trình tự môi khác nhau được sử dụng như sau:

- **Các gene điều hoà chu kỳ tế bào CCL-13:** Gồm các gene thuộc 2 nhóm CDK (2, 4, 6) và Cyclin (A, B1, D1), gene GAPDH được sử dụng làm gene tham chiếu [106]. Các cặp môi đặc trưng cho các gene khảo sát được thể hiện trong Bảng 2.4.

**Bảng 2.4.** Trình tự môi các gene liên quan đến chu kỳ tế bào

Gene	Trình tự môi	Tài liệu tham khảo
CDK4	F: 5'-ATGGACGTCTGTGCCACATC-3' R: 5'-GTGCCTTGTCAGATATGTCC-3'	[106]
CDK6	F: 5'-TCTTCATTCACACCGAGTAGTGC-3' R: 5'-TGAGGTTAGAGCCATCTGGAAA-3'	[107]
Cyclin A	F: 5'-GCCATTAGTTTACCTGGACCCAGA-3' R: 5'-CACTGACATGGAAGACAGGAACCT-3'	[108]
CDK2	F: 5'-CAGGAGTTACTTCTATGCCTGA-3' R: 5'-TTCATCCAGGGGAGGTACAAC-3'	[107]
Cyclin B1	F: 5'-AATGAAATTCAGGTTGTTGCAGGAG-3' R: 5'-CATGGCAGTGACACCAACCAG-3'	[107]
Cyclin D1	F: 5'-ATGTTTCGTGGCCTCTAAGATG A-3' R: 5'-CAGGTTCCACTTGAGCTTGTT C-3'	[106]
GAPDH	F: 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3' R: 5'-AGTCCTTTCACGATACCAAAGT-3'	[107]

- **Các gene liên quan đến quá trình apoptosis của tế bào CCL-13:** Các gene được đánh giá bao gồm *Bax* và *Bcl-2* và gene *GAPDH* được sử dụng để làm đối chứng. Các cặp môi đặc trưng cho các gene mục tiêu cần khảo sát được thể hiện trong Bảng 2.5.

**Bảng 2.5.** Trình tự môi các gene liên quan đến quá trình apoptosis

Gene	Trình tự mồi (5'–3')	Tài liệu tham khảo
GAPDH	F: 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3' R: 5'-AGTCCTTTCCACGATACCAAAGT-3'	[107]
Bcl-2	F: 5'-TCTTCATTCACACCGAGTAGTGC-3' R: 5'-TGAGGTTAGAGCCATCTGGAAA-3'	[109]
Bax	F: 5'-CCAGGAGTTACTTCTATGCCTGA-3' R: 5'-TTCATCCAGGGGAGGTACAAC-3'	[109]

- **Các gene mã hóa cho bộ khung xương tế bào:** Các gene được đánh giá bao gồm  $\alpha$ -Tubulin 3,  $\beta$ -Actin và gene GAPDH được sử dụng để làm gene tham chiếu, đối chứng với gene mục tiêu. Các cặp mồi đặc trưng cho các gene mục tiêu cần khảo sát được thể hiện trong Bảng 2.6.

**Bảng 2.6.** Trình tự mồi các gene mã hóa vi ống, vi sợi

Gene	Trình tự mồi (5'–3')	Tài liệu tham khảo
$\alpha$ -Tubulin 3	F: 5'-CATTGAAAAGTTGTGGTCTGATCA-3'	[110]
	R: 5'-GCTTGGGTCTGTAACAAAGCAT-3'	
$\beta$ -Actin	F 5'-GAGCACAGAGCCTCGCCTTT-3'	[110]
	R 5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3'	
GAPDH	F: 5'-TTAGCACCCCTGGCCAAGG-3'	[110]
	R: 5'-CTTACTCCTTGGAGGCCATG-3'	

#### 2.4.7. Phân tích Western blot

Kỹ thuật Western Blot là kỹ thuật lai phân tử, giữa protein mục tiêu (Kháng nguyên) với protein (Kháng thể). 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 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.

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật Western Blot được sử dụng để đánh giá mức độ biểu hiện protein của các gene 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; protein bax, bcl-2 điều hòa quá trình apoptosis; các protein  $\alpha$ -tubulin 3 và  $\beta$ -

actin tham gia cấu trúc bộ khung xương của tế bào CCL-13 được đánh giá bằng phương pháp Western Blot. Đồng thời sử dụng protein GAPDH làm đối chứng. Các bước thực hiện bao gồm: ly giải protein, điện di SDS-PAGE, chuyển màng PVDF, khóa màng, ủ kháng thể sơ cấp, ủ kháng thể thứ cấp, hiện phim.

Tế bào gan Chang (CCL-13) được thu thập từ bình T-25 và xử lý với LDS Sample Buffer 4X (ab119196, Abcam, Hoa Kỳ) ở 70°C trong 10 phút để thu nhận protein tổng số. Protein thu được từ các mẫu được chuyển với lượng bằng nhau vào các giếng của Precast Gel SDS-PAGE 4-12% (ab139596, Abcam, Hoa Kỳ) để phân tách các protein với hiệu điện thế không đổi 50V trong 2 giờ (ab119197, Abcam, United States). Protein được chuyển sang màng PVDF (ab133411, Abcam, Hoa Kỳ), được kẹp bởi một lớp giấy lọc Extra Thick Blot Paper (1703966, Bio-Rad, Mỹ) và một lớp bọt biển ở mỗi bên và đặt cố định vào cassette (Hình 2.3). Cassette này được đặt vào bể điện di chứa buffer TBST sao cho mặt gel nằm ở phía cực âm (cathode) và màng PVDF nằm phía cực dương (anode), và được điện di trong 2 giờ ở 50 V.

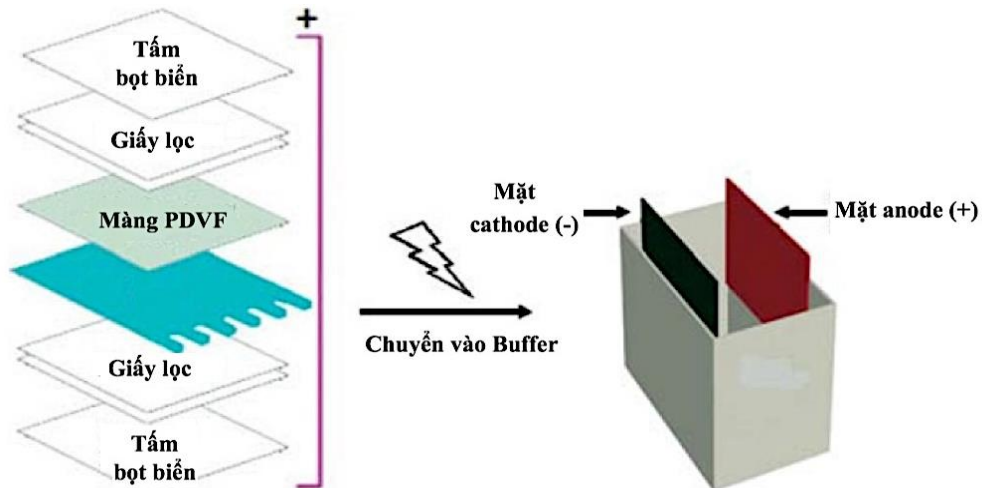
Màng PVDF sau đó được khóa màng qua đêm ở 4°C trong Blocking Buffer (ab126587, Abcam, Mỹ). Màng được ủ với kháng thể chính trong đệm kẹp qua đêm ở 4°C. Các kháng thể (đặc trưng cho từng loại protein) được sử dụng ở độ pha loãng 1:5000. Kháng thể kháng GAPDH (ab181602, Abcam, Hoa Kỳ) được sử dụng làm đối chứng ở độ pha loãng 1:10000. Màng được rửa ba lần bằng TBST, mỗi lần 10 phút. Tiếp tục ủ màng lai với kháng thể thứ cấp có gắn enzyme horseradish peroxidase trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, rửa màng lai với TBST 1X 3 lần, mỗi lần 5 phút để loại bỏ kháng thể thứ cấp dư thừa. Xử lý màng lai đã được cố định trên cassette với hỗn hợp Reagent 1 và Reagent 2 (ECL Western Blotting Substrate Kit) (ab65623, Abcam, Hoa Kỳ) theo tỉ lệ 1:1 trong 1 phút. Đặt 1 tấm phim CL-XPosure Film lên màng lai và ủ trong 1 phút. Sau đó, phim được nhúng vào dung dịch Develope trong 15 giây và chuyển qua dung dịch Fixing trong 15 giây. Cuối cùng, phim được rửa bằng nước cất trong 30 giây. Các vạch protein phát huỳnh quang trên màng lai do sự phân giải cơ chất của enzyme horseradish peroxidase sẽ được hiển thị âm bản trên phim. Hình ảnh được thực hiện bằng phim X-quang [32].

Các kháng thể được sử dụng bao gồm:

- **Các protein liên quan đến chu kỳ tế bào:** gồm các kháng Anti-Cyclin A1 + Cyclin A2 (ab185619, Abcam, Hoa Kỳ), kháng thể Anti-Cdk4 (ab137675, Abcam, Hoa Kỳ), kháng thể Anti-Cyclin D1 (ab40754, Abcam, Cambridge, MA, USA), và kháng thể Anti-Cdk6 (ab124821, Abcam, Hoa Kỳ).

- *Các protein điều hoà quá trình apoptosis*: các kháng thể Anti-Bax (ab53154, Abcam, Cambridge, MA, USA) và kháng thể Anti-Bcl-2 (ab196495, Abcam, Cambridge, MA, USA).

- *Các protein tham gia cấu trúc bộ khung xương của tế bào*: Kháng thể Anti-  $\beta$ -Actin (ab8226, Abcam, Mỹ) và kháng thể Anti- $\alpha$ -Tubulin 3 (ab52866, Abcam, Mỹ).



**Hình 2.4.** Phương pháp chuyển màng PVDF [32]

#### 2.4.8. Phương pháp thống kê

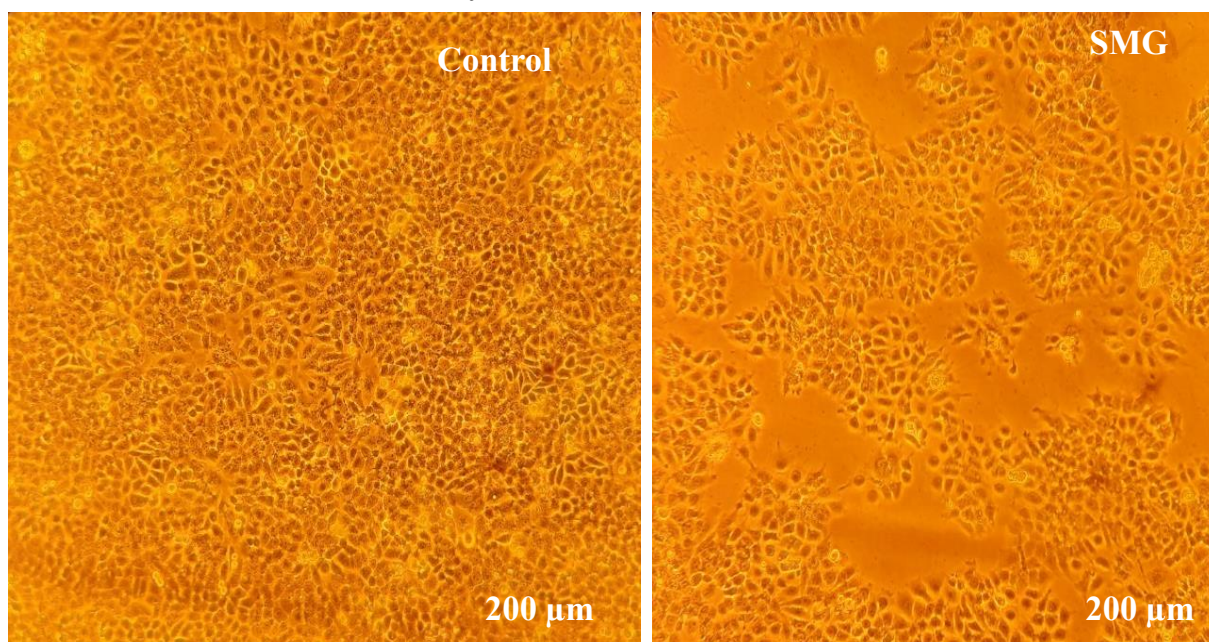
Các số liệu kết quả nghiên cứu được phân tích bằng phần mềm Sigma Plot (SYSTAT Software, Mỹ). Kết quả đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm được thực hiện bằng phân tích One-way ANOVA (One-way analysis of variance) với Holm Sidak test, trong đó  $p \leq 0,05$  được xem là khác biệt có ý nghĩa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

### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Khả năng tăng sinh của tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng

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

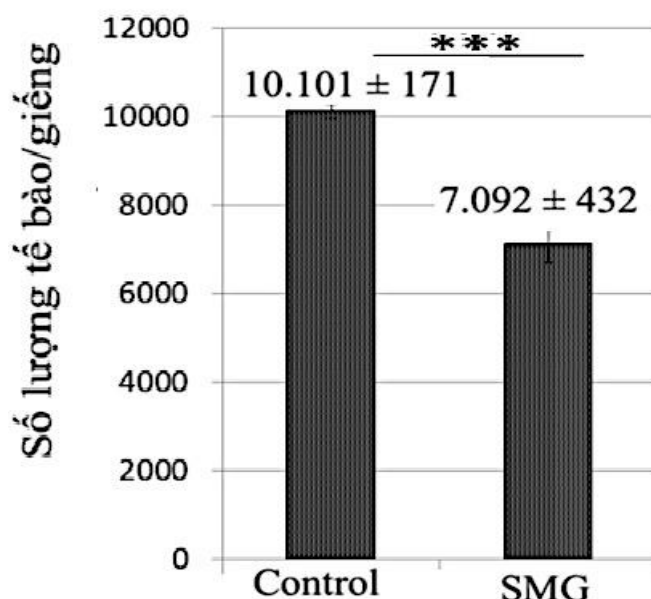
Hình 3.1 thể hiện hình thái giống như biểu mô bình thường của các tế bào CCL-13 từ nhóm đối chứng và nhóm SMG. Hình thái tế bào CCL-13 được nuôi cấy trong điều kiện bình thường (1 g) thì tế bào gan vẫn giữ được đặc điểm giống tế bào biểu mô, tế bào gan có hình thái giống hình đa giác nhỏ, bám trải trên bề mặt dụng cụ nuôi cấy (đĩa 96 giếng). Tế bào gan nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực không thấy rõ được sự khác biệt về đặc điểm hình thái, vẫn gần giống tế bào biểu mô gan bình thường với hình đa giác nhỏ và giống như tế bào trong nhóm đối chứng. Tuy nhiên mật độ tế bào thì ít hơn thấy rõ.



**Hình 3.1.** Hình thái tế bào sau nuôi cấy khi nuôi cấy 72 h trong đĩa 96 giếng (Control: hình thái tế bào trong điều kiện trọng lực 1 g làm đối chứng, SMG: hình thái tế bào trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng)

Tế bào gan Chang (CCL-13) được nuôi cấy với mật độ  $2 \times 10^3$  tế bào/giếng trong đĩa 96 giếng. Mật độ tế bào được xác định bằng chương trình Cell Cycle App của hệ thống kính hiển vi huỳnh quang Cytell. Kết quả phân tích cho thấy số lượng tế bào CCL-13 trung bình mỗi giếng ở môi trường vi trọng lực là  $7.092 \pm 432$  tế bào/giếng trong khi ở môi trường đối chứng là  $10.101 \pm 171$  tế bào/giếng ( $p \leq 0,005$ ). Hình 3.2 cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong mật độ tế bào CCL-13 giữa hai nhóm đối chứng và cảm ứng vi trọng lực mô phỏng. Kết quả này

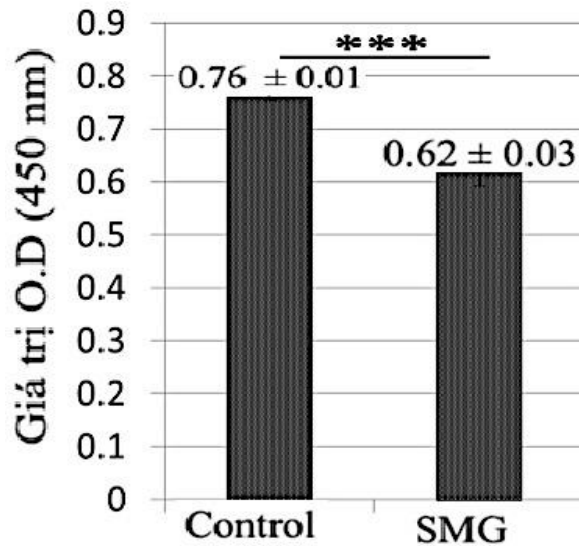
cho thấy rằng điều kiện vi trọng lực mô phỏng cảm ứng sự giảm mật độ tế bào, hay nói cách khác là ức chế khả năng tăng sinh của tế bào CCL-13.



**Hình 3.2.** Mật độ tế bào CCL-13 trung bình khi nuôi cấy (theo Phụ lục 3). Control: nhóm đối chứng, môi trường 1 g có mật độ tế bào cao hơn nhiều so với nhóm tế bào được nuôi cấy trong môi trường vi trọng lực mô phỏng (SMG). \*\*\* Biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $P < 0.001$ ).

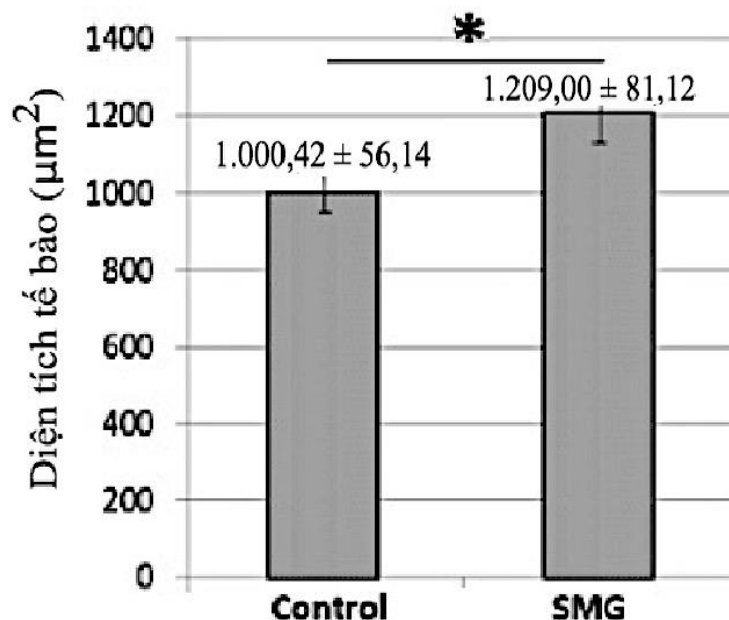
Ngoài ra, sự tăng trưởng và khả năng sống của tế bào CCL-13 được đánh giá bằng thử nghiệm với kit WST-1 (Hình 3.3). Thuốc thử tăng sinh tế bào WST-1 được sử dụng để định lượng tế bào (không dùng chất đánh dấu phóng xạ), định lượng quang phổ của sự tăng sinh tế bào và khả năng tồn tại trong quần thể tế bào sử dụng đĩa 96 giếng. Kết quả phân tích giá trị độ hấp thụ của tế bào CCL-13 cho thấy giá trị OD của nhóm đối chứng là  $0,76 \pm 0,01$ , cao hơn so với nhóm tế bào gan CCL-13 được cảm ứng điều kiện vi trọng lực mô phỏng là  $0,62 \pm 0,03$  ( $p < 0,001$ ). Kết quả này cho thấy sự tăng sinh của tế bào gan Chang (CCL-13) từ nhóm SMG thấp hơn nhóm đối chứng.

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 [111], tế bào gốc trung mô tủy xương [112], tế bào gốc trung mô chuột [113] và tế bào hắc tố BL6-10 [114]. Trong nghiên cứu hiện tại, mật độ tế bào gan Chang (CCL-13) trong nhóm đối chứng và SMG cao hơn 5 lần và 3,5 lần so với mật độ cấy ban đầu. Ngoài ra, thử nghiệm WST-1 cho thấy tỉ lệ tăng sinh thấp hơn ở các tế bào CCL-13 trong điều kiện SMG so với các tế bào đối chứng.



**Hình 3.3.** Giá trị O.D của các tế bào CCL-13 sau khi nuôi cấy 72h và phân tích WST-1 (theo phụ lục 4). Sức sống của tế bào của nhóm đối chứng (Control) cao hơn rất nhiều sức sống của các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng (SMG). \*\*\* Biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $P < 0.001$ ).

Các tế bào gan Chang (CCL-13) trong nhóm SMG có diện tích lớn hơn các tế bào trong nhóm đối chứng (lần lượt là  $1.209,00 \pm 81,12 \mu\text{m}^2$  so với  $\mu\text{m}^2$ ) (Hình 3.4).



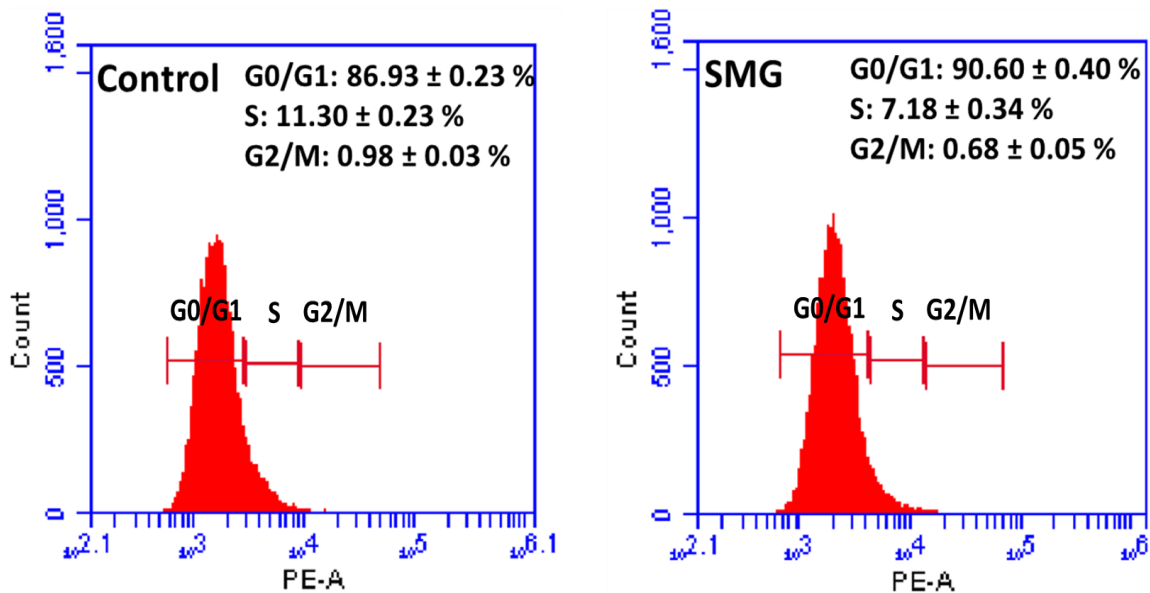
**Hình 3.4.** Diện tích trung bình của các tế bào CCL-13 được đánh giá sau 72h nuôi cấy ở cả trong 2 điều kiện (theo Phụ lục 5). Control: kết quả trong điều kiện đối chứng 1 g; SMG: kết quả trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng. \* Biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $p < 0,05$ ).

Những kết quả này cho thấy trong điều kiện SMG hình dạng tế bào CCL- không có sự thay đổi rõ rệt khi quan sát hình ảnh, đặc điểm hình dạng tế bào. Tuy nhiên, số lượng tế bào và giá trị O.D đều giảm hơn so với nhóm đối chứng, chứng tỏ khả năng tăng sinh, sức sống của tế bào CCL-13 trong điều kiện SMG đã giảm hơn rất rõ. Ngược lại, có sự hơi bất thường về diện tích, tế bào CCL-13 có diện tích lớn trong điều kiện SMG so với nhóm đối chứng trong điều kiện 1 g.

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

#### 3.1.2.1. Kết quả phân tích flow cytometry

Chu kỳ tế bào gan Chang (CCL-13) được đánh giá bằng phương pháp flow cytometry (Hình 3.5). Kết quả phân tích cho thấy: Đối với tế bào CCL-13 nhóm đối chứng: Tỷ lệ pha  $G_0/G_1$  là  $86,93 \pm 0,23\%$ , pha S là  $11,30 \pm 0,23 \%$ , pha  $G_2/M$  là  $0,98 \pm 0,03\%$ . Đối với tế bào CCL-13 nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng: Tỷ lệ pha  $G_0/G_1$  là  $90,60 \pm 0,40\%$ , pha S là  $7,18 \pm 0,34 \%$ , pha  $G_2/M$  là  $0,68 \pm 0,05\%$ . Tế bào ở nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng có xu hướng tăng tỷ lệ tế bào trong pha  $G_0/G_1$  và giảm tỷ lệ tế bào trong pha S và  $G_2/M$ .



**Hình 3.5.** Chu kỳ tế bào CCL-13 được phân tích bằng flow cytometry, đối sánh các pha trong chu kỳ phân bào giữa 2 nhóm tế bào trong điều kiện SMG và nhóm đối chứng (control), tế bào đã rơi vào pha  $G_0/G_1$  rất cao và càng cao hơn trong điều kiện SMG (theo Phụ lục 6).

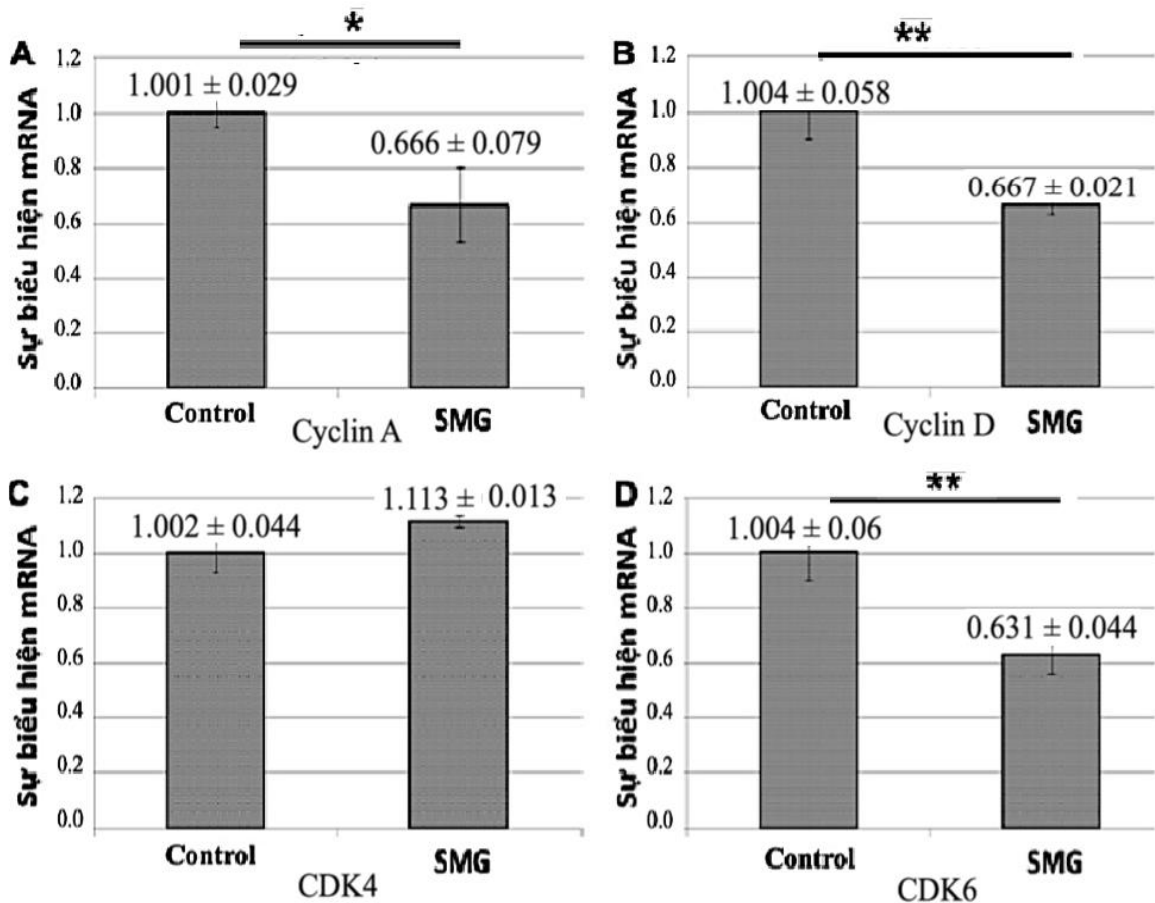
Kết quả trên cho thấy tỷ lệ tế bào CCL-13 trong pha  $G_0/G_1$  của nhóm đối chứng thấp hơn so với nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng. Trong khi đó tỷ lệ tế bào CCL-13 trong pha S và pha  $G_2/M$  của nhóm đối chứng lại cao hơn so với nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng. Điều này chứng tỏ khả năng phân chia của tế bào CCL-13 trong nhóm SMG thấp hơn so với nhóm đối chứng, dẫn đến điều kiện



vi trọng lực mô phỏng cảm ứng sự đi vào pha nghỉ trong chu kỳ tế bào của tế bào CCL-13.

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

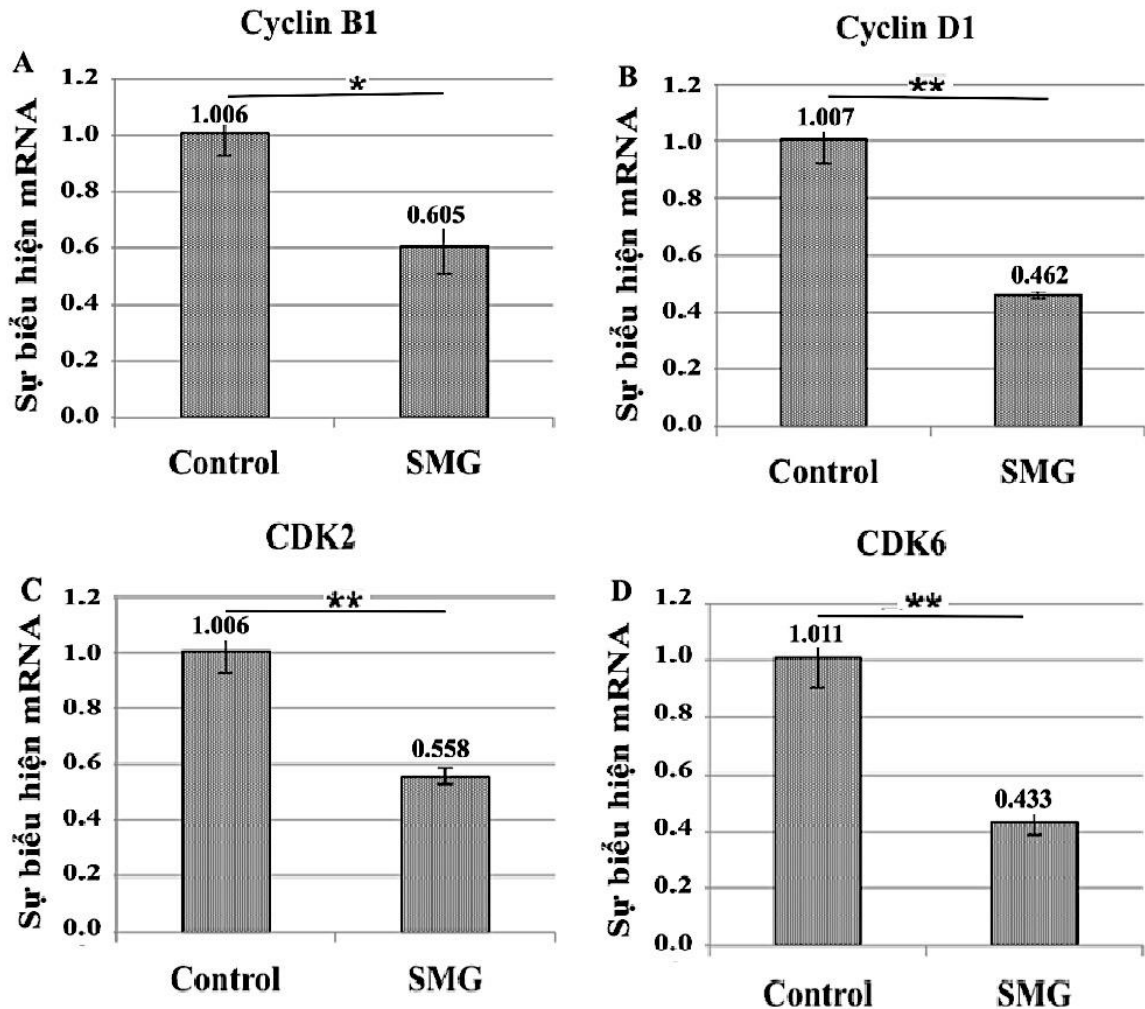
Kết quả phân tích Realtime PCR cho thấy sự biểu hiện mức phiên mã các gene chính điều hòa chu kỳ tế bào gan Chang (CCL-13) có xu hướng giảm trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Tế bào CCL-13 trong nhóm SMG giảm biểu hiện mRNA của gene Cyclin A (Hình 3.6A). Sự giảm biểu hiện này còn được nhận thấy ở gene Cyclin D trong tế bào CCL-13 dưới điều kiện SMG (Hình 3.6B). Tế bào CCL-13 giảm sự biểu hiện mRNA gene CDK6 khi được cảm ứng SMG (Hình 3.6D). Tuy nhiên sự biểu hiện mRNA gene CDK4 lại không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa hai nhóm thí nghiệm (Hình 3.6C).



**Hình 3.6.** Kết quả phân tích Realtime RT-PCR đối với các gene điều hòa chính chu kỳ tế bào trong điều kiện SMG và trọng lực 1 g (theo Phụ lục 7). A: sự biểu hiện Cyclin A. B: sự biểu hiện Cyclin D. C: sự biểu hiện của CDK4. D: sự biểu hiện CDK6. \* biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng (p < 0,05), \*\* biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng (p < 0,01).

So với các tế bào của nhóm đối chứng, các tế bào CCL-13 của nhóm SMG đã giảm mức biểu hiện phiên mã của các gene Cyclin B1 và Cyclin D1, theo phân

tích RT-PCR (Hình 3.7). Biểu hiện của cyclin B1 và cyclin D1 trong các tế bào CCL-13 được xử lý bằng SMG thấp hơn so với nhóm đối chứng. Ngoài ra, sự giảm biểu hiện bản phiên mã gene CDK2 và CDK6 cũng được thấy rõ ở CCL-13 từ nhóm SMG. Biểu hiện của gene CDK2 và CDK6 trong các tế bào CCL-13 ở điều kiện SMG thấp hơn so với nhóm đối chứng. Những kết quả này cho thấy trong điều kiện SMG gây ra sự điều hòa giảm phiên mã của các gene chính liên quan đến chu kỳ tế bào trong các tế bào CCL-13.

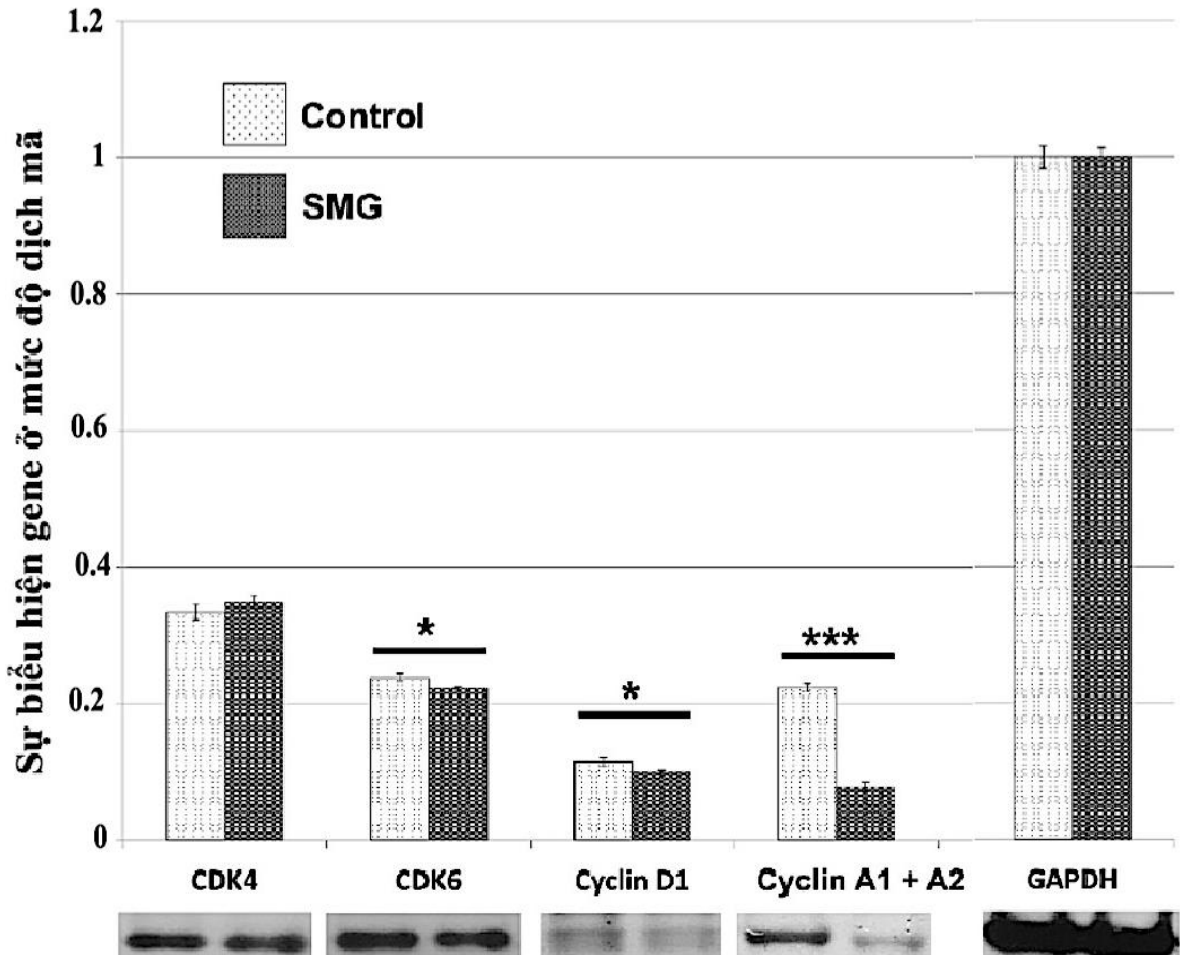


**Hình 3.7.** So sánh biểu hiện gene phiên mã liên quan đến chu kỳ tế bào trong nhóm SMG và nhóm đối chứng sử dụng Realtime RT-PCR (theo Phụ lục 8). \*\* biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $p < 0,01$ ); \* biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $p < 0,05$ ).

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

Phân tích Western blot cho thấy các sự biểu hiện của protein CDK4 trong tế bào CCL-13 ở nhóm đối chứng cao hơn so với tế bào CCL-13 trong nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng (Hình 3.8). Tế bào CCL-13 trong nhóm đối chứng cũng cho thấy mức độ biểu hiện CDK6 cao hơn so với nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng.

Ngoài ra, sự biểu hiện của protein Cyclin D1 cũng giảm mạnh ở nhóm tế bào CCL-13 thuộc nhóm SMG so với nhóm đối chứng. Quá trình giảm mạnh này cũng được nhận thấy trong sự biểu hiện của protein Cyclin A1 và A2 ở nhóm tế bào CCL-13 được cảm ứng vì trọng lực mô phỏng trong so với nhóm đối chứng.



**Hình 3.8.** Phân tích western blot các protein liên quan đến chu kỳ tế bào. Sự biểu hiện protein họ Cdk's như cdk4 và cdk6 giảm ở nhóm cảm ứng vì trọng lực mô phỏng. Sự giảm biểu hiện này cũng được nhận thấy ở protein họ cyclin như cyclin A và cyclin D trong nhóm này (theo Phụ lục 9). \* biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $p < 0,05$ ), \*\*\* biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $P < 0.001$ ).

Thực hiện thêm các phân tích Western blot cũng cho thấy tế bào CCL-13 từ nhóm SMG thể hiện biểu hiện thấp hơn của Cyclin A, CDK2 và CDK6 so với nhóm đối chứng (phụ lục 10). Trong khi đó, Cyclin A có thể kích hoạt hai CDK khác nhau và hoạt động trong cả pha S và nguyên phân [51]. Sự giảm biểu hiện của cyclin A xảy ra làm giảm sự chuyển tiếp  $G_1 / S$  và giảm duy trì qua pha S. Với sự liên kết của cyclin A với CDK2, quá trình tổng hợp DNA được tiến hành, nên khi cả 2 protein này đều giảm biểu hiện dẫn đến quá trình tổng hợp DNA bị chậm lại. Cyclin A và Cyclin B tăng tạo phức hợp với CDK1 thúc đẩy tế bào qua nguyên

phân [51], khi 2 protein giảm biểu hiện trong điều kiện SMG dẫn đến quá trình nguyên phân bị chậm lại, tế bào ròi vào pha  $G_0$  kéo dài hơn.

Sự tăng sinh tế bào đòi hỏi sự gia tăng phân chia tế bào, được kiểm soát bởi các protein điều hòa chu kỳ tế bào như cyclin và Cdks [93]. Cyclin A1 và A2 đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn S và chuyển tiếp  $G_2/M$  trong tất cả các tế bào tăng sinh [115 - 118]. Trong giai đoạn  $G_1$ , sự tổng hợp Cyclin D tăng cường thúc đẩy sự liên kết của phức hợp Cdk 4/6 và Cyclin D kiểm soát sự chuyển tiếp  $G_1$  và  $G_1/S$  [119 - 121]. Do đó, những thay đổi trong biểu hiện của CDK 4, CDK 6 và cyclin D dẫn đến những thay đổi trong chu kỳ tế bào. Trong nghiên cứu hiện tại, sự giảm biểu hiện của cyclin D tương quan với sự giảm biểu hiện của Cdk6 trong các tế bào CCL-13 nhóm SMG, dẫn đến độ trễ ở pha  $G_1$  được quan sát trong các tế bào CCL-13 nhóm SMG. Biểu hiện điều hòa giảm của Cyclin A1 và Cyclin A2 cũng được quan sát thấy trong các tế bào CCL-13 nhóm SMG, dẫn đến các tế bào CCL-13 nhóm SMG trong pha S có tỉ lệ thấp.

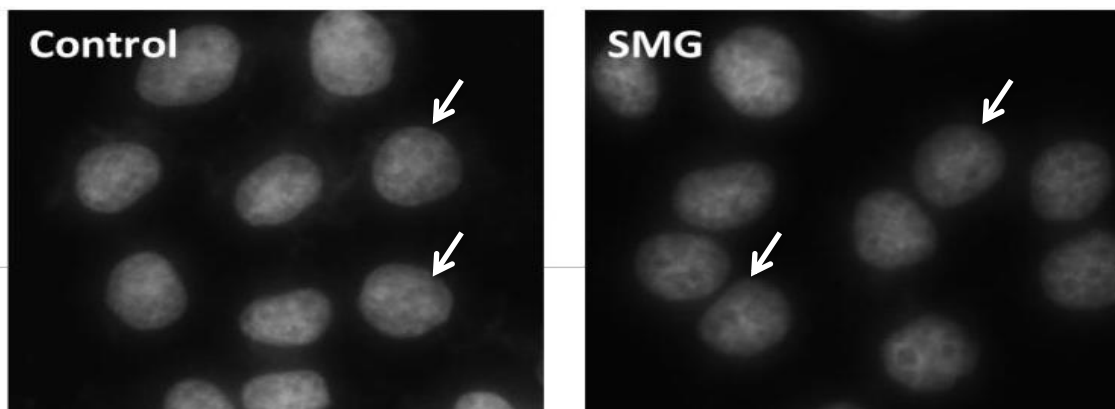
Ngoài ra, Cyclin hoạt động với họ kinase phụ thuộc cyclin để điều chỉnh các hoạt động của chu kỳ tế bào, bao gồm chuyển từ trạng thái không hoạt động sang chu kỳ của tế bào, chuyển pha  $G_1/S$ , sao chép DNA, ngưng tụ và phân tách nhiễm sắc thể và phân bào [122 - 124]. Việc kích hoạt cdk4 và cdk6 bằng liên kết Cyclin D là cần thiết cho lối vào chu trình tế bào ở giai đoạn đầu  $G_1$ , trong khi kích hoạt cdk2 bằng liên kết Cyclin E là cần thiết để tiến qua  $G_1$  và lối vào pha S [125]. Hơn nữa, quá trình chuyển đổi qua pha S cũng được điều chỉnh bởi cyclin A/cdk2 [126]. Cyclin B1 là một yếu tố quan trọng trong việc điều chỉnh quá trình chuyển đổi từ pha  $G_2$  sang pha M [127, 128]. Nghiên cứu này cho thấy rằng sự biểu hiện của các gene liên quan đến chu kỳ tế bào đã được điều chỉnh giảm đối với các tế bào CCL-13 trong điều kiện SMG. Điều này gây cản trở các tế bào đi đến pha S và pha  $G_2/M$  và giữ cho các tế bào ở pha  $G_0$ , pha nghỉ.

### **3.2. Ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực lên sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào gan Chang (CCL-13)**

#### **3.2.1. Sự thay đổi hình dạng nhân và cường độ hạt nhân của tế bào CCL-13**

Hình 3.9 mô tả hình thái nhân tế bào CCL-13 ở nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng. Kết quả này cho thấy kích thước nhân của tế bào CCL-13 thuộc nhóm đối chứng cao hơn so với nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng. Nhân tế bào CCL-13 thuộc 2 nhóm này đều có hình thái bình thường, không có sự cô đặc nhiễm sắc chất, phân mảnh nhân. Hình thái nhân chịu ảnh hưởng bởi khá nhiều yếu tố, bao gồm màng ngoại biên nhân, màng lưới nội chất, nhiễm sắc thể

và sự tổng hợp lipid. Điều này chứng tỏ quá trình apoptosis không diễn ra ở các tế bào được phân tích, tế bào CCL-13 vẫn duy trì hình thái bình thường trong quá trình phát triển của tế bào.

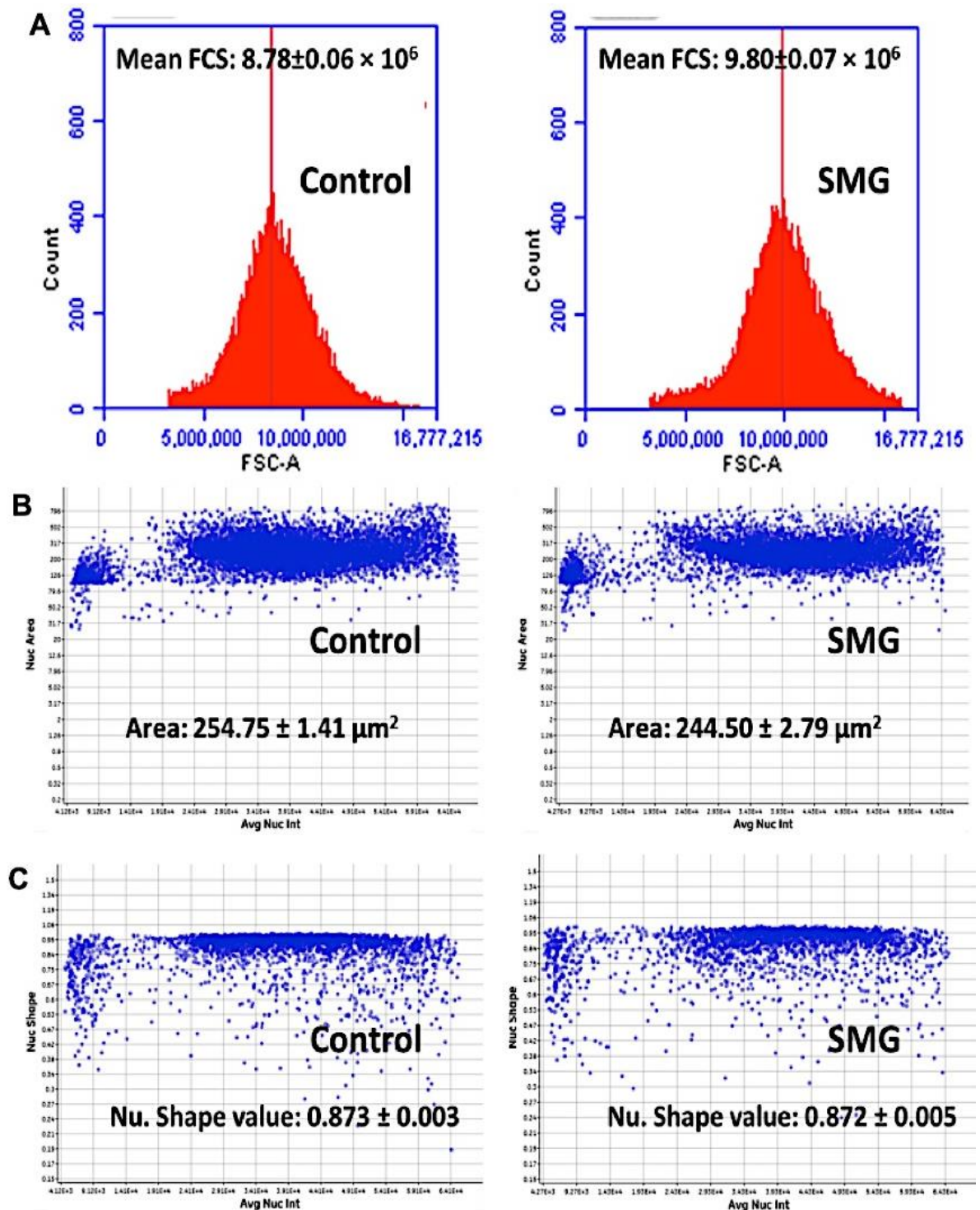


**Hình 3.9.** Hình thái nhân của tế bào CCL-13 nuôi cấy sau 72h, trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng (SMG) so với nhóm đối chứng nuôi cấy trong điều kiện 1 g (control). Mũi tên trắng chỉ kết quả hình thái nhân sau khi được nhuộm bằng Hoechst 33342 và đánh giá bằng kính hiển vi Cytell cho thấy không có sự cô đặc nhiễm sắc chất và không thấy rõ sự khác biệt về hình thái nhân ở cả 2 điều kiện.

Kết quả phân tích cho thấy, giá trị FSC của các tế bào CCL-13 trong nhóm SMG cao hơn các tế bào trong nhóm đối chứng (lần lượt là  $9,80 \times 10^6$  so với  $8,78 \times 10^6$ ) ( $p < 0,001$ ) (Hình 3.10A), điều này chứng tỏ rằng kích thước tế bào CCL-13 trong nhóm SMG lớn hơn các tế bào trong nhóm đối chứng. Kết quả này phù hợp với kết quả ở hình 3.4 về diện tích tế bào. Nhưng ngược lại, ở hình 3.10B, diện tích nhân của tế bào CCL-13 thuộc nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng là  $244,50 \pm 2,79 \mu\text{m}^2$  lại nhỏ hơn diện tích nhân của tế bào thuộc nhóm đối chứng là  $254,75 \pm 1,41 \mu\text{m}^2$ . Điều này chứng tỏ điều kiện vi trọng lực mô phỏng cảm ứng làm giảm diện tích nhân tế bào CCL-13.

Kết quả phân tích trong hình 3.10C cho thấy giá trị hình dạng nhân (nuclear shape value) đặc trưng cho mức độ tròn và toàn vẹn của nhân. 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. Kết quả phân tích bằng kính hiển vi Cytell cho thấy giá trị hình dạng nhân của tế bào CCL-13 thuộc nhóm đối chứng là  $0,873 \pm 0,003$ . Giá trị này của tế bào CCL-13 thuộc nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng giảm còn  $0,872 \pm 0,005$ . Tuy nhiên không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa hai giá trị này, kết quả này phù hợp với kết quả hình ảnh về hình thái nhân của tế bào CCL-13 nuôi cấy trong cả 2 điều kiện (SMG và trọng lực 1g) ở

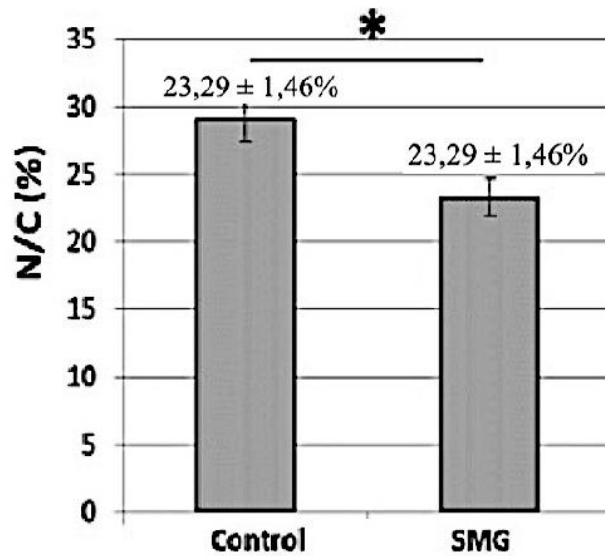
hình 3.9. Điều đó chứng tỏ điều kiện vi trọng lực mô phỏng không ảnh hưởng tới giá trị hình dạng nhân cũng như mức độ toàn vẹn của nhân tế bào CCL-13.



**Hình 3.10.** Kết quả phân tích tế bào và hình thái nhân tế bào CCL-13.

A: Giá trị FCS của tế bào trong nhóm SMG lớn hơn so với nhóm đối chứng (theo Phụ lục 11), B: Diện tích nhân tế bào trong nhóm SMG nhỏ hơn so với tế bào nuôi trong điều kiện 1 g ở nhóm control (theo Phụ lục 12), C: Giá trị hình thái nhân tế bào trong 2 điều kiện nuôi cấy có sự khác biệt rất nhỏ, không có ý nghĩa phân biệt (theo Phụ lục 13).

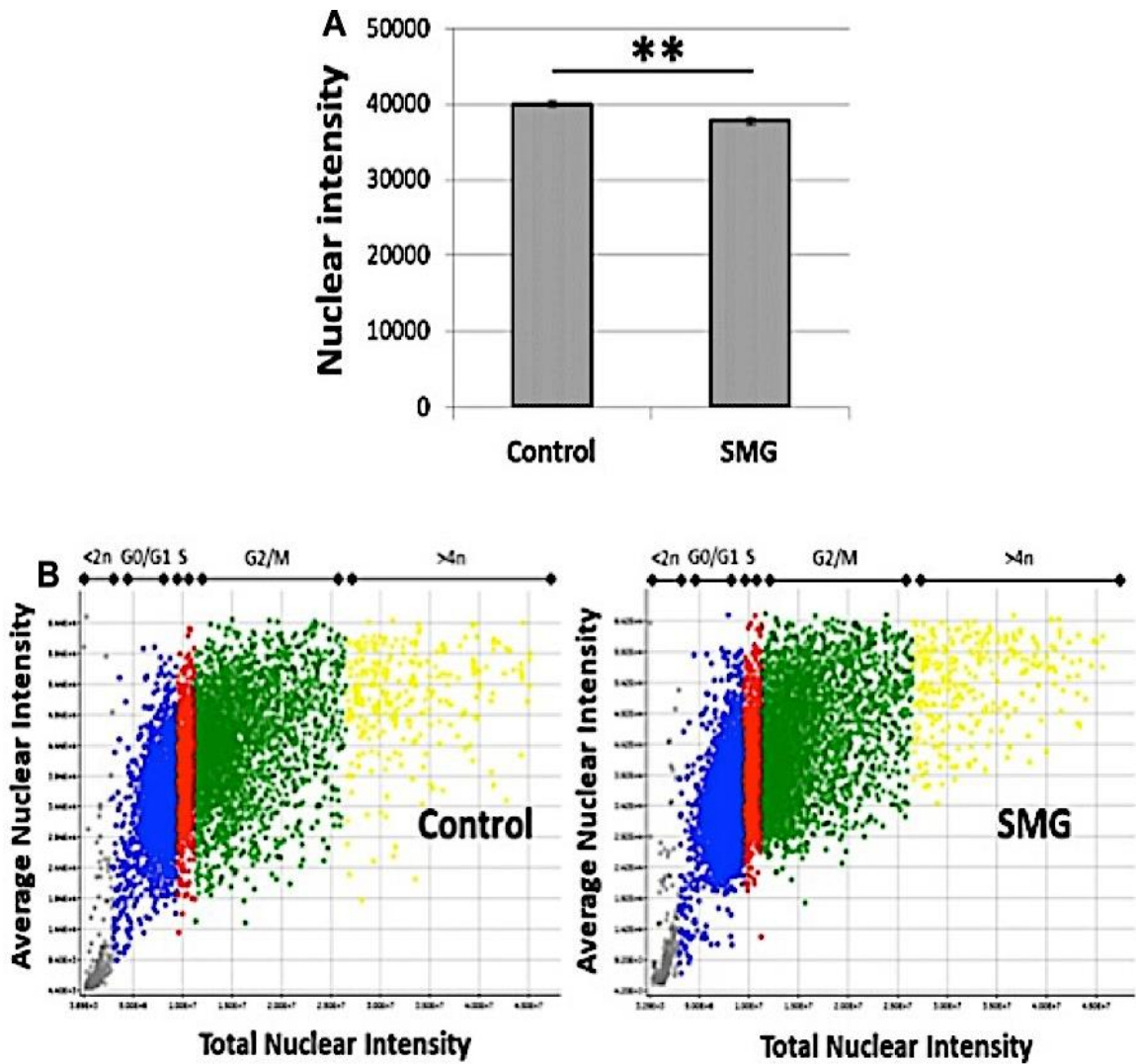
Tỷ lệ diện tích nhân/diện tích tế bào giảm đi nhiều trong các tế bào CCL-13 trong điều kiện SMG so với các tế bào đối chứng (lần lượt là  $23,29 \pm 1,46\%$  so với  $29,15 \pm 1,80\%$ ) (Hình 3.11).



**Hình 3.11.** Tỷ lệ diện tích nhân/diện tích tế bào (N/C) của các tế bào CCL-13 sau nuôi cấy 72h (theo Phụ lục 14). \* Biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $p < 0,05$ ).

Sự ngưng tụ chất nhiễm sắc, một sự kiện phân bào quan trọng, cần thiết cho quá trình phân chia tế bào. Một trong những đặc điểm của nhân quan trọng trong quá trình phân chia tế bào là cường độ nhân, cũng được đánh giá trong CCL-13 trong điều kiện SMG. Nhuộm Hoechst 33342 cho nhân, tạo ra cường độ nhân, được sử dụng để phát hiện sự ngưng tụ của chất nhiễm sắc. Như đã thấy trong Hình 3.12A và Hình 3.12B, các kết quả trong điều kiện SMG có cường độ thấp hơn các kết quả trong nhóm đối chứng (lần lượt là  $37766 \pm 458$  so với  $39985 \pm 366$ ). Kết quả là sự ngưng tụ chất nhiễm sắc ít hơn đã làm giảm sự phân chia của các tế bào CCL-13.

Các nghiên cứu trước đây đã khám phá được điều kiện vi trọng lực mô phỏng có thể tạo ra sự thay đổi hình thái của tế bào động vật có vú bằng nhiều cơ chế khác nhau. Dinarelli và cộng sự đã chứng minh rằng môi trường vi trọng lực mô phỏng gây ra những thay đổi về hình dạng tế bào và độ nhám màng trên hồng cầu ở người [129]. Nghiên cứu trên nguyên bào xương nguyên phát ở người của Gioia và cộng sự thì cho thấy các tế bào này thay đổi hình thái từ dạng phẳng sang dạng hình thoi khi được nuôi trong môi trường vi trọng lực mô phỏng [130]. Một nghiên cứu khác báo cáo rằng môi trường vi trọng lực mô phỏng tạo ra những thay đổi mạnh mẽ về kích thước và hình dạng của các tế bào và sự chuyên môn hóa bề mặt của chúng [131].



**Hình 3.12.** Cường độ nhân (A); Phân bố cường độ nhân CCL-13 giữa nhóm đối chứng và nhóm SMG (B). Màu xám biểu thị phần trăm cường độ nhân  $< 2n$ , màu xanh biểu thị phần trăm cường độ nhân trong pha G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, màu đỏ biểu thị phần trăm cường độ nhân trong pha S, màu lục biểu thị phần trăm cường độ nhân trong pha G<sub>2</sub>/M và màu vàng biểu thị phần trăm cường độ nhân  $> 4n$  (theo Phụ lục 15). \*\* biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $p < 0,01$ ).

Trong quá trình nguyên phân, các tế bào biểu hiện những thay đổi về hình thái trong tế bào chất và nhân [132, 133]. Nghiên cứu trước đó đã báo cáo rằng tỉ lệ hạt nhân/tế bào chất cao bắt đầu các quá trình nội bào giúp tế bào sẵn sàng phân chia và sự mở rộng tế bào chất tiếp tục cho đến thời điểm phân chia [134]. Trong nghiên cứu này, các tế bào CCL-13 do SMG gây ra cho thấy sự mở rộng diện tích tế bào và giảm diện tích nhân, dẫn đến giảm tỉ lệ nhân/tế bào chất. Kết quả này cho thấy rằng tỉ lệ hạt nhân/tế bào chất thấp có liên quan đến sự chậm trễ trong giai đoạn phân chia của các tế bào CCL-13 trong điều kiện SMG. Đối với quá trình phân chia tế bào, việc tái tạo nhân là cần thiết, vì điều này làm tăng tốc độ sao chép DNA và sản xuất các thành phần tế bào khác. Ngưng tụ chất nhiễm sắc, một quá trình làm



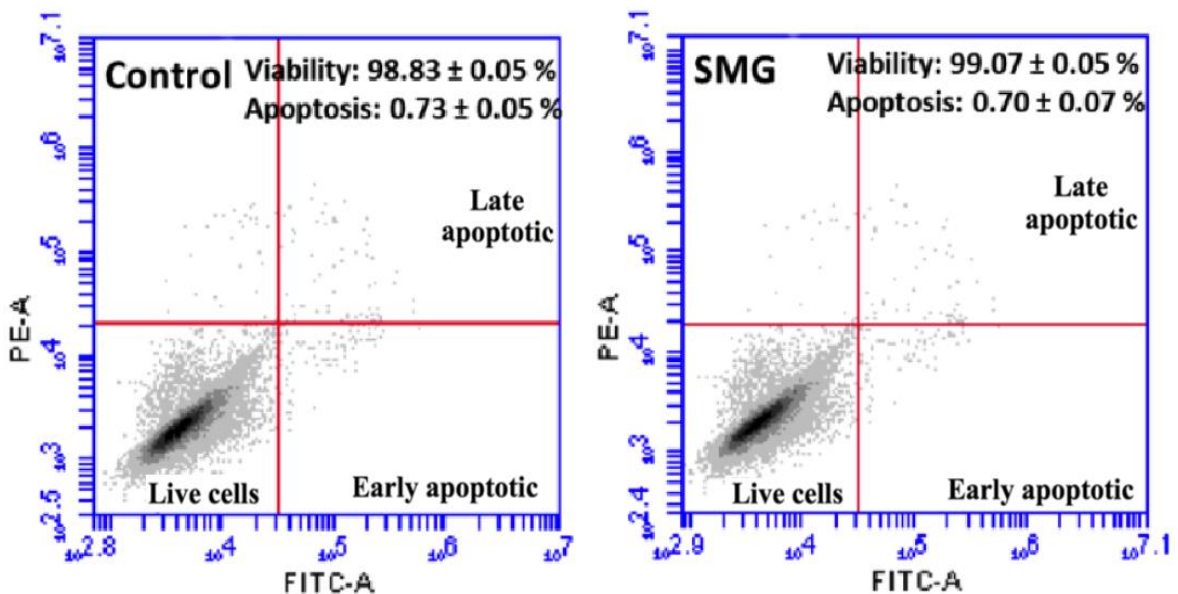
tăng cường độ hạt nhân, là cần thiết để quá trình nguyên phân xảy ra [135]. Nghiên cứu này cho thấy cường độ hạt nhân của các tế bào SMG thấp hơn so với đối chứng, cho thấy rằng những thay đổi trong quá trình tái tạo hạt nhân hoặc/và sao chép DNA được bắt đầu bởi điều kiện SMG.

### 3.2.2. Ảnh hưởng của vi trọng lực lên sự chết theo chương trình (apoptosis)

#### 3.2.2.1. Tỷ lệ tế bào đi vào con đường apoptosis

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. 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 fluorochrom có thể được sử dụng để phát hiện tế bào apoptosis bằng phương pháp tế bào học dòng chảy.

Kết quả phân tích cho thấy tỷ lệ tế bào CCL-13 sống trong nhóm đối chứng là  $98,83 \pm 0,05 \%$ . Trong khi đó tỷ lệ tế bào CCL-13 sống trong nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng là  $99,07 \pm 0,05 \%$ . Tuy nhiên không có sự khác biệt về mặt thống kê trong tỷ lệ tế bào sống giữa hai nhóm này. Điều đó cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng không tác động lên sức sống của tế bào CCL-13 (Hình 3.13).



**Hình 3.13.** Kết quả phân tích flow cytometry. Tỷ lệ tế bào sống giữa nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng không có sự khác biệt về mặt thống kê. Ngoài ra tỷ lệ apoptosis giữa 2 nhóm thí nghiệm là tương đương nhau và không có sự khác biệt về mặt thống kê (theo Phụ lục 16).

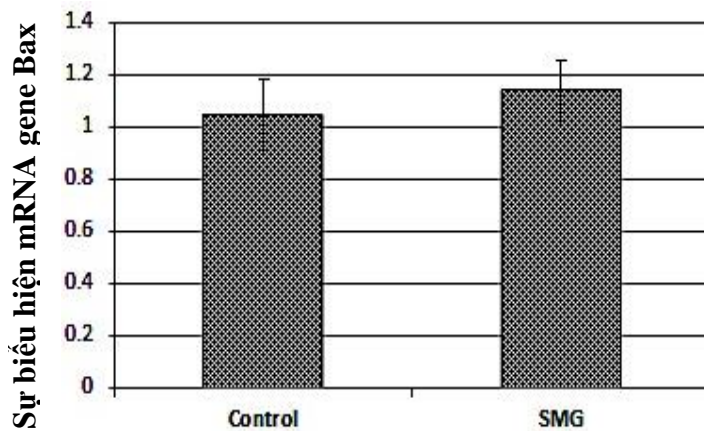
Ngoài ra, kết quả phân tích cho thấy tỉ lệ tế bào CCL-13 bị apoptosis trong nhóm đối chứng là  $0.73 \pm 0.05\%$ . Trong khi đó tỉ lệ tế bào CCL-13 bị apoptosis trong nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng là  $0.70 \pm 0.07\%$ . Tuy nhiên cũng không có sự khác biệt về mặt thống kê trong tỉ lệ tế bào bị apoptosis giữa hai nhóm này. Điều đó cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng không tác động lên sự chết theo chương trình của tế bào CCL-13.

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

Bcl-2 và Bax đóng vai trò quan trọng trong việc cân bằng tỉ lệ apoptosis của tế bào. Sự biểu hiện của 2 gene này ảnh hưởng tới khả năng cân bằng trên, khi tế bào tăng sinh, Bcl-2 biểu hiện mạnh. Khi tế bào đi vào sự chết theo chương trình, mức độ biểu hiện của Bax tăng lên. Trong thí nghiệm này, sự biểu hiện của Bcl-2 và Bax được đánh giá bằng phương pháp real time RT-PCR. Đây là phương pháp định lượng sự biểu hiện gene ở mức phiên mã.

Kết quả phân tích cho thấy không có sự khác biệt trong biểu hiện của gene Bax ở mức phiên mã của tế bào CCL-13 giữa hai nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng (hình 3.14).

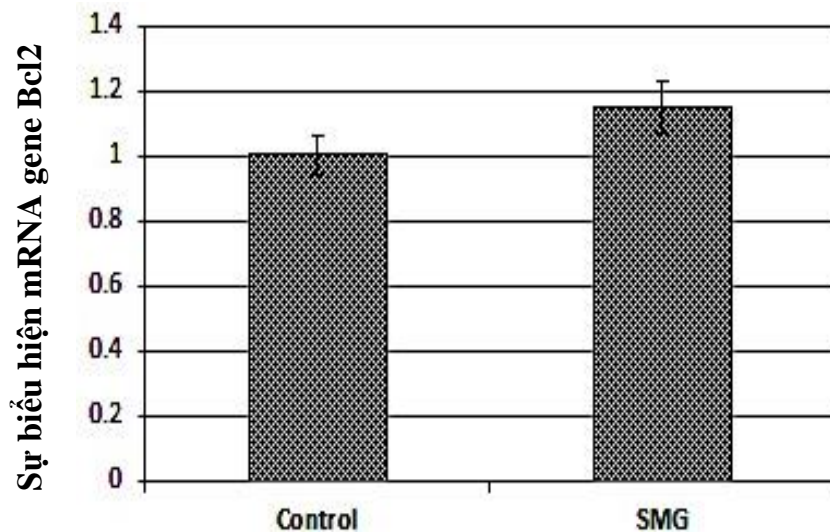
Gene Bax đóng một vai trò trong quá trình apoptotic ty thể. Trong điều kiện bình thường, gene Bax phần lớn là cytosolic thông qua quá trình tái vận chuyển liên tục từ ty thể sang cytosol qua trung gian BCL2L1/Bcl-xL, giúp tránh sự tích tụ nồng độ Bax độc hại ở màng ngoài ty thể (MOM). Trong điều kiện stress, tế bào trải qua một sự thay đổi về hình dạng gây ra sự chuyển vị sang màng ty thể, dẫn đến việc giải phóng cytochrom c sau đó gây ra apoptosis. Thúc đẩy kích hoạt CASP3, và do đó apoptosis. Kết quả phân tích này cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng chưa ảnh hưởng tới sự biểu hiện của gene Bax, chứng tỏ quá trình apoptosis chưa diễn ra mạnh ở các nhóm tế bào này.



**Hình 3.14.** Sự biểu hiện của gene Bax được đánh giá bằng RT-PCR.

Sự biểu hiện các gene Bax ở tế bào ở nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng không có sự khác biệt về mặt thống kê (theo Phụ lục 17).

Ngoài ra, Kết quả phân tích RT-PCR cũng cho thấy không có sự khác biệt trong biểu hiện của gene Bcl-2 ở mức phiên mã của tế bào CCL-13 giữa hai nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng (hình 3.15). Gene Bcl-2 điều hòa chặt chẽ sự kích hoạt con đường nội bào. Các protein thuộc họ này như Bid, Bad, Bim, Bmf, Puma và Noxa có chứa một vùng Bcl-2 homology 3 (protein BH3-only) và có hoạt động theo hướng kích thích quá trình apoptosis (pro-apoptotic activity). Cũng có hai nhóm nhỏ khác của họ Bcl-2 chứa nhiều vùng BH. Nhóm thứ nhất với Bax, Bak và Bok, có khả năng kích thích quá trình apoptosis; nhóm còn lại có Bcl-2, Bcl-XL và Mcl-1 lại hoạt động chống lại sự chết theo chương trình của tế bào (anti-apoptotic activity). Các protein BH3-only sẽ điều khiển quá trình apoptosis bằng cách điều hòa tương tác giữa hai nhóm protein này. Trong phân tích này cho thấy không có sự khác biệt trong biểu hiện của gene Bcl-2 ở mức phiên mã của tế bào CCL-13 giữa hai nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng.

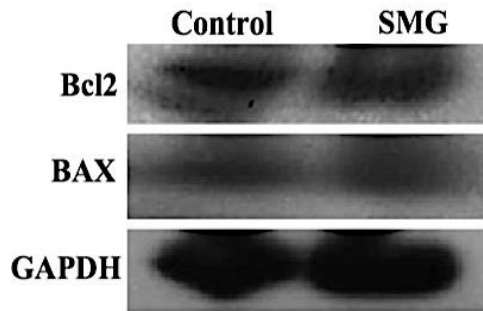


**Hình 3.15.** Sự biểu hiện của Bcl-2 được đánh giá bằng RT-PCR. Sự biểu hiện các gene Bax ở tế bào ở nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng không có sự khác biệt về mặt thống kê (theo Phụ lục 17).

Kết quả nghiên cứu này trên gene Bax tương tự với kết của nghiên cứu của Chun Yan Kang và cộng sự trên dòng tế bào nội mô mạch máu phổi người (HPMEC) đã phát hiện mức độ biểu hiện của gene Bax cao hơn đối với các tế bào HPME nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực ở 72 giờ so với các tế bào HPME nuôi cấy ở điều kiện bình thường. Ngược lại, kết quả nghiên cứu về sự biểu hiện của gene Bcl-2 lại khác với nghiên cứu của Chun Yan Kang và cộng sự, mức độ biểu hiện của gene Bcl-2 của các tế bào HPME được nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng lại thấp hơn so với các tế bào đối chứng [66].

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

Trong nghiên cứu này, sự biểu hiện của protein Bcl-2 và Bax được đánh giá bằng phương pháp Western blot. Kết quả phân tích cho thấy, không có sự khác biệt trong biểu hiện của protein Bcl-2 và Bax ở tế bào CCL-13 giữa hai nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Kết quả này cho thấy, điều kiện vi trọng lực mô phỏng không ảnh hưởng tới sự biểu hiện của 2 protein này ở tế bào CCL-13, tức là không ảnh hưởng tới sự cân bằng giữa tỉ lệ sống và chết theo chương trình của tế bào CCL-13 (hình 3.16).



**Hình 3.16.** Kết quả phân tích protein Bax và Bcl-2 bằng Western blot. Sự biểu hiện của protein Bax và Bcl-2 ở tế bào thuộc nhóm đối chứng và nhóm cảm ứng vi trọng lực mô phỏng không có sự khác biệt về mặt thống kê.

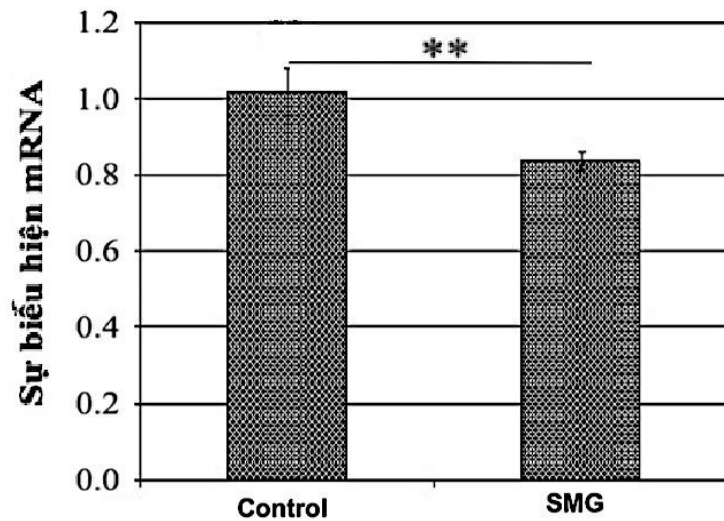
Ngoài ra, các nghiên cứu trước đây về tác động của vi trọng lực mô phỏng lên các tế bào nguyên bào xương bình thường của con người cho thấy không có sự khác biệt nhiều về số lượng tế bào và khả năng sống của tế bào đối với các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện 1g. Sự phân mảnh DNA được phân tích trên điện di agarose-gel. Mức phiên mã mRNA cho các gene Bax, Bcl-2, XIAP và caspase-3 được phân tích bằng RT-PCR, kết quả cho thấy tỉ lệ mức phiên mã mRNA của gene Bax/Bcl-2 đã tăng đáng kể lên 136% so với các đối chứng tĩnh 1g. Tuy nhiên, mức phiên mã mRNA của gene XIAP (phân tử chống apoptotic) đã đồng thời tăng lên 138% trong số các đối chứng tĩnh 1g. Do đó, sự tăng sinh tế bào hoặc khả năng tồn tại của tế bào không bị ảnh hưởng bởi điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Không quan sát thấy sự phân mảnh DNA ở nhóm tế bào nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng cũng như ở nhóm chứng. Đồng thời, mức phiên mã mRNA của gene caspase-3 không bị ảnh hưởng bởi vi trọng lực mô phỏng [136, 137]. Nghiên cứu gần đây của Tan và cộng sự năm 2018 đã chứng minh môi trường vi trọng lực mô phỏng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư bằng cách đảo ngược quá trình bộ máy trao đổi chất dị hóa của một số chức năng cố định (housekeeping functions) [112]. Trong nghiên cứu hiện tại, tỉ lệ sống và tỉ lệ apoptosis của tế bào CCL-13 ở điều kiện vi trọng lực mô phỏng không có sự khác biệt so với điều kiện bình thường, cho thấy sự chết của tế bào không dẫn đến sự giảm tăng sinh của các tế bào CCL-13.

### 3.3. Thay đổi cấu trúc khung xương tế bào gan Chang (CCL-13) trong điều kiện vi trọng lực

#### 3.3.1. Biểu hiện các gene mã hóa protein hình thành cấu trúc bộ khung xương tế bào

##### 3.3.1.1. Kết quả Real time qRT-PCR của gene $\alpha$ -tubulin 3

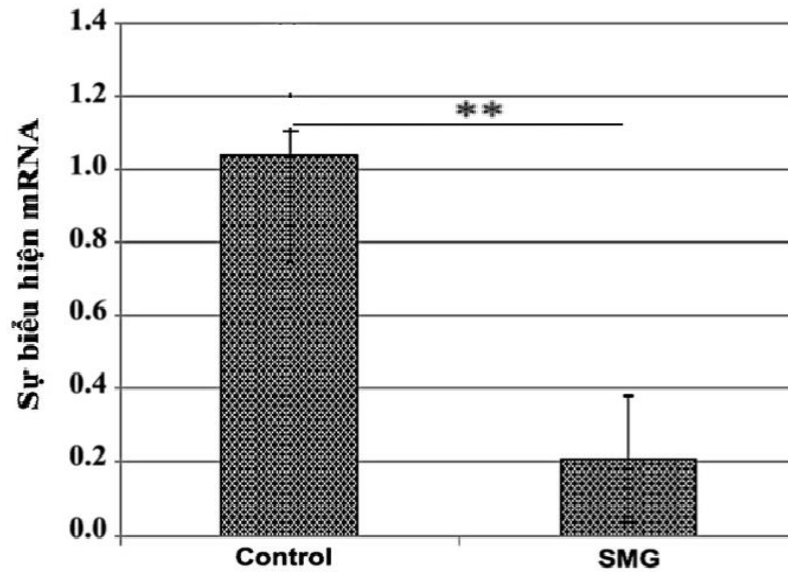
Tubulin là một protein hình cầu cấu thành nên khối vi ống, một thành phần chính của tế bào học. Các dị vòng tubulin bao gồm hai lớp chính là alpha-tubulin và beta-tubulin. Sự đa dạng giữa các kiểu hình tubulin chủ yếu phát sinh từ trình tự đầu C, nó cho phép phân loại thành các isotypes và khả năng nhiều sửa đổi sau dịch mã. Trong nghiên cứu này, những thay đổi trong sự biểu hiện mRNA tubulin được mô tả bằng phương pháp RT-PCR (Hình 3.17). Kết quả cho thấy, trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng, tế bào CCL-13 giảm biểu hiện tubulin sau 3 ngày nuôi cấy. Mức độ giảm biểu hiện của gene tubulin của nhóm cảm ứng điều kiện vi trọng lực mô phỏng là 18% so với nhóm đối chứng. Điều này chứng tỏ điều kiện vi trọng lực mô phỏng cảm ứng sự giảm biểu hiện gene  $\alpha$ -Tubulin 3 ở mức phiên mã.



**Hình 3.17.** Kết quả biểu hiện mức phiên mã của gene  $\alpha$ -Tubulin 3 bằng RT-PCR (Phụ lục 18). \*\*Biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $P < 0.01$ ).

##### 3.3.1.2. Kết quả Real time qRT-PCR của gene $\beta$ -actin

Trong phân tích này, phương pháp RT-PCR được áp dụng để đánh giá sự biểu hiện của gene  $\beta$ -Actin ở mức phiên mã. Sự thay đổi biểu hiện của  $\beta$ -Actin mức phiên mã được mô tả trong Hình 3.18. Kết quả phân tích real time RT-PCR cho thấy tế bào gan Chang (CCL-13) giảm biểu hiện  $\beta$ -actin trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Mức độ giảm  $\beta$ -Actin diễn ra mạnh, tế bào CCL-13 giảm biểu hiện  $\beta$ -Actin tới 80%. Điều này cho thấy sự thay đổi cấu trúc rõ rệt của tế bào gan CLL-13 trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng.

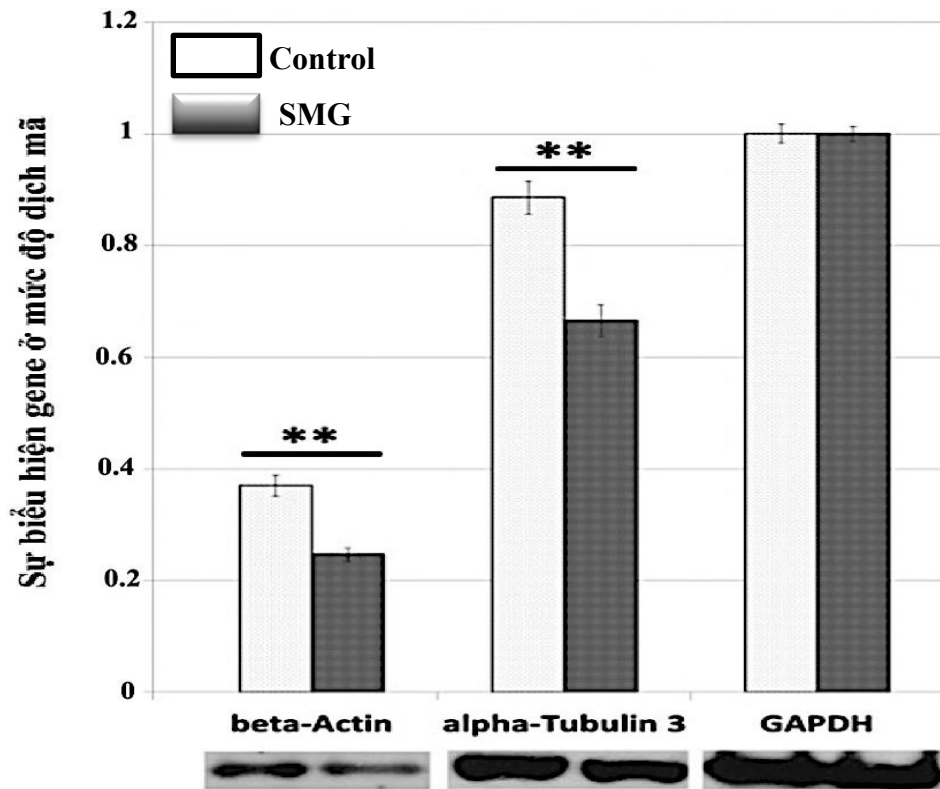


**Hình 3.18.** Kết quả biểu hiện mức phiên mã của gene  $\beta$ -actin bằng RT-PCR (Phụ lục 18). \*\* biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $P < 0.01$ ).

### 3.3.1.3. Biểu hiện các protein tham gia hình thành cấu trúc khung xương tế bào

Kết quả Western Blot đánh giá biểu hiện protein của  $\beta$ -Actin và  $\alpha$ -Tubulin 3 được thể hiện ở Hình 3.19. Theo đó, Kết quả phân tích western blot củng cố cho kết quả phân tích real time RT-PCR. Sự biểu hiện của  $\alpha$ -Tubulin 3 và  $\beta$ -Actin giảm ở cả mức phiên mã và dịch mã trong tế bào CCL-13 khi được cảm ứng điều kiện vi trọng lực mô phỏng. Điều đó cho thấy điều kiện vi trọng lực mô phỏng không chỉ ảnh hưởng đến sự biểu hiện gene  $\beta$ -Actin và  $\alpha$ -Tubulin 3, ảnh hưởng tới thành phần, hàm lượng tubulin actin có trong tế bào, từ đó làm thay đổi cấu trúc vi ống, vi sợi cũng như sự phân bố của các vi ống, vi sợi trong tế bào CCL-13.

Khung xương tế bào là một cấu trúc đặc biệt đóng góp vào ba chức năng, đó là tổ chức cấu trúc tế bào, hỗ trợ sự di chuyển và thay đổi hình dạng của tế bào, và điều chỉnh các tương tác giữa tế bào và môi trường tế bào [76]. Các tế bào bao gồm các vi ống, các sợi trung gian và các vi sợi, trong đó các vi ống và vi sợi rất cần thiết cho quá trình phân chia tế bào [138]. Các vi ống được hình thành do sự trùng hợp của tubulin. Trong quá trình phân chia tế bào, các vi ống hình thành các trục phân tách các chromatid chị em về hai tế bào [139]. Actin là một thành phần của vi sợi góp phần hình thành rãnh phân cắt trong quá trình phân chia tế bào [140]. Những thay đổi trong tổng hợp actin và tubulin có thể làm thay đổi quá trình trùng hợp và hình thành các vi sợi và vi ống. Trong nghiên cứu này, sự tổng hợp  $\beta$ -Actin và  $\alpha$ -Tubulin 3 bị giảm trong các tế bào CCL-13 nhóm SMG, cho thấy sự giảm hình thành các cấu trúc hỗ trợ cho quá trình phân chia tế bào. Do đó, sự điều hòa giảm của  $\beta$ -actin và  $\alpha$ -tubulin có thể dẫn đến sự ức chế sự tăng sinh của tế bào.



**Hình 3.19.** Phân tích sự biểu hiện các protein  $\alpha$ -Tubulin và  $\beta$ -actin bằng kỹ thuật western blot, cả 2 protein đều . \*\*biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa nhóm SMG so với nhóm đối chứng ( $P < 0.01$ ).

### 3.3.2. Thay đổi cấu trúc khung xương tế bào CCL-13 trong điều kiện vi trọng lực

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

Vi ống là các protein có hình dạng ống và là một thành phần của bộ xương tế bào. Chúng tham gia vào việc duy trì hình dạng của tế bào; nếu không có chúng, tế bào sẽ bị chèn ép bởi các tế bào lân cận của nó. Chúng cũng chịu trách nhiệm tổ chức bên trong tế bào và các chuyển động khác nhau trong tế bào, đặc biệt là sự chuyển động của các bào quan và thành phần nhỏ khác di chuyển từ vị trí này sang vị trí khác trong tế bào chất. Chức năng này làm cho các vi ống quan trọng đối với quá trình phân chia tế bào. Các vi ống hình thành bộ máy thoi vô sắc, giúp phân chia nhiễm sắc thể trực tiếp trong quá trình phân bào. Trong khi đó, vi sợi, một thành phần khác của bộ khung xương tế bào, là các protein dạng sợi được trải rộng khắp tế bào. Chúng có một vai trò nhỏ trong việc hỗ trợ hình dạng của tế bào và tổ chức bên trong của nó. Vi sợi đóng vai trò quan trọng trong các chuyển động của tế bào. Các vi sợi chịu trách nhiệm cho bất kỳ chuyển động nào mà tế bào tạo ra, chẳng hạn như hình dạng thay đổi, tế bào co lại hay tế bào di chuyển trên bề mặt. Ngoài ra trong quá trình phân chia tế bào, hệ thống vi sợi tham gia cấu trúc nên rãnh phân tách hỗ trợ phân chia tế bào, cũng như tham gia vận chuyển bào quan bằng các protein vận động dọc theo các bó vi sợi.

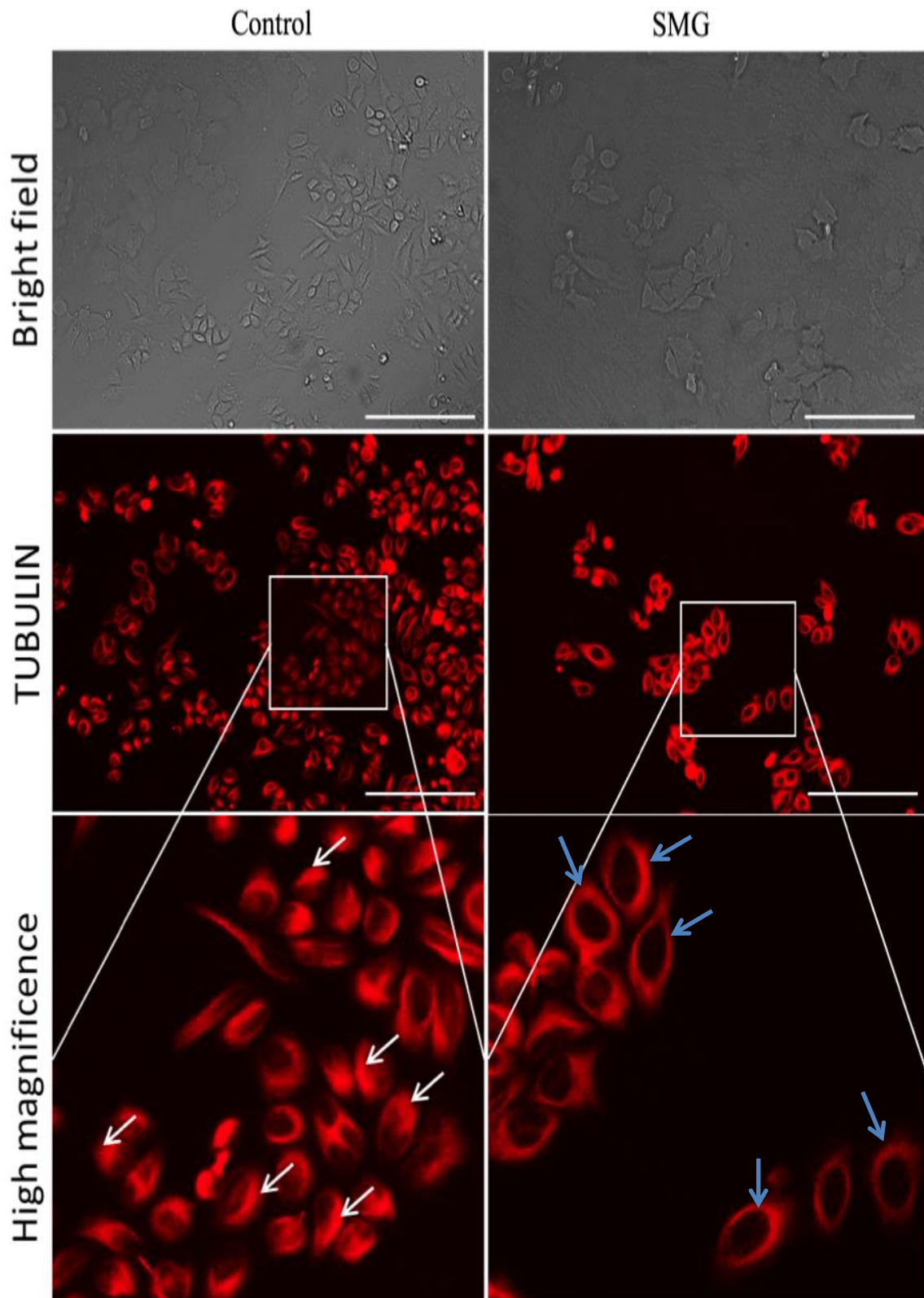
Chúng tôi đã tiến hành đánh giá sự phân bố của vi ống và vi sợi trong tế bào CCL-13 được nuôi cấy ở môi trường vi trọng lực so với điều kiện bình thường 1 g bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang protein vi ống Tubulin và vi sợi actin. Như đã thấy trong Hình 3.20, các sợi vi ống phân bố với mật độ dày hơn trong nhóm đối chứng so với ở nhóm vi trọng lực.

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

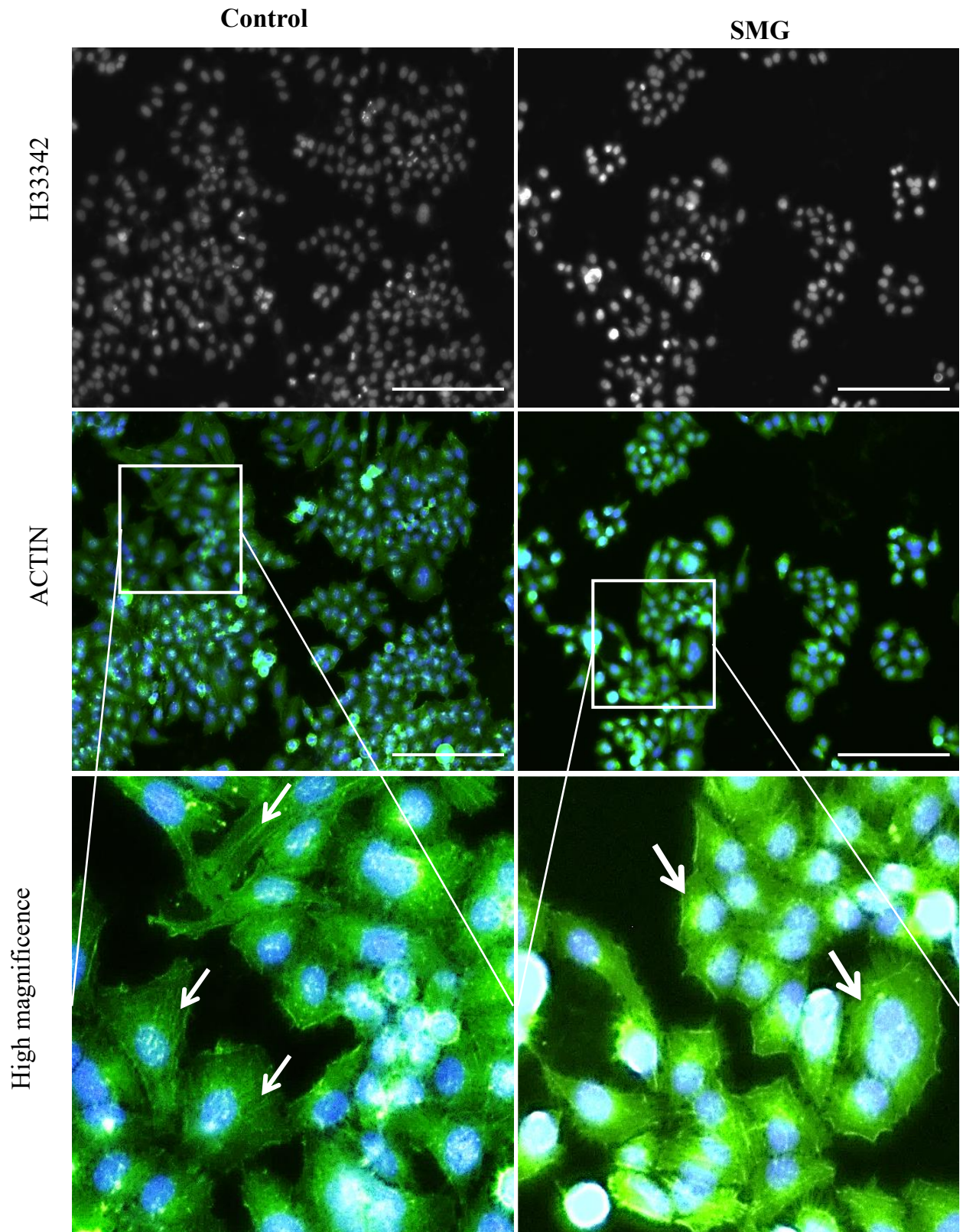
Kết quả nhuộm vi sợi actin ở Hình 3.21 cho thấy tế bào CCL-13 ở nhóm đối chứng có sự phân bố song song các bó vi sợi và kéo dài qua chiều dài tế bào. Trong nhóm vi trọng lực, vi sợi actin hiển thị với mật độ thấp hơn. Kết quả này cũng cho thấy các tế bào CCL-13 trong môi trường vi trọng lực có xu hướng mở rộng ra hình dạng tròn thay vì kéo dài.

Vi sợi Actin tham gia vào nhiều hoạt động quan trọng trong tế bào như vận động tế bào, phân chia nhân và tế bào chất trong nguyên phân, vận chuyển nội bào và các bào quan, tham gia vào con đường truyền tín hiệu và thiết lập duy trì hình dạng và chức năng tế bào. Các vi ống có liên quan đến sự vận chuyển nội bào, vận động và hình dạng tế bào [76]. Hình dạng tế bào và khung xương tế bào thay đổi trong điều kiện vi trọng lực. Hoạt động của nhân và tế bào là những quá trình diễn ra phụ thuộc vào các vi ống. Vi ống tạo thành một phần của tâm động, liên quan đến sự hình thành thoi vô sắc và co thắt màng tế bào trong quá trình phân chia tế bào [82].





**Hình 3.20.** Kết quả nhuộm protein Tubulin cấu thành nên vi ống của tế bào gan Chang (CCL-13). Hệ thống vi ống trong tế bào Chang có sự phân bố lệch nhân ở nhóm đối chứng (mũi tên trắng), trong khi đó hệ thống này có sự phân bố xung quanh nhân ở nhóm SMG (Mũi tên màu xanh). Thước đo = 223.64  $\mu\text{m}$ .



**Hình 3.21.** Kết quả nhuộm protein Actin cấu thành nên vi sợi actin của tế bào gan Chang (CCL-13) và mũi tên trắng chỉ các bó vi sợi kéo dài qua chiều dài tế bào ở nhóm đối chứng, trong khi nhóm SMG có sự phân bố thấp hơn nhiều. Thước đo = 223.64  $\mu\text{m}$ .

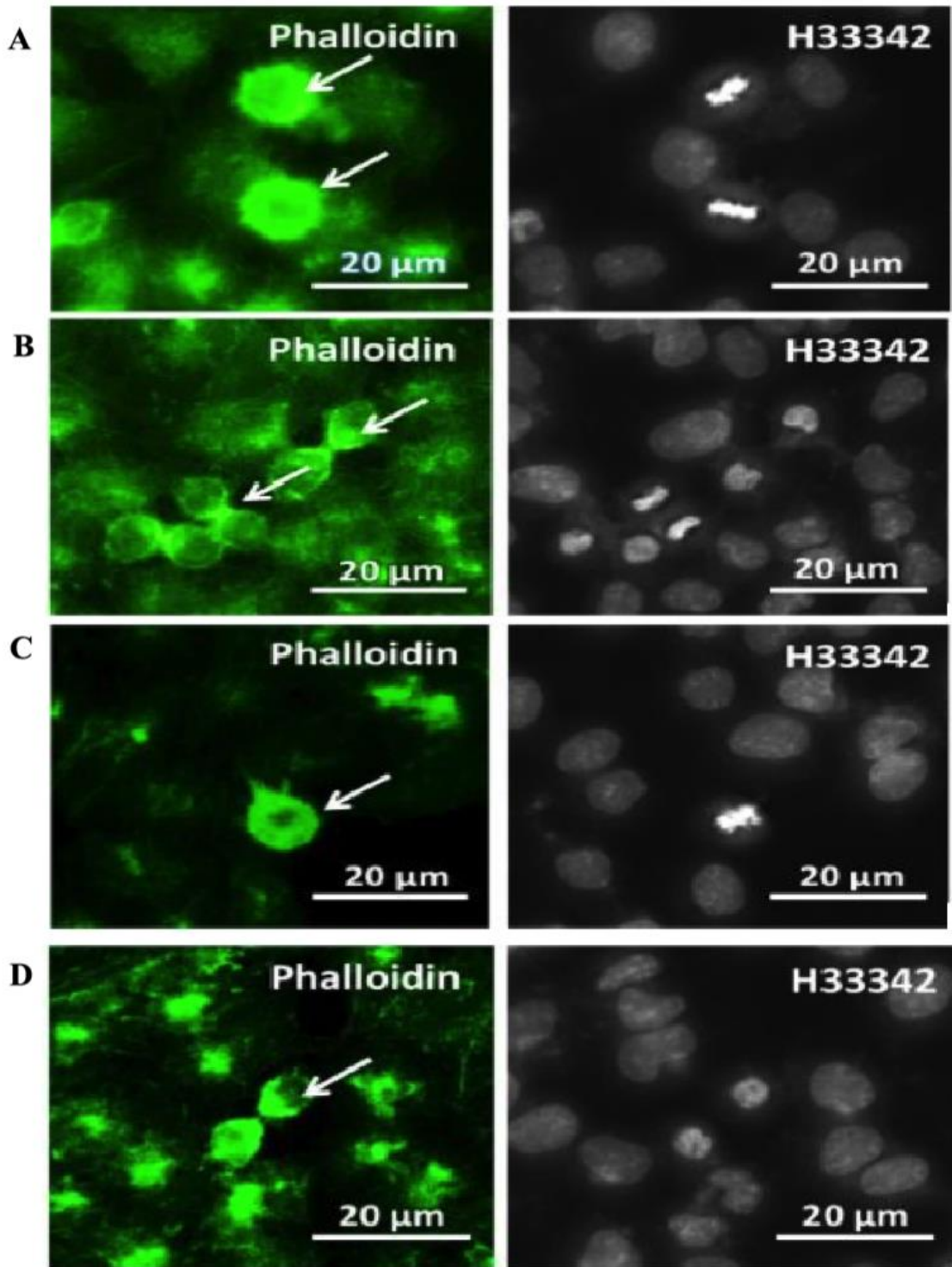
### 3.3.2.2. Sự thay đổi cấu trúc khung xương của tế bào CCL-13 trong quá trình phân bào

Khung xương tế bào đóng vai trò quan trọng trong việc xây dựng hình dạng và cấu trúc tế bào, hỗ trợ các chuyển động và góp phần vào sự tương tác của tế bào. Vi sợi và vi ống là hai thành phần cấu trúc chính của khung xương tế bào, rất cần thiết cho sự phân chia tế bào. Trong nguyên phân, vi ống kéo dài từ trung tử đến rìa tế bào, hình thành các thoi vô sắc phân tách nhiễm sắc thể trong tế bào con. Bên cạnh đó, vi sợi góp phần vào việc xây dựng rãnh phân tách trong quá trình nguyên phân. Trong nghiên cứu này, nhuộm vi sợi và vi ống được áp dụng để đánh giá tác động của tình trạng SMG đối với hai cấu trúc liên quan đến sự phân chia tế bào, bao gồm vòng co thắt và trục chính.

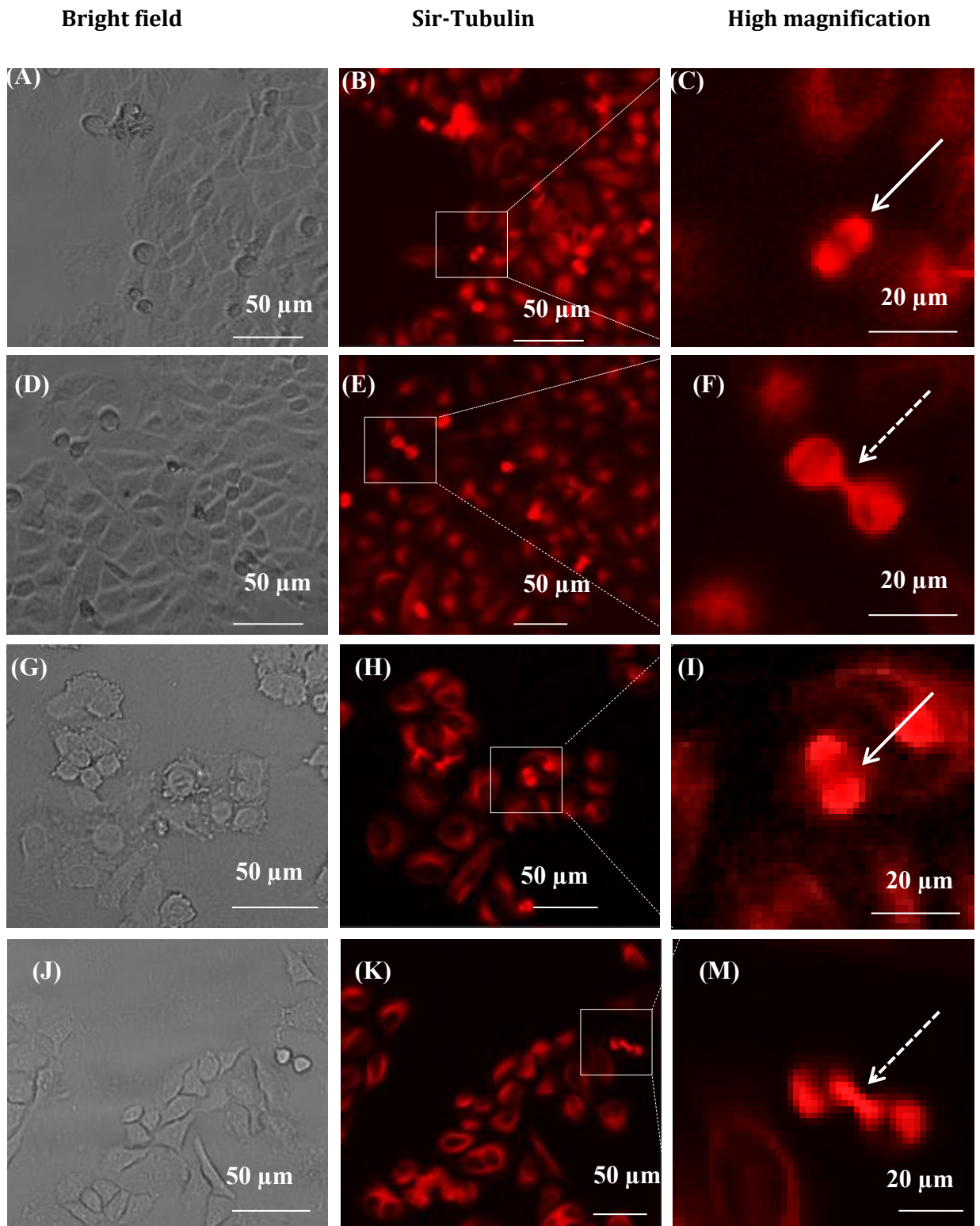
Kết quả nhuộm vi sợi như được hiển thị trong hình 3.22 cho thấy các tế bào CCL-13 từ nhóm đối chứng được làm tròn với hình dạng đỉnh trong quá trình nguyên phân và để lộ sự xuất hiện phong phú của các vi nhung mao (3.22A). Trong bước cuối cùng của quá trình phân chia tế bào, các tế bào CCL-13 thể hiện sự hình thành vòng co bóp, tạo ra lực co thắt để tách một tế bào thành hai tế bào chị em (Hình 3.22B). Sự xuất hiện của vi nhung mao cũng được phát hiện trong các tế bào CCL-13 từ nhóm SMG trong quá trình nguyên phân (Hình 3.22C) cũng như sự hình thành vòng hợp đồng trong các tế bào này trong quá trình phân bào (Hình 3.22D). Tuy nhiên, các tế bào CCL-13 được xử lý bằng SMG có cường độ vi sợi trong các cấu trúc này thấp hơn so với các tế bào đối chứng. Các tế bào CCL-13 từ cả hai nhóm cho thấy hình thái bình thường tương tự nhau mà không bị phân mảnh và ngưng tụ, đó là những đặc điểm của quá trình chết theo chương trình.

Kết quả nhuộm vi ống cũng chỉ ra rằng các tế bào CCL-13 trong nhóm đối chứng và nhóm SMG đều có sự hình thành trục chính bình thường trong quá trình nguyên phân (Hình 3.23A-B-C, Hình 3.23G-H-I). Tuy nhiên, khi quá trình phân bào diễn ra tiếp tục, các tế bào CCL-13 đối chứng hiển thị cấu trúc bình thường của các vi ống trục chính cực (Hình 3.23D-E-F) trong khi dạng bất thường của cấu trúc này được phát hiện trong các tế bào SMG CCL-13 (Hình 3.23J-K-M). Kết quả này cho thấy SMG đã ảnh hưởng đến sự hình thành cấu trúc của các vi ống trục chính cực trong quá trình phân chia tế bào.

Sự giảm biểu hiện của các protein cấu trúc khung xương tế bào là nguyên nhân dẫn đến sự giảm phân chia tế bào, đây cũng là nguyên nhân dẫn đến việc giảm tăng sinh của tế bào CCL-13 và làm thay đổi bất thường về cấu trúc tế bào CCL-13 khi quá trình phân chia tế bào diễn ra trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng.



**Hình 3.22.** Nhuộm vi sợi của các tế bào CCL-13. A: Sự xuất hiện của vòng và vi nhung mao trong các tế bào CCL-13 đối chứng; B: Sự hình thành vòng co bóp để tách một tế bào thành hai trong các tế bào CCL-13 đối chứng; C: Sự xuất hiện của vòng và vi nhung mao trong các tế bào CCL-13 trong điều kiện SMG; D: Sự hình thành vòng co bóp để tách một tế bào thành hai trong các tế bào CCL-13 trong điều kiện SMG. Các vi chất và hạt nhân lần lượt được thay thế bằng Phalloidin (màu xanh lá cây) và H33342. Mũi tên trắng mô tả sự hiện diện của vi nhung mao và hình ảnh vòng thắt giữa hai tế bào.



**Hình 3.23.** Nhuộm vi ống của các tế bào CCL-13: A-B-C: Quá trình nguyên phân bắt đầu và D-E-F là sự xuất hiện của trục xoay trong các tế bào CCL-13 đối chứng;

G-H-I: Quá trình nguyên phân bắt đầu và J-K-M là sự xuất hiện của trục chính trong các ô CCL-13 trong nhóm SMG. Mũi tên trắng mô tả sự hiện diện của thoi vô sắc (spindle) trong tế bào, mũi tên trắng đứt đoạn mô tả hình ảnh thoi vô sắc đầu cực (polar spindle) giữa hai tế bào.

Vi sợi và vi ống giảm biểu hiện cũng là nguyên nhân gây ức chế tăng sinh tế bào. Các gene điều hoà chu kỳ phân chia tế bào như Cyclin D1 và Cdk 4/6 góp phần vào việc tổ chức các sợi actin và vi ống [141, 142]. Một nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng tổ chức bộ xương tế bào được điều chỉnh bởi sự tương tác của Cdk6 với một số protein liên quan đến bộ xương tế bào [143]. Cdk6 góp phần điều hoà một nhóm gene liên quan đến quá trình trùng hợp (khử) actin [143]. Các tế bào thiếu Cdk6 đã được chứng minh là làm giảm sự hình thành F-actin, được polymer hóa để cấu tạo các vi sợi [143]. Trong nghiên cứu này, các tế bào CCL-13 do SMG gây ra cho thấy sự biểu hiện điều hoà của Cdk6, tương quan với sự giảm biểu hiện của  $\beta$ -actin và suy giảm sự hình thành vi sợi trong tế bào chất. Điều này làm giảm khả năng phân chia và chuyển động của tế bào.

Các tế bào động vật tròn lại và trở thành hình cầu khi chúng trải qua quá trình nguyên phân. Các tế bào xuất hiện các chóp trong suốt kỳ sau của quá trình phân bào và số lượng vi nhung mao được tăng lên rõ rệt [144]. Sự xuất hiện của các vi nhung mao và vòng co thắt lại cho thấy quá trình phân chia tế bào thường xảy ra ở các tế bào CCL-13 trong điều kiện SMG. Tuy nhiên, sự xuất hiện nhỏ này cho thấy rằng SMG gây ra sự thay đổi của các cấu trúc này trong các tế bào CCL-13. Hơn nữa, dạng bất thường của các vi ống trục chính của 2 cực đã được xác định ở các tế bào CCL-13 trong điều kiện SMG. Kết quả nghiên cứu này cho thấy rằng điều kiện SMG dẫn đến những thay đổi trong cấu trúc của vòng co thắt và các vi ống trục chính của 2 cực, góp phần vào quá trình phân bào.

Những kết quả nghiên cứu trên cho thấy sự ảnh hưởng nhất định của điều kiện vi trọng lực lên sự tăng sinh và sự hình thành cấu trúc bộ khung xương của tế bào gan Chang (CCL-13). Các kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu trên gan của động vật thí nghiệm trong các chuyến bay vũ trụ thực tế năm 2022 ngoài không gian. Nghiên cứu cho thấy điều kiện vi trọng lực đã gây tổn thương gan và viêm liên quan đến apoptosis và stress oxy hóa, làm thay đổi chuyển hóa carbohydrate ở gan dẫn đến khởi phát kiểu hình gây bệnh tiểu đường, làm thay đổi chuyển hóa lipid ở gan dẫn đến béo phì không do uống rượu hay bệnh gan [145].

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

Từ các kết quả của nghiên cứu cho thấy rằng các tế bào gan Chang (CCL-13) sau khi nuôi cấy 72h trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat), đã ảnh hưởng rõ đến khả năng tăng sinh của tế bào gan Chang (CCL-13). Mặc dù hình thái tế bào có hình dạng tương đối bình thường, không thay đổi rõ rệt, nhưng mật độ và sức sống của tế bào CCL-13 giảm hơn nhiều, kích thước tế bào cũng cao hơn. Đồng thời, trong điều kiện vi trọng lực mô phỏng đã làm giảm biểu hiện của các gene kiểm soát chu kỳ tế bào (Cyclin (A, B1, D1), CDK (2, 6)) làm cho các tế bào CCL-13 tăng cường đi vào pha nghỉ  $G_0/G_1$  và giảm tỉ lệ đi vào pha phân chia  $G_2/M$ , điều này chứng tỏ cơ chế tăng sinh của tế bào bị ức chế.

Sự ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat) lên sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào gan Chang (CCL-13) chưa thể hiện rõ ràng. Tuy kích thước nhân tế bào của tế bào CCL-13 có giảm, nhưng hình thái nhân tế bào thì vẫn bình thường, không có sự cô đặc nhiễm sắc chất và phân mảnh nhân. Đồng thời, tỉ lệ tế bào bị apoptosis lẫn sự biểu hiện của các gene Bcl-2 và Bax ở mức độ phiên mã, dịch mã của tế bào CCL-13 được nuôi trong điều kiện 3-D clinostat không có sự khác biệt về mặt thống kê so với các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện 1g.

Kết quả đánh giá sự thay đổi cấu trúc khung xương tế bào gan Chang (CCL-13) trong hệ thống vi trọng lực mô phỏng (3-D clinostat) lại biểu hiện rất rõ. Trong môi trường vi trọng lực, sự biểu hiện ở mức phiên mã và dịch mã của các gene  $\beta$ -actin và  $\alpha$ -tubulin đã giảm rõ rệt, vi sợi actin và vi ống hiển thị với mật độ thấp hơn, cường độ giảm và tế bào có xu hướng mở rộng ra hình dạng tròn. Hơn nữa, những thay đổi trong cấu trúc của vòng co bóp và các vi ống trục chính cực do điều kiện môi trường vi trọng lực gây ra đã ảnh hưởng quan trọng đến quá trình phân chia tế bào.

### KIẾN NGHỊ

Cần đánh giá thêm sự ảnh hưởng của SMG lên tế bào CCL-13 ở nhiều mốc thời gian nuôi cấy hơn và nghiên cứu sâu hơn về các quá trình chuyển hoá, các chức năng sinh lý của tế bào gan khi được nuôi cấy trong điều kiện vi trọng lực. Đồng thời, nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của điều kiện vi trọng lực đến chức năng của các cơ quan và đến toàn bộ cơ thể.

Cần nghiên cứu thêm trên nhiều dòng tế bào hơn để làm rõ cơ chế tác động của điều kiện vi trọng lực mô phỏng lên sự sinh trưởng của tế bào.

Nghiên cứu tiếp tục về các giải pháp và các loại thuốc giúp cải thiện các stress lên tế bào và sinh lý con người cũng như các sinh vật khác khi sống ngoài không gian.



**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

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

2. **Minh Thi Tran** <sup>1,2</sup> , Chung Chinh Doan <sup>2,3</sup> , Son Nghia Hoang <sup>2,3</sup> , Cang Ngoc Ly <sup>3</sup> , Mai Thi Phuong Nguyen <sup>4</sup> , Quan Minh To<sup>5</sup> , Nhung Hai Truong<sup>5</sup> , Chi Nguyen Quynh Ho <sup>2,3,\*</sup> and Long Thanh Le <sup>2,3,\*</sup>. The changes in the cell division of Chang liver cells induced by simulated microgravity. *Appl. Sci.* 2023, 13, x. <https://doi.org/10.3390/app13137351>

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Elizabeth Blaber, Kevin Sato, and Eduardo A.C. Almeida, 2014, Stem Cell Health and Tissue Regeneration in Microgravity, *Stem Cells and Development*, Vol. 23, pp. 73 – 78.
- [2] M. Bizzarri, M. Monici, J.J.W.A. van Loon, 2015, How Microgravity Affects the Biology of Living Systems, *BioMed Res. Int.*, 863075, 1-4.
- [3] Hensel W., Sievers A., 1980, Effects of prolonged omnilateral gravistimulation on the ultrastructure of statocytes and on the graviresponse of roots, *Planta*, 150: 338-46.
- [4] United Nations, 2013, Teacher’s Guide to Plant Experiments in Micro-g. Programme on Space Applications, UNOOSA, New York. 45 p.
- [5] Melissa Palma-Jiménez, Yendry Corrales Ureña, Carlos Villalobos Bermúdez, José Roberto Vega Baudrit. 2017, Microgravity and Nanomaterials, *International Journal of Biophysics*, 7(4): 60-68.
- [6] Svejgaard B, Wehland M, Ma X, Kopp S, Sahana J, Warnke E, 2015, Common Effects on Cancer Cells Exerted by a Random Positioning Machine and a 2D Clinostat, *PLoS ONE*, 10(8): e0135157.
- [7] Klaus D., 2001, Clinostats and bioreactors. *Gravit Space Biol Bull*, 14: 55-64.
- [8] Herranz R., Anken R., Boonstra J., 2013, Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology, *Astrobiology*, 13: 1-17.
- [9] Schwarz R., Goodwin T., Wolf D., 1992, Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity, *J Tissue Cult methods*, 14: 51-7.
- [10] Li X., Anken R., Wang G., Hilbig R., Liu Y., 2011, Effects to wall vessel rotation on the growth of larval zebrafish inner ear otoliths, *Microgravity Sci Technol*, 23:3-10.
- [11] Moorman S., Burrell C., Cordova R., Slater J., 1999, Stimulus dependence of the development of the zebrafish (*Danio rerio*) vestibular system, *J Neurobiol*, 38: 247-58.
- [12] Brungs S., Hauslage J., Hemmersbach R., Hilbig R., Anken R., 2011, Effects of stimulated weightlessness on fish otolith growth: Clinostat versus rotating-wall vessel. *Adv Space Res*, 48: 792-8.
- [13] Becker J. L. and Souza G. R., 2013, Using space-based investigations to inform cancer research on Earth, *Nature Reviews Cancer*, 13: 315-327.

- [14] Van Loon J., 2007, Some history and use of the Random Positioning Machine, RPM, in gravity related research, *Adv Space Res*, 39: 1161-5.
- [15] Pardo SJ, Patel MJ, Sykes MC, Platt MO, Boyd NL, Sorescu GP & Jo H, 2005, Simulated microgravity using the Random Positioning Machine inhibits differentiation and alters gene expression profiles of 2T3 preosteoblasts, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(6):1211-1221.
- [16] Simon L. Wuest, Stéphane Richard, Marcel Egli, 2015, Simulated Microgravity: Critical Review on the Use of Random Positioning Machines for Mammalian Cell Culture, *Biomed Research International*, 971474.
- [17] Russomano, T., 2008, The Effects of Hypergravity and Microgravity on Biomedical Experiments, *Synthesis lectures on Biomedical*, 1930-0328, 18(1).
- [18] Michael R. Benoit, David M. Klaus, 2007, Microgravity, bacteria, and the influence of motility, *Advances in Space Research, Elsevier*, Volume 39, Issue 7, Pages 1225-1232.
- [19] Eiermann P., Kopp S., Hauslage J., Hemmersbach R., Gerzer R., Ivanova K., 2013, Adaptation of a 2-D clinostat for simulated microgravity experiments with adherent cells, *Microgravity Sci. Technol*, 25, 153–159.
- [20] Erin Hall, 2017, Case Study: The Notorious Chang Liver. *ICLAC Case Study: Chang Liver*, Version 1.3.
- [21] Yulan Wang, Lili An, Yuanda Jiang, Haiying Hang, 2011, Effects of Simulated Microgravity on Embryonic Stem Cells, *Plos one*, 11.
- [22] Miss Shivani Sharma, 2012, Effect of microgravity on living system, *IOSR Journal of Pharmacy*, Volume 2 Issue 5, PP. 01-07.
- [23] Caterina Morabito, Simone Guarnieri, Alessandra Cucina, 2020, Antioxidant Strategy to Prevent Simulated Microgravity-Induced Effects on Bone Osteoblasts, *Int. J. Mol. Sci.* 21(10), 3638.
- [24] Cui Zhang, Liang Li, Jianling Chen and Jinfu Wang, 2015, Behavior of stem cells under outer-space microgravity and ground-based microgravity simulation, *Cell Biology International*, ISSN 1065-6995.
- [25] Tuo Zhao, Xin Tang, Channakeshava, Sokke Umeshappa, 2016, Simulated Microgravity Promotes Cell Apoptosis Through Suppressing Uev1A/TICAM/TRAF/NF- $\kappa$ B-Regulated Anti-Apoptosis and p53/PCNA- and ATM/ATR-Chk1/2-Controlled DNA-Damage Response Pathways, *Journal of cellular biochemistry*, 2138-2148.

- [26] M. Janmaleki, M. Pachenari, S. M. Seyedpour, 2016, Impact of Simulated Microgravity on Cytoskeleton and Viscoelastic Properties of Endothelial Cell, *Sci Rep*, 6: 32418.
- [27] Tommaso Bonfiglio, Federico Biggi, Anna Maria Bassi, Sara Ferrando, Lorenzo Gallus, Fabrizio Loiacono, and Maria A. Masini, 2019, Simulated microgravity induces nuclear translocation of Bax and BCL-2 in cultured C6 cells, *Heliyon*, Volume 5, Issue 6, e01798.
- [28] Chen B, Guo J, Wang S, Kang L, Deng Y, Li Y, 2018, Simulated Microgravity Altered the Metabolism of Loperamide and the Expression of Major Cytochrome P450 in Liver of Rats, *Front. Pharmacol*, 9, 1130.
- [29] Beheshti A, Chakravarty K, Fogle H, Fazelinia H, Silveira WAD, Boyko V, and Costes SV, 2019, Multi-omics analysis of multiple missions to space reveal a theme of lipid dysregulation in mouse liver, *Sci., Rep.* 9, 19195.
- [30] Hoang Nghia Son, Ho Nguyen Quynh Chi, Le Ngoc Phuong Thanh, Truong Thi Han, Nguyen Thai Minh Han, Doan Chinh Chung, Le Thanh Long, 2020, Effects of simulated microgravity on the morphology of mouse embryonic fibroblasts (MEFs), *Rom Biotechnol Lett*, 25(6): 2156-2160.
- [31] Truong Xuan Dai, Hoang Nghia Son, Ho Nguyen Quynh Chi, Hoang Nghia Quang Huy, Nguyen Thai Minh, Nguyen Thi Thuy Tram,...and Le Thanh Long, 2021, Simulated Microgravity Induces the Proliferative Inhibition and Morphological Changes in Porcine Granulosa Cells, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 43, 2210–2219.
- [32] Ho Nguyen Quynh Chi, Hoang Nghia son, Doan Chinh Chung, Le Dinh Huan, Tran Hong Diem, Le Thanh Long, 2020, Simulated Microgravity Reduces Proliferation and Reorganizes the Cytoskeleton of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells, *Physiol. Res.*, 69: 897-906.
- [33] Aihua Sun, Ying Jiang, Xue Wang, Qijun Liu, Fan Zhong, Quanyuan He, Wei Guan, Hao Li, Yulin Sun,... and Fuchu He, 2010, Liverbase: A Comprehensive View of Human Liver Biology, *J. Proteome Res*, 9, 1, 50–58.
- [34] S L Friedman, 2000, Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury, *J Biol Chem*, Jan 28;275(4):2247-50.
- [35] Herrmann, J.; Gressner, A.M.; Weiskirchen, R., 2007, Immortal hepatic stellate cell lines: Useful tools to study hepatic stellate cell biology and function?, *J. Cell. Mol. Med.* 11, 704–722.

- [36] Serras, A.S., Rodrigues, J.S., Cipriano, M., Rodrigues, A.V., Oliveira, N.G., Miranda, J.P., 2021, A critical perspective on 3D liver models for drug metabolism and toxicology studies, *Front. Cell Dev. Biol.*, 9, 626805.
- [37] Tabernilla, A., Dos Santos Rodrigues, B., Pieters, A., Caufriez, A., Leroy, K., Van Campenhout, R., Cooreman, A., Gomes, A.R., Arnesdotter, E., Gijbels, E., 2021, In vitro liver toxicity testing of chemicals: A pragmatic approach, *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 5038.
- [38] Ralf Weiskirchen, 2022, Established Liver Cell Lines: Are You Sure to Have the Right Ones?, *Livers*, 2(3), 171-177.
- [39] Martin EA, Hine R., 2008, A dictionary of biology (6th ed.), *Oxford: Oxford University Press*, ISBN 9780199204625, OCLC 176818780.
- [40] Cooper GM., 2000, *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edition, Sunderland (MA): Sinauer Associates, The Development and Causes of Cancer.
- [41] Smith JA, Martin L., 1973, Do cells cycle?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70 (4): 1263–7.
- [42] Wu RS, Bonner WM., 1981, Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells, *Cell*, 27 (2 Pt 1): 321–30.
- [43] Nelson DM, Ye X, Hall C, Santos H, Ma T, Kao GD, 2002, Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity, *Molecular and Cellular Biology*, 22 (21): 7459–72.
- [44] Campbell, N. and Reece, J., 2001, *The Cell Cycle*, Biology (6th ed.), ISBN 0-8053-6624-5, 217–224.
- [45] Maton A, Lahart D, Hopkins J, Warner MQ, Johnson S, Wright JD., 1997, Cells: Building Blocks of Life, *New Jersey: Prentice Hall*, pp. 70–4.
- [46] Anders L, Ke N, Hydbring P, Choi YJ, Widlund HR, Chick JM & Sicinski P., 2011, A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells, *Cancer cell*, 20(5):620-634.
- [47] Campaner S, Doni M, Hydbring P, Verrecchia A, Bianchi L, Sardella D & Amati B., 2010, Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene, *Nature cell biology*, 12(1):54-59.
- [48] Hydbring P, Malumbres M & Sicinski P., 2016, Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases, *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(5):280-292.

- [49] Kollmann K, Heller G, Schneckenleithner C, Warsch W, Scheicher R, Ott RG & Sexl V., 2013, A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis, *Cancer cell*, 24(2):167-181.
- [50] Morgan, David Owen (2007), *The cell cycle: principles of control*. London: New Science Press. 978-0-19-920610-0. OCLC 70173205.
- [51] Shivani Sharma, 2012, Effect of microgravity on living system, *IOSR Journal of Pharmacy*, Vol 2(5), page 1-7.
- [52] Simon L. Wuest, Stéphane Richard, Marcel Egli, 2015, Simulated Microgravity: Critical Review on the Use of Random Positioning Machines for Mammalian Cell Culture, *Biomed Research International*, 971474.
- [53] Doolan E.J., Geldziler B., Strande L., Kain M. and Hewitt C., 1999, Effects of Microgravity on Growing Cultured Skin Constructs, *Tissue Engineering*, Vol 5(6), page 573-582.
- [54] Kacena M.A., Todd P. and Landis W.J., 2004, Osteoblasts subjected to spaceflight and simulated space shuttle launch conditions, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, Vol 39(10), page 454-459.
- [55] Sherr, C. J. Roberts, J. M., 2004, Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases, *Genes Dev.*, 18, 2699-2711.
- [56] Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B., 2011, *The cell cycle*. In *Campbell biology (10th ed.)*, San Francisco, CA: Pearson, 244.
- [57] Rui L., 2014, Energy metabolism in the liver, *Compr. Physiol*, 4, 177–197.
- [58] Yang T, Li C, Zhang L, Li M, Zhou P., 2013, A Promising Hepatocyte-Like Cell Line, CCL-13, Exhibits Good Liver Function Both In Vitro and in an Acute Liver Failure Model, *Transplant. Proc*, 45, 688–694.
- [59] Norbury CJ, Hickson ID, 2001, Cellular responses to DNA damage, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41:367–401.
- [60] Green, Douglas, 2011, *Means To An End*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 978-87969-888-1.
- [61] Alberto M. Martelli, Marina Zweyer, Robert L. Ochs, Pier Luigi Tazzari, Giovanna Tabellini, Paola Narducci, Roberta Bortul, 2001, Nuclear Apoptotic Changes: An Overview, *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol 82, pp. 634 – 646.
- [62] Douglas R., 2015, Green and Fabien Llambi. Cell Death Signaling, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol 7(12).

- [63] Camilla Krakstad and Martha Chekenya, 2010, Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: Opportunities for targeted therapeutics. *Molecular Cancer*, Vol 9 (135).
- [64] Chidananda S. Sharma, Shubhashish Sarkar, Adaikkappan Periyakaruppan, 2008, Simulated microgravity activates apoptosis and NF-kappaB in mice testis, *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol 313(1-2), page 71-78.
- [65] Chun Yan Kang, Lin Zou, Ming Yua, Yang Wang, 2010, Impact of simulated microgravity on microvascular endothelial cell apoptosis, *European Journal of Applied Physiology*, Vol 111(9), page 2131-2138.
- [66] Daniela Grimm, Johann Bauer, Peter Kossmehl, 2002, Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells, *The FASEB Journal*, Vol 16(6), page 604-606.
- [67] Hardin J, Bertoni G, Kleinsmith LJ., 2015, *Becker's World of the Cell (8th ed.)*, New York: Pearson, pp. 422–446.
- [68] McKinley, Michael, Dean O'Loughlin, Valerie, Pennefather-O'Brien, Elizabeth, Harris, Ronald, 2015, *Human Anatomy (4th ed.)*, New York: McGraw Hill Education, p. 29.
- [69] Machesky L. M., 1999, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp 2/3 complex, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96: 3739–3744.
- [70] Weiner O. D., Marganski W. A., Wu L. F., Altschuler S. J., Kirschner M. W., 2007, An actin-based wave generator organizes cell motility, *PLoS Biol*, 5: e221.
- [71] Bieling P., 2007, Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro, *Nature*, 450:1100–1105.
- [72] Doherty GJ, McMahon HT., 2008, Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions, *Annual Review of Biophysics*, 37: 65–95.
- [73] Allott, A., Mindorf, D., 2014, *Biology Course Companion*. Oxford UP, 1-51.
- [74] Pollard T. D, Borisy G. G., 2003, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, *Cell*, 112:453–465.
- [75] Fletcher DA, Mullins RD., 2010, Cell mechanics and the cytoskeleton, *Nature*, 463, 485–492.
- [76] Bretscher. M.S., 1996, Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells, *Cell*, Vol 87 (4), p. 601 – 6.
- [77] Janmey, P.A., 1998, The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling, *Physiol Rev*, 78(3): p. 763-81.

- [78] Mostowy and P. Cossart., 2012, Septins: the fourth component of the cytoskeleton, *Nat. Rev. Mol, Cell Biol*, 13:183–194.
- [79] Ingber D. E.. Tensegrity I., 2003, Cell structure and hierarchical systems biology. *J. Cell Science*, 116:1157-1173.
- [80] Flusberg D. A., Numaguchi Y. and Ingber D.E., 2001, Cooperative Control of Akt Phosphorylation, bcl-2 Expression and Apoptosis by Cytoskeletal Microfilaments and Microtubules in Capillary Endothelial Cells, *Molecular Biology of the Cell*, 12: 3087–3094.
- [81] Kline-Smith S. L. and Waczak C. E., 2004, Mitotic Spindle Assembly and Chromosome Segregation: Refocusing on Microtubule Dynamics *Mol, Cell*, 15:317-327.
- [82] Maiato H., Sampaio P. and Sunkle C. E., 2004, Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis, *Int. Review Cytol*, 241: 53-153.
- [83] Glade N., Demongeot J. and Tabony J., 2004, Microtubule self-organisation by reaction-diffusion processes causes collective transport and organization of cellular particles, *BMC Cell Biology*, 3:1-10.
- [84] Vassy J., Portet S., Beil M., Millot G., Fauvel-Lafève F., Gasset G. and Schoevaert D., 2003, Weightlessness Acts on Human Breast Cancer Cell Line MCF-7, *Adv. Space Res*, 32: (8):1595-1603.
- [85] Hammond T. G., Benes E., O'Reilly K. C., Wolf D. A., Linnehan R. M., Taher A., and Goodwin T. J., 2000, Mechanical culture conditions effect gene expression: gravity-induced changes on the space shuttle, *Physiol Genomics*, 3:(3): 163-173.
- [86] Papaseit C., Pochon N. and Tabony J., 2000, Microtubule self-organization is gravity-dependent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8:(97):(15): 8364-8368.
- [87] Bradbury P, Wu H, Choi JU, Rowan AE, Zhang H, Poole K, Lauko J and Chou J., 2020, Modeling the Impact of Microgravity at the Cellular Level: Implications for Human Disease, *Front. Cell Dev. Biol.*, 8:96.
- [88] Portet S. and Tuszynski J. A., 2003, Models of spatial and orientational self-organization of microtubules under the influence of gravitational fields, *Physical Review E*, 68, 021903- (1-9).
- [89] Gruener R., Roberts R. and Reistetter R., 1994, Reduced receptor aggregation and altered cytoskeleton in cultured myocytes after space-flight, *Biological Sciences in Space*, 8:(4):79-93.
- [90] Brodland G. W. and Gordon R., 1990, Intermediate filaments may prevent buckling of compressively-loaded microtubules, *J. Biomech*, 112 (3): 319-321.



- [91] Morey-Holton, E. R., 2003, The impact of gravity on life. In: Rothschild LJ, Lister AM (eds) *Evolution on Planet Earth: The Impact of the Physical Environment*, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 143-146.
- [92] Mann V, Grimm D, Corydon TJ, Krüger M, Wehland M, Riwaldt S, and Sundaresan A., 2019, Changes in Human Foetal Osteoblasts Exposed to the Random Positioning Machine and Bone Construct Tissue Engineering, *Int. J. Mol. Sci.*, 20, E1357.
- [93] Versari, S., 2007, Alterations of the actin cytoskeleton and increased nitric oxide synthesis are common features in human primary endothelial cell response to changes in gravity, *Biochim Biophys Acta*, Vol 1773 (11), pp. 1645 – 52.
- [94] Maiato H., Sampaio P. and Sunkle C.E., 2004, Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis, *Int. Review Cytol*, 241: 53-153.
- [95] Kline-Smith S.L. and Waczak C.E., 2004, Mitotic Spindle Assembly and Chromosome Segregation: Refocusing on Microtubule Dynamics, *Mol. Cell*, 15:317-327.
- [96] Ruden, D. M., Bolnick, A., and Puscheck, E. E., Rappolee, D. A., 2018, Effects of Gravity, Microgravity or Microgravity Simulation on Early Mammalian Development, *Stem Cells Dev*, 27(18), 1230-1236.
- [97] Carvil, P., Baptista, R., Russomano, T., 2013, The human body in a microgravity environment: Long term adaptations and countermeasures, *Aviat. Focus*, 4(1), 10-22.
- [98] Radtke, A. L., Herbst-Kralovetz, 2012, Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models, *J. Vis. Exp*, 62, 3868.
- [99] Kim, Y. J., Jeong, A. J., Kim, M., 2017, Time-averaged simulated microgravity (taSMG) inhibits proliferation of lymphoma cells, L-540 and HDLM-2, using a 3D clinostat, *BioMed Eng OnLine*, 16, 48.
- [100] Brungs, S., Hauslage, J. & Hemmersbach, R., 2019, Validation of Random Positioning Versus Clinorotation Using a Macrophage Model System, *Microgravity Sci. Technol*, 31, 223–230.
- [101] Griffoni C, Di Molfetta S, Fantozzi L, Zanetti C., 2011, Modification of proteins secreted by endothelial cells during modeled low gravity exposure, *J Cell Biochem*, 112(1): 265-272.
- [102] Olga Lucia Morales, 2002, Identification of *Toxocara canis* antigen by Western Blot in experimentally infected rabbits, *Rev. Inst. Med.trop. S. Paulo*, 44 (4):213 – 216.

- [103] Kim YJ, Jeong AJ, Kim M, Lee C, Ye SK, Kim S, 2017, Time-averaged simulated microgravity (taSMG) inhibits proliferation of lymphoma cells, L-540 and HDLM-2, using a 3D clinostat, *BioMed. Eng*, OnLine 16, 48.
- [104] Livak KJ, Schmittgen TD., 2001, Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method, *Methods*, 25 (4):402-408.
- [105] Logan, Julie; Edwards, Kirstin & Saunders, Nick, 2009, *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, Caister Academic Press, ISBN 978-1-904455-39-4.
- [106] Lu, JW., Lin, YM., Chang, JG., 2013, Clinical implications of deregulated CDK4 and Cyclin D1 expression in patients with human hepatocellular carcinoma, *Med Oncol*, 30, 379.
- [107] Son, H.N., Chi, H.N.Q., Chung, D.C. and Long, L.T., 2019, Morphological changes during replicative senescence in bovine ovarian granulosa cells, *Cell Cycle*, 18(13): 1490-1497.
- [108] Tessari MA, Gostissa M, Altamura S, 2003, Transcriptional activation of the cyclin A gene by the architectural transcription factor HMGA2, *Mol Cell Biol*, 23(24):9104-9116.
- [109] Gorgogietas V. A., Tsialtas I., Sotiriou N., Laschou V. C., Karra A. G., Leonidas D. D., and Psarra A. G., 2018, Potential interference of aluminum chlorohydrate with estrogen receptor signaling in breast cancer cells, *J. Mol. Biochem*, 7, 1–13.
- [110] 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.
- [111] Plett P., Abonour R., Frankovitz S., Orschell C., 2004, Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells, *Ep Hematol*, 32: 773-81.
- [112] 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.
- [113] Touchstone H, Bryd R, Loiate S, Thompson M, Kim S, Puranam K, and Uzer G, 2019, Recovery of stem cell proliferation by low intensity vibration under simulated microgravity requires LINC complex, *NPJ Microgravity*, 5, 11.

- [114] Dinarelli, S., Longo, G., Dietler, G., Francioso, A., Mosca, L., Pannitteri, G., and Girasole, M., 2018, Erythrocyte's aging in microgravity highlights how environmental stimuli shape metabolism and morphology, *Sci. Rep*, 8(1) : 5277.
- [115] Kalaszczynska I., Geng Y, Iino T, Mizuno S, Choi Y, Kondratiuk I, and Sicinski P., 2009, Cyclin A is redundant in fibroblasts but essential in hematopoietic and embryonic stem cells, *Cell*, 138, 352–36.
- [116] Arsic N, Bendris N, Peter M, Begon-Pescia C, Rebouissou C, Gadéa G, and Blanchard JM., 2012, A novel function for Cyclin A2: control of cell invasion via RhoA signaling, *J. Cell. Biol*, 196, 147–162.
- [117] Loukil A, Cheung CT, Bendris N, Lemmers B, Peter M, Blanchard JM., 2015, Cyclin A2: At the crossroads of cell cycle and cell invasion, *World J. Biol. Chem*, 6, 346–350.
- [118] Tigan AS, 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.
- [119] Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC., 1999, Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1, *Cell*, 98, 859–869.
- [120] Huang X, Di Liberto M, Jayabalan D, Liang J, Ely S, Bretz J, and Chen-Kiang S., 2012, Prolonged early G(1) arrest by selective CDK4/CDK6 inhibition sensitizes myeloma cells to cytotoxic killing through cell cycle-coupled loss of IRF4, *Blood*, 120, 1095–1106.
- [121] Diril, M.K., Ratnacaram, C.K., Padmakumar, V.C., Du, T., Wasser, M., Coppola, V., Tessarollo, L., Kaldis, P., 2012, Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration, *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 3826-3831.
- [122] Szmyd, R., Niska-Blakie, J., Diril, M.K., Nunes, P.R., Tzelepis, K., Lacroix, A., van Hul, N., Deng, L.W., 2019, Premature activation of Cdk1 leads to mitotic events in S phase and embryonic lethality, *Oncogen*, 38, 998-1018.
- [123] Caldez, M.J., Bjorklund, M., Kaldis, P., 2020, Cell cycle regulation in NAFLD: when imbalanced metabolism limits cell division, *Hepatol Int*, 14, 463-474.
- [124] Pack, L.R., Daigh, L.H., Chung, M., Meyer, T., 2021, Clinical CDK4/6 inhibitors induce selective and immediate dissociation of p21 from cyclin D-CDK4 to inhibit CDK2, *Nat Commun*, 12, 3356.

- [125] De Boer, L., Oakes, V., Beamish, H., Giles, N., Stevens, F., Somodevilla-Torres, M., Desouza, C., Gabrielli, B., , 2008, Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events, *Oncogene*, 27, 4261-4268.
- [126] Zhan, Q.M., Wang, L.H., Song, Y.M., Ou, Y.W., Jiang, J., Fan, J., Wang, J.B., 2012, *Chapter 18 - Esophageal Carcinoma, In Recent Advances in Cancer Research and Therapy*, 1st ed., Elsevier: USA, pp 493-534.
- [127] Pollard, T.D.; Earnshaw, W.C.; Lippincott-Schwartz, J.; Johnson, G.T., 2017, *Chapter 43 - G2 Phase, Responses to DNA Damage, and Control of Entry Into Mitosis, In Cell Biology*, 3rd ed., Elsevier: UK, pp 743-754.
- [128] Nakaseko Y, Yanagida M., 2001, Cytoskeleton in the cell cycle, *Nature*, 412, 291–292.
- [129] Gioia, M., Michaletti, A., Scimeca, M., Marini, M., Tarantino, U., Zolla, L. and Coletta, M., 2018, Simulated microgravity induces a cellular regression of the mature phenotype in human primary osteoblasts, *Cell Death Discov*, 4: 59.
- [130] Kapitonova, M.Y., Salim, N., Othman, S., Muhd Kamauzaman, T.M., Ali, A.M., Nawawi, H.M. and Froemming, G.R., 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 Pathol*, 35(2) : 153-163.
- [131] Miettinen, T.P.; Kang, J.H.; Yang, L.F.; Manalis, S.R., 2019, Mammalian cell growth dynamics in mitosis, *Elife*, 8, e44700.
- [132] Way, G.P., Kost-Alimova, M., Shibue, T., Harrington, W.F., Gill, S., Piccioni, F., Becker, T., Shafqat-Abbasi, H., 2021, Predicting cell health phenotypes using image-based morphology profiling, *Mol Biol Cell*, 32, 995-1005.
- [133] Worthington, D.H., Salamone, M., Nachtwey, D.S., 1976, Nucleocytoplasmic ratio requirements for the initiation of DNA replication and fission in Tetrahymena, *Cell Tissue Kinet*, 9, 119-130.
- [134] Habela, C. W.; Sontheimer, H., 2007, Cytoplasmic volume condensation is an integral part of mitosis, *Cell Cycle*, 6, 1613-1620.
- [135] Ji P, Agrawal S, Diederichs S, Bäumer N, Becker A, Cauvet T, and Müller-Tidow C., 2005, Cyclin A1, the alternative A-type cyclin, contributes to G1/S cell cycle progression in somatic cells, *Oncogene*, 24, 2739–2744.
- [136] Nakamura H., Kumei Y., Morita S., Shimokawa H., Ohya K., Shinomiya K, 2013, Suppression of osteoblastic phenotypes and modulation of pro- and anti-

- apoptotic features in normal human osteoblastic cells under a vector-averaged gravity condition, *J Med Dent Sci*, 50: 167-76.
- [137] Sarkar D., Nagaya T., Koga K., Nomura Y., Gruener R., Seo H., 2000, Culture in vector-averaged gravity under clinostat rotation results in apoptosis of osteoblastic ROS 17/2.8 cells, *J Bone Res*, 15: 489-98.
- [138] Cohen-Fix O., 2000, Sister chromatid separation: Falling apart at the seams, *Curr. Biol*, 10, R816-R819.
- [139] Spira F, Cuylen-Haering S, Mehta S, Samwer M, Reversat A, Verma A, and Gerlich DW., 2017, Cytokinesis in vertebrate cells initiates by contraction of an equatorial actomyosin network composed of randomly oriented filaments, *Elife*, 6, e30867.
- [140] Zhong Z, Yeow WS, Zou C, Wassell R, Wang C, Pestell RG, and Quong AA., 2010, Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells, *Cancer Res*, 70, 2105-2114.
- [141] Bendris N, Lemmers B, Blanchard JM., 2015, Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors, *Cell Cycle*, 14, 1786–1798.
- [142] Uras IZ, Scheicher RM, Kollmann K, Glösmann M, Prchal-Murphy M, Tigan AS, and Sexl V., 2017, Cdk6 contributes to cytoskeletal stability in erythroid cells, *Haematologica*, 102, 995–100.
- [143] Taubenberger, A.V., Baum, B., Matthews, H.K., 2020, The Mechanics of Mitotic Cell Rounding, *Front Cell Dev Biol*, 8, 687.
- [144] Sanger, J.M.; Reingold, A.M.; Sanger, J.W., 1984, Cell surface changes during mitosis and cytokinesis of epithelial cells, *Cell Tissue Res*, 237, 409-417.
- [145] Mathieu Vinken, Hepatology in space: Effects of spaceflight and simulated microgravity on the liver, *Liver Int.* 2022 Dec;42(12):2599-2606.

## PHỤ LỤC

### 1. Phụ lục 1: TBS 10X (Tris-buffered saline)

Công thức cho 1 lít dung dịch 10X:

- 24 g Tris base (khối lượng riêng: 121.1 g)
- 88 g NaCl (khối lượng riêng: 58.4 g)
- Hòa tan vào 900 ml nước cất
- Điều chỉnh pH đến 7,6 bằng HCl
- Bổ sung nước cất đến 1 l

Đối với dung dịch 1X, pha loãng 1 phần thể tích dung dịch 10X với 9 phần thể tích nước cất và điều chỉnh pH đến 7,6. Nồng độ các chất trong dung dịch TBS 1X là 20 mM Tris và 150 mM NaCl.

### 2. Phụ lục 2: TBST (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20)

Công thức cho 1 lít dung dịch:

- 100 ml TBS 10x
- 900 mL nước cất
- 1 ml Tween 20

### 3. Phụ lục 3: Mật độ tế bào

	Cell number/well	
Well	Control	SMG
1	8664	6615
2	10565	6981
3	9906	6034
4	9947	6333
5	9988	8445
6	10378	3340
7	9598	6634
8	9791	8382
9	10600	7310
10	10308	8310
11	10652	8600
12	10810	8117

### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test:** Failed (P < 0.050)

**Equal Variance Test:** Failed (P < 0.050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	12	0	10100.583	593.812	171.419
Col 2	12	0	7091.750	1494.627	431.462
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	54318468.167	54318468.167	42.001	<0.001
Residual	22	28451751.167	1293261.417		
Total	23	82770219.333			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 1 vs. Col 2	3008.833	6.481	<0.001	0.050	Yes

#### 4. Phụ lục 4: WST1

O.D. value measurement	
Control	SMG
7.72E-01	6.37E-01
7.48E-01	7.88E-01
7.62E-01	7.41E-01
7.58E-01	6.05E-01
7.78E-01	5.71E-01
7.46E-01	6.09E-01
7.80E-01	5.83E-01
7.41E-01	6.73E-01
7.42E-01	5.70E-01
7.50E-01	6.50E-01
7.41E-01	5.65E-01
8.11E-01	4.37E-01

#### One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Failed ( $P < 0.050$ )

Equal Variance Test: Failed ( $P < 0.050$ )

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	12	0	0.761	0.0214	0.00617
Col 2	12	0	0.619	0.0905	0.0261

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.120	0.120	27.838	<0.001
Residual	22	0.0951	0.00432		
Total	23	0.215			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 1 vs. Col 2	0.142	5.276	<0.001	0.050	Yes

### 5. Phụ lục 5: Diện tích tế bào

	Control	SMG
1	1785	1489.293
2	1460.15	676.443
3	649.7	575.815
4	1204.512	930.249
5	666.445	896.706
6	763.565	3235.745
7	1118.555	637.31
8	1425.544	1804.593
9	2539.634	1186.291
10	857.336	1303.69
11	1184.418	1927.583
12	492.298	733.465
13	814.915	1047.648
14	2747.27	832.975
15	1104.043	1362.949
16	899.756	563.516
17	1145.347	2052.809
18	947.758	991.744
19	1482.476	1113.615
20	760.216	919.068
21	1138.649	709.986
22	670.91	2392.707
23	1565.084	2123.248



24	1038.18	1188.527
25	329.315	1137.095
26	1789.465	1298.1
27	707.749	692.096
28	1712.439	1168.401
29	830.544	2043.864
30	1725.835	4860.326
31	907.57	1304.808
32	947.758	1115.851
33	1049.343	764.772
34	708.865	1479.23
35	581.604	556.808
36	833.893	636.192
37	920.966	598.177
38	917.617	504.257
39	813.799	996.216
40	750.169	875.463
41	718.912	843.038
42	517.974	1758.752
43	794.822	504.257
44	1442.289	632.838

AVERAGE 1078.697477 1237.875364

## 6. Phụ lục 6: Kết quả phân tích chu kỳ tế bào bằng hệ thống Flow cytometry

### 6.1. Pha G0/G1

#### One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.293)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.377)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	4	0	86.925	0.465	0.232
Col 2	4	0	90.600	0.804	0.402

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	27.011	27.011	62.635	<0.001
Residual	6	2.588	0.431		
Total	7	29.599			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 2 vs. Col 1	3.675	7.914	<0.001	0.050	Yes

6.2. Pha S

### One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.903)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.436)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	4	0	11.300	0.469	0.235
Col 2	4	0	7.175	0.690	0.345

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	34.031	34.031	97.814	<0.001
Residual	6	2.088	0.348		
Total	7	36.119			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 1 vs. Col 2	4.125	9.890	<0.001	0.050	Yes

6.3. Pha G2/M

### One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.056)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.207)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	4	0	0.975	0.0500	0.0250
Col 2	4	0	0.675	0.0957	0.0479

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.180	0.180	30.857	0.001
Residual	6	0.0350	0.00583		
Total	7	0.215			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = 0.001$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 0.996

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 1 vs. Col 2	0.300	5.555	0.001	0.050	Yes

## 7. Phụ lục 7: Sự biểu hiện mức phiên mã các gene điều hoà chu kỳ tế bào

### 7.1. mRNA cyclin A

**One Way Analysis of Variance** Wednesday, December 01, 2021, 10:06:26 PM

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test:** Passed( $P = 0.924$ )

**Equal Variance Test:** Passed( $P = 0.144$ )

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	3	0	1.001	0.0509	0.0294
Col 2	3	0	0.666	0.137	0.0789

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.168	0.168	15.814	0.016
Residual	4	0.0425	0.0106		
Total	5	0.210			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = 0.016$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 0.822

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Col 1 vs. Col 2	0.335	2	5.624	--	Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

### 7.2. mRNA cyclin D

**One Way Analysis of Variance** Wednesday, December 01, 2021, 10:07:16 PM

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test:** Passed(P = 0.560)

**Equal Variance Test:** Passed(P = 0.428)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	3	0	1.004	0.101	0.0583
Col 2	3	0	0.667	0.0362	0.0209

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.170	0.170	29.601	0.006
Residual	4	0.0230	0.00575		
Total	5	0.193			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.006).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.976

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method) :

Comparisons for factor:

**Comparison Diff of Means p q P P<0.050**

Col 1 vs. Col 2 0.337 2 7.694 -- Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

### 7.3. mRNA cdk4

**One Way Analysis of Variance** Wednesday, December 01, 2021, 10:08:08 PM

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test:** Passed(P = 0.385)

**Equal Variance Test:** Passed(P = 0.537)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	3	0	1.002	0.0764	0.0441
Col 2	3	0	1.113	0.0231	0.0134

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0184	0.0184	5.774	0.074
Residual	4	0.0128	0.00319		
Total	5	0.0312			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.074).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.383

The power of the performed test (0.383) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

#### 7.4. mRNA cdk6

**One Way Analysis of Variance** Wednesday, December 01, 2021, 10:08:27 PM

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test:** Passed(P = 0.556)

**Equal Variance Test:** Passed(P = 0.646)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	3	0	1.004	0.104	0.0603
Col 2	3	0	0.631	0.0757	0.0437

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.208	0.208	25.025	0.007
Residual	4	0.0332	0.00831		
Total	5	0.241			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.007).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.952

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Duncan's Method) :

Comparisons for factor:

**Comparison Diff of Means p q P P<0.050**

Col 1 vs. Col 2 0.372 2 7.075 -- Yes

Note: The P values for Dunnett's and Duncan's tests are currently unavailable except for reporting that the P's are greater or less than the critical values of .05 and .01.

#### 8. Phụ lục 8: Sự biểu hiện mức phiên mã các gene điều hoà chu kỳ tế bào

	Gapdh		cyclin B		cyclin D1		cdk2		cdk6	
	control	smg	control	smg	control	smg	control	smg	control	smg
1	16.79	18.26	17.1	19.8	15.66	18.13	16.66	18.84	16.08	18.56
2	16.72	18.04	17.49	19.44	15.38	17.99	16.46	18.66	15.86	18.36
3	16.52	18	17.28	19.2	15.79	18.33	16.26	18.69	15.56	18.52
Sum	50.03	54.3	51.87	58.44	46.83	54.45	49.38	56.19	47.5	55.44
Average	16.677	18.100	17.290	19.480	15.610	18.150	16.460	18.730	15.833	18.480
Stdeva	0.001	0.001	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.001	0.003	0.001

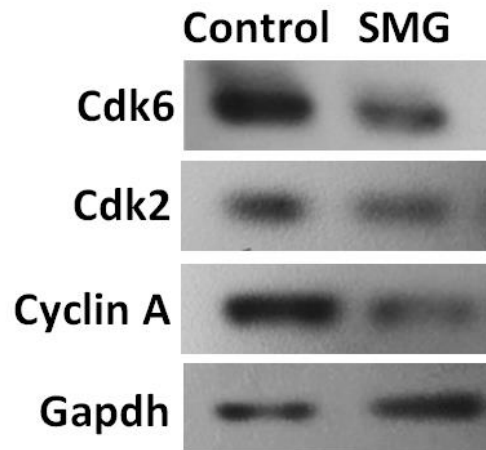
Gapdh		cyclin B		cyclin D1		cdk2		cdk6	
control	smg	control	smg	control	smg	control	smg	control	smg
16.79	18.26	17.1	19.8	15.66	18.13	16.66	18.84	16.08	18.56

16.72	18.04	17.49	19.44	15.38	17.99	16.46	18.66	15.86	18.36
16.52	18	17.28	19.2	15.79	18.33	16.26	18.69	15.56	18.52
16.677	18.1								
$\Delta Ct$		0.423	1.7	-1.017	0.03	-0.017	0.74	-0.597	0.46
		0.813	1.34	-1.297	-0.11	-0.217	0.56	-0.817	0.26
		0.603	1.1	-0.887	0.23	-0.417	0.59	-1.117	0.42
		0.613		-1.067		-0.217		-0.843	
		Contro 1	SMG	Contro 1	SMG	Contro 1	SMG	Contro 1	SMG
$\Delta\Delta Ct$		1.1408	0.413	0.966	0.484	0.871	0.592	0.843	0.481
		0.870	0.694	1.173	0.439	1	0.584	0.982	0.474
		1.007	0.709	0.883	0.461	1.149	0.498	1.209	0.345
			0.605		0.462		0.558		0.433

### 9. Phụ lục 9: Kết quả Western blot

Điều kiện	Intensity of Bands (analyzed by ImageJ)					
	No.	CDK4	CDK6	Cyclin A	Cyclin D1	GAPDH
<b>Control</b>	1	7982.276	5509.79	5269.154	2443.497	22345.58
	2	7454.912	5476.083	5072.326	2675.619	22951.82
	3	7581.74	5428.376	5064.033	2786.033	23664.43
	Average	7672.976	5471.416	5135.171	2635.050	22987.27 7
	Stdeva	275.266	40.907	116.107	174.835	660.139
	Confidence .norm	311.487	46.289	131.3845	197.840	747.004
<b>SMG</b>	1	7981.104	4955.619	1984.912	2281.669	21765.19
	2	7428.619	4823.205	1570.305	2081.426	21893.31
	3	7677.861	4921.619	1610.719	2228.548	22705.67
	Average	7695.861	4900.148	1721.978	2635.050	22121.39
	Stdeva	276.682	68.769	228.602	174.835	510.040
	Confidence .norm	313.089	77.818	258.683	197.840	577.154

### 10. Phụ lục 10: Western blot Cdk2



### 11. Phụ lục 11: FSC value

Control	SMG
8.98	9.99
8.83	9.91
8.78	9.81
8.66	9.71
8.66	9.58

### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test:** Passed(P = 0.702)

**Equal Variance Test:** Passed(P = 0.524)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	5	0	8.782	0.133	0.0597
Col 2	5	0	9.800	0.162	0.0724

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	2.591	2.591	117.711	<0.001
Residual	8	0.176	0.0220		
Total	9	2.767			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
------------	---------------	---	--------------	----------------	--------------

Col 2 vs. Col 1      1.018      10.849      <0.001      0.050      Yes

## 12. Phụ lục 12: Diện tích nhân

Nuclear area ( $\mu\text{m}^2$ )	
Control	SMG
246	231
253	234
252	234
253	239
258	242
263	254
253	254
253	248
255	257
254	251
264	255
253	235

### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test:** Passed (P = 0.208)

**Equal Variance Test:** Failed (P < 0.050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	12	0	254.750	4.901	1.415
Col 2	12	0	244.500	9.681	2.795

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	630.375	630.375	10.707	0.003
Residual	22	1295.250	58.875		
Total	23	1925.625			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.003).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.861

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
------------	---------------	---	--------------	----------------	--------------



Col 1 vs. Col 2    10.250    3.272    0.003    0.050    Yes

### 13. phụ lục 13: Giá trị hình dạng nhân

Nuclear shape value	
Control	SMG
0.87	0.89
0.86	0.88
0.89	0.87
0.88	0.86
0.88	0.88
0.86	0.83
0.88	0.87
0.87	0.87
0.88	0.88
0.87	0.86
0.86	0.88
0.88	0.89

#### One Way Analysis of Variance

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test:** Failed ( $P < 0.050$ )

**Equal Variance Test:** Passed ( $P = 0.368$ )

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	12	0	0.873	0.00985	0.00284
Col 2	12	0	0.872	0.0164	0.00474

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	0.0000167	0.0000167	0.0909	0.766
Residual	22	0.00403	0.000183		
Total	23	0.00405			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ( $P = 0.766$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 0.048

The power of the performed test (0.048) is below the desired power of 0.800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

**14. Phụ lục 14: tỷ lệ hạt nhân/tế bào chất**

STT	Tỷ lệ N/C	
	Control	SMG
1	0.142718263	0.164141374
2	0.174469815	0.26278405
3	0.39210728	0.272613989
4	0.211498183	0.383572516
5	0.38225525	0.135462456
6	0.333635119	0.206066302
7	0.227751072	0.187509761
8	0.178705182	0.126819234
9	0.297143827	0.333287342
10	0.215086312	0.233336579
11	0.517475391	0.293471713
12	0.312611867	0.179357115
13	0.230744726	0.119082974
14	0.28313465	0.246489618
15	0.22242351	0.219514464
16	0.26879446	0.265980972
17	0.17184231	0.344309043
18	0.335104891	0.102166542
19	0.223731896	0.115132382
20	0.379711288	0.205678626
21	0.162772158	0.214981686
22	0.245383363	0.188317233
23	0.773581829	0.353209092
24	0.142362159	0.209221492
25	0.359946959	0.119604142
26	0.148765649	0.187349097
27	0.306729204	0.21907459
28	0.147610925	0.319643763
29	0.280696916	0.165258006
30	0.26879446	0.439028534
31	0.242772954	0.38424658
32	0.359380277	0.24538313
33	0.438016417	0.279228934
34	0.305497348	0.289968661
35	0.276614012	0.138993218
36	0.277623562	
37	0.313040567	
38	0.339592945	
39	0.354357835	
40	0.491824107	
41	0.320514656	

42	0.176630412	
43	0.302534775	
AVERAGE	0.29153	0.23287
STDEVA	0.11794	0.08624
CONFIDENCE.NORM	0.03525	0.02857

### 15. Phụ lục 15: Nuclear intensity measurment

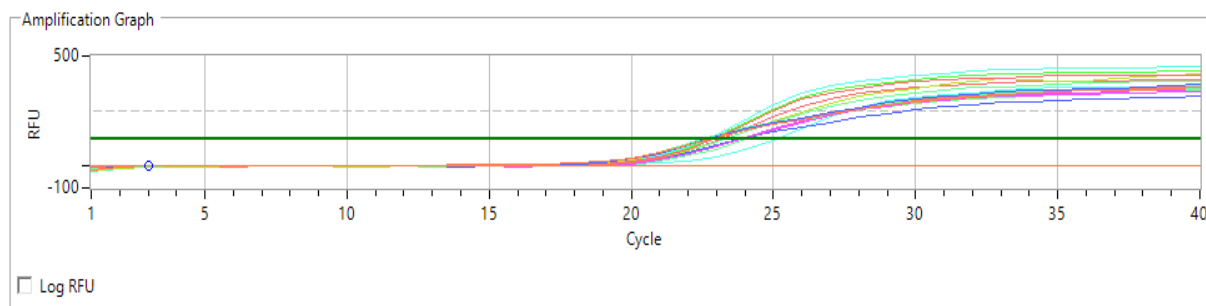
No.	Control	SMG
1	39529	36787
2	39087	36731
3	41644	38569
4	41177	35717
5	39135	39224
6	39733	36714
7	38979	38124
8	39173	39944
9	41405	38088
AVERAGE	39984.667	37766.4447

### 16. Phụ lục 16: Apoptosis analysis (by Flow cytometry)

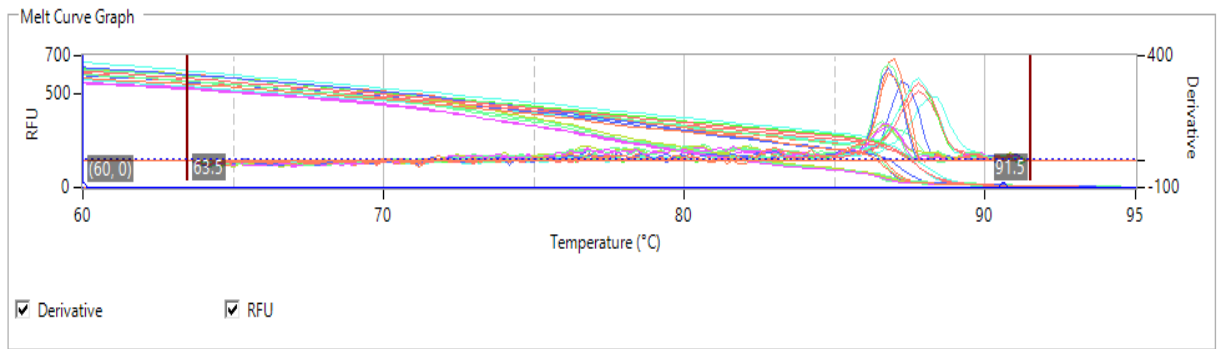
Group	No.	Apoptosis analysis			
		Necrosis	Viability	Early apoptosis	Late apoptosis
Control	1	0.4	98.8	0.4	0.4
	2	0.4	98.9	0.4	0.4
	3	0.3	98.9	0.3	0.4
	4	0.4	98.7	0.3	0.3
SMG	1	0.1	99.1	0.5	0.3
	2	0.2	99.0	0.4	0.4
	3	0.2	99.0	0.4	0.3
	4	0.2	99.2	0.3	0.2

### 17. Phụ lục 17: Kết quả phân tích real time – PCR các gene Bax, bcl-2

#### a. Biểu đồ khuếch đại



#### b. Biểu đồ đường cong tan chảy



## 18. Phụ lục 18: Kết quả Western blot, biểu hiện mức độ dịch mã của các protein điều hoà cấu trúc khung xương tế bào:

Stt	Beta-Actin		alpha-Tubulin 3		GAPDH	
	Control	SMG	Control	SMG	Control	SMG
1	8818.782	5740.882	21115.702	15274.782	22345.58	21765.19
2	8765.489	5500.882	19678.974	15006.832	22951.82	21893.31
3	7875.175	5058.69	20249.752	13846.296	23664.43	22705.67
Average	8486.482	5433.487	20348.143	14709.303	22987.277	22121.39

### 18.1. Beta-Actin

#### One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test: Passed(P = 0.113)

Equal Variance Test: Passed(P = 0.790)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	3	0	8486.482	530.078	306.040
Col 2	3	0	5433.485	346.054	199.794

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	13981189.076	13981189.076	69.778	0.001
Residual	4	801471.008	200367.752		
Total	5	14782660.084			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 1 vs. Col 2	3052.997	8.353	0.001	0.050	Yes

**18.2. Alpha-Tubulin****One Way Analysis of Variance**

Data source: Data 1 in Notebook1

**Normality Test:** Passed(P = 0.577)**Equal Variance Test:** Passed(P = 0.994)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	3	0	20348.143	723.400	417.655
Col 2	3	0	14709.303	759.299	438.382

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	1	47694763.541	47694763.541	86.730	<0.001
Residual	4	2199685.845	549921.461		
Total	5	49894449.386			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0.05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
Col 1 vs. Col 2	5638.839	9.313	<0.001	0.050	Yes