

Đánh giá sự biểu hiện của các gen tự thực (autophagy) trong quá trình hoạt hóa *in vitro* của các tế bào hình sao từ gan chuột

Đặng Minh Thành^{1,2}, Lê Văn Trình¹, Đỗ Quang Huy¹, Trần Thị Hằng¹, Cao Lê Trâm Anh¹, Đặng Thị Tùng Loan¹, Phan Lữ Chính Nhân¹, Phạm Văn Phúc¹, Ai Xuan Le Holterman³, Nguyễn Văn Thuận², Lê Minh Huy⁴, Trương Hải Nhung^{1,5*}

¹Phòng Thí nghiệm Nghiên cứu và Ứng dụng Tế bào gốc,

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

²Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Bộ môn Nhi khoa, Trường Y khoa, Đại học Illinois, Chicago, Mỹ

⁴Bộ môn Giải phẫu bệnh, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

⁵Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 8/12/2020; ngày chuyển phản biện 14/12/2020; ngày nhận phản biện 20/1/2021; ngày chấp nhận đăng 25/1/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm đánh giá sự thay đổi biểu hiện các gen liên quan đến sự tự thực trong quá trình hoạt hóa của các tế bào hình sao *in vitro*. Tế bào hình sao phân lập từ gan chuột được nuôi cấy *in vitro* trong 7 ngày. Mức độ hoạt hóa của tế bào hình sao được đánh giá thông qua hình thái, mức độ dự trữ các giọt mỡ nội bào bằng nhuộm dung dịch oil red o (ORO); biểu hiện của các gen hoạt hóa α -sma, collagen I và *lrat* bằng qRT PCR và nhuộm ICC (immunocytochemistry) (α -SMA). Sự biểu hiện của các gen tự thực *lc3b*, *beclin 1*, *atg12* được đánh giá bằng qRT PCR và nhuộm ICC (LC3). Kết quả cho thấy, tế bào hình sao hoạt hóa khi nuôi cấy *in vitro* sau 3 và 7 ngày thể hiện thông qua sự thay đổi hình dạng giống nguyên bào sợi cơ, mất dần khả năng tích trữ các giọt mỡ, tăng sự biểu hiện của các gen hoạt hóa α -sma và collagen I, giảm sự biểu hiện của gen *lrat*. Thêm vào đó, sự biểu hiện của các gen tự thực *lc3b*, *beclin 1* và *atg12* tăng lên ở các tế bào hình sao hoạt hóa khi nuôi cấy *in vitro* sau 3 và 7 ngày. Đây là kết quả ban đầu trong nghiên cứu tìm ra vai trò của sự tự thực trong quá trình hoạt hóa của tế bào hình sao, hướng tới các liệu pháp điều trị xơ gan nhắm vào sự tự thực.

Từ khóa: sự hoạt hóa, sự tự thực, tế bào hình sao.

Chỉ số phân loại: 3.5

Mở đầu

Tế bào hình sao (hepatic stellate cell - HSC) còn được gọi là tế bào dự trữ mỡ (fat - storing cell) hay tế bào Ito. Đây là một loại tế bào trong gan, chiếm 5-8% tổng số tế bào. Khi gan khỏe mạnh, các tế bào này tồn tại ở dạng không hoạt hóa, chúng dự trữ vitamin A trong các giọt mỡ ở tế bào chất [1, 2]. Khi gan bị tổn thương, các tế bào này chuyển dạng trở thành các tế bào giống nguyên bào sợi cơ [3]. Quá trình này được gọi là sự hoạt hóa, được thể hiện thông qua sự giảm khả năng tích trữ các giọt mỡ nội bào, sự biểu hiện của phân tử protein α -SMA (alpha - smooth muscle), tăng cường tiết collagen. Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh sự hoạt hóa của các tế bào hình sao là yếu tố chính trong quá trình xơ hóa ở gan [4-7]. Chính vì vậy, nghiên cứu về cơ chế của sự hoạt hóa là rất cần thiết cho việc phát triển các liệu pháp điều trị xơ hóa gan. Thêm vào đó, đã có rất nhiều con đường và tác nhân được chứng minh tham gia vào sự hoạt hóa của tế bào hình sao như: stress ty thể, stress oxy hóa, sự biến dưỡng của vitamin A, các tương tác tín hiệu thông

qua thụ thể [5]. Bên cạnh một số con đường tín hiệu hoạt hóa tế bào hình sao đã được nghiên cứu từ lâu, gần đây sự tự thực được phát hiện là một yếu tố liên quan đến quá trình hoạt hóa.

Sự tự thực là một quá trình nội bào có vai trò phân giải và tái sử dụng các vật chất bên trong tế bào như: các cơ quan bị hư hỏng, phân tử protein gấp cuộn sai... Đây là một quá trình thiết yếu cho sự sống của tế bào, diễn ra trong gan, đặc trưng bởi quá trình hình thành các thể tự thực (autophagosome) bao bọc lấy vật chất, sau đó kết hợp với tiêu thể (lysosome) để phân giải [8]. Quá trình này được thực hiện thông qua một bộ máy chặt chẽ với sự tham gia của các gen liên quan đến sự tự thực (autophagy) như: *lc3*, *beclin 1*, *atg12*. Một số nghiên cứu [9, 10] cho thấy mối liên hệ của sự tự thực trong cơ chế bệnh lý của bệnh xơ hóa gan. Các nghiên cứu *in vivo* trên mô hình chuột xơ gan do CCl₄ và thất mật cho thấy, sự tự thực được kích hoạt trong quá trình xơ hóa. Ngược lại, các nghiên cứu khác [11, 12] chỉ ra rằng, có sự cải thiện tình trạng tổn thương của gan khi kích

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

Investigating the expression of autophagy genes during the *in vitro* activation of mouse hepatic stellate cells

Minh Thanh Dang^{1,2}, Van Trinh Le¹, Quang Huy Do¹, Thi Hang Tran¹, Le Tram Anh Cao¹,
Thi Tung Loan Dang¹, Lu Chinh Nhan Phan¹, Van Phuc Pham¹, Ai Xuan Le Holterman³,
Van Thuan Nguyen², Minh Huy Le⁴, Hai Nhung Truong^{1,5*}

¹Laboratory of Stem Cell Research and Application, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city, Vietnam

²School of Biotechnology, International University, Vietnam National University, Ho Chi Minh city, Vietnam

³Department of Pediatrics, University of Illinois College of Medicine, USA

⁴Department of Anatomic-Pathology, Medicine and Pharmacy University, Ho Chi Minh city, Vietnam

⁵Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city, Vietnam

Received 8 December 2020; accepted 25 January 2021

Abstract:

This study aims to evaluate the expression level of autophagy genes during the activation of mouse hepatic stellate cells (HSCs) *in vitro*. The HSCs isolated from the mouse liver were cultured *in vitro* for 7 days. The activation of HSCs was evaluated by their morphology, the storage of lipid droplets by oil red O (ORO) staining, the expression of activation-related genes *α-sma*, *collagen I*, and quiescence-related gene *lrat* by qRT PCR and ICC staining (*α-SMA*). The expression of autophagy genes *lc3b*, *beclin 1*, *atg12* were assessed by qRT PCR and ICC staining (LC3). The results showed that the isolated HSCs were activated after 3 days and 7 days of the culture *in vitro*. The activation was indicated by the morphological change of HSCs to myofibroblast-like cells, loss of lipid droplets, and increased expression of fibrotic genes *α-sma* and *collagen I*, decreased expression of *lrat*. Additionally, the expression of autophagy genes *lc3b*, *beclin 1*, and *atg12* were significantly increased in the activated HSCs after the culture *in vitro* for 3 and 7 days. This study contributes the preliminary results to further studies on the role of autophagy during the activation of HSCs, which may be exploited for the development of the antifibrotic therapy targeting autophagy.

Keywords: autophagy, hepatic stellate cells (HSCs), hepatic stellate cell activation.

Classification number: 3.5

hoạt quá trình tự thực. Sự khác biệt giữa các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy vai trò của sự tự thực không giống nhau trên các loại tế bào khác nhau và mối quan hệ này rất phức tạp. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần phải đánh giá trên từng loại tế bào gan riêng biệt, đặc biệt là vai trò của sự tự thực trong quá trình hoạt hóa của các tế bào hình sao - nhân tố chính của sự xơ hóa gan. Một số nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra mối liên hệ giữa sự tự thực và sự hoạt hóa của tế bào hình sao: miR-96-5p ức chế sự hoạt hóa của tế bào hình sao bằng cách khóa sự tự thực trên dòng tế bào hình sao bắt từ LX-2 [13]; giảm biểu hiện *beclin 1* bằng microRNA (miRNA) ức chế sự tự thực đồng thời sự hoạt hóa trên dòng tế bào hình sao LX-2 và T6 [14]; sự giảm quá trình xơ hóa trên dòng tế bào LX-2 bất hoạt gen *lc3* khi xử lý với hóa chất gây xơ gan [15]. Tuy nhiên, việc thực hiện nghiên cứu trên dòng tế bào hình sao bắt từ còn tồn tại nhiều bất cập do các tế bào này đã được chỉnh sửa và như vậy không còn phản ánh đúng những đặc tính ban đầu của loại tế bào này trong gan. Chính vì vậy, các nghiên cứu về vai trò

của sự tự thực đối với sự hoạt hóa trên các tế bào hình sao được phân lập sơ cấp là rất cần thiết để bổ sung cho các kết quả nghiên cứu trước đây và là cơ sở để nghiên cứu các liệu pháp điều trị xơ gan nhắm vào sự tự thực.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá hoạt động tự thực thông qua sự thay đổi biểu hiện của các gen liên quan đến sự tự thực: *lc3b*, *beclin 1*, *atg12* trong quá trình hoạt hóa của các tế bào hình sao được phân lập từ gan chuột.

Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng thí nghiệm

Chuột Balb/c 4-5 tháng tuổi, được nuôi trong lồng sạch ở điều kiện nhiệt độ 25°C, 12 giờ sáng/tối, cho ăn bằng cám viên và uống nước sạch tự do.

Phân lập tế bào hình sao từ gan chuột

Quy trình phân lập tế bào hình sao được tham khảo từ

quy trình của Mederacke và cs (2015) [1]. Về cơ bản, quy trình phân lập tế bào hình sao trải qua 3 giai đoạn chính: (A) truyền các dung dịch enzyme vào mô gan chuột (Perfusion *in vivo*), (B) phân cắt mô gan thành tế bào đơn bằng enzyme (*in vitro* digestion), (C) phân tách tế bào hình sao bằng dung dịch ly tâm đẳng tỷ trọng Nycodenz 9,6%. Cụ thể, gan được phân cắt bằng cách truyền dung dịch enzyme pronase E (Merck, Đức), collagenase D (Roche Diagnostics, Đức). Tiếp theo, gan được xé nhỏ và tiếp tục được phân cắt bằng cách ủ với hỗn hợp enzyme gồm pronase E, collagenase D và DNase I (Roche, Đức). Gan sau khi phân cắt được lọc thông qua màng lọc tế bào đơn 70 μ m và ly tâm ở tốc độ thấp (50 g trong 2 phút) để loại bỏ các tế bào nhu mô gan (hepatocytes). Sau đó, hỗn hợp tế bào đơn được trộn với dung dịch Nycodenz (Axis-shield, Scotland) để đạt nồng độ 9,6% và ly tâm ở 1400 g trong 20 phút. HSCs được thu nhận từ phân lớp màu trắng đục và được rửa với dung dịch GBSS/B. HSCs mới thu nhận được đánh giá ở mốc thời gian ngày 0.

Nuôi cấy tế bào hình sao

Tế bào hình sao được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Sigma, Mỹ), 10% FBS (Sigma, Mỹ), kháng sinh penicillin/streptomycin 1x (Gibco, Mỹ) ở mật độ 4×10^5 tế bào/cm² trong đĩa nuôi (SPL Life Sciences, Hàn Quốc) trong vòng 7 ngày. Môi trường được thay 2 ngày/lần.

Đánh giá mức độ dự trữ giọt mỡ bằng phương pháp nhuộm ORO

Mức độ dự trữ giọt mỡ của tế bào hình sao được đánh giá bằng cách nhuộm với ORO (Sigma, Mỹ). Tế bào được cố định bằng paraformaldehyde 4% (Merck, Đức) trong ít nhất 15 phút, rửa 2 lần bằng PBS. Dung dịch ORO 0,5% được pha trong isopropanol (Merck, Đức). Trước khi sử dụng, dung dịch ORO được pha loãng với nước cất theo tỷ lệ 3:2 và để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Tế bào được nhuộm với dung dịch ORO pha loãng trong 20 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó rửa 3 lần với PBS. Nhân tế bào được nhuộm kép với hematoxylin (Sigma, Mỹ) trong 1 phút trước khi quan sát dưới kính hiển vi. Diện tích bắt màu với thuốc nhuộm ORO được định lượng bằng cách sử dụng phần mềm Image J (NIH, Mỹ).

Đánh giá mức độ biểu hiện gen ở mức phiên mã (qRT PCR)

Tế bào hình sao thu nhận từ gan được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng. Sau đó, tiến hành tách chiết RNA bằng bộ kit tách chiết RNA tổng số Easy Blue (iNtRON, Hàn Quốc). Nồng độ và độ tinh sạch của mẫu tách chiết được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 và 280 nm bằng máy quang phổ Nanodrop (Thermo Fisher, Mỹ).

cDNA được tổng hợp từ 1000 ng RNA tổng số bằng bộ kit tổng hợp cDNASensiFAST™ (Bioline, Anh). 1 μ l cDNA được dùng cho phản ứng PCR định lượng bằng bộ kit

SensiFAST™ Real-Time PCR Kits (Bioline, Anh), sử dụng hệ thống luân nhiệt LightCycler 480 (Roche, Thụy Điển). Trình tự các cặp mồi sử dụng được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các mồi dùng để khuếch đại các gen mục tiêu tương ứng trong phản ứng qRT PCR.

Gen	Mồi xuôi (5' - 3')	Mồi ngược (5' - 3')	Sản phẩm (bp)	Tham khảo
<i>lc3b</i>	TTCTTCCTCTGGTGAATGG	GTGGGTGGCTACGTTCTCAT	251	[16]
<i>becn1</i>	ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC	TGGGCTGTGGTAAGTAATGGA	149	[12]
<i>atg12</i>	TTAACTGGTGGCCTCGGAA	CTTCCCACAGCACCGAAATG	218	[17]
<i>a-sma</i>	GCATCCACGAAACACCTA	CACGAGTAACAATCAAAAGC	418	[18]
<i>collagen 1</i>	CAATGGCAGGCTGTGTGCG	AGCACTCGCCCTCCCGTCTT	83	[19]
<i>lrat</i>	CTGACCAATGACAAGGAACGCACTC	CTAATCCCAAGACAGCCGAAGCAAGAC	370	[20]
<i>gapdh</i>	AAGTTGTCATGGATGACC	TCACCATCTCCAGGAGC	283	[21]

Nhuộm hóa miễn dịch tế bào (ICC)

Tế bào sau thu nhận được nhuộm với kháng thể anti-desmin (PA516705, Thermo Fisher Scientific, Mỹ) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tế bào sau nhuộm desmin được rửa 2 lần với PBS để loại kháng thể thừa bằng phương pháp ly tâm: 2000 g trong 5 phút ở 4°C. Tiến hành nhuộm kháng thể thứ cấp Alexafluor 488 (ab150077, Abcam, Hoa Kỳ) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào sau nhuộm được rửa 2 lần với PBS để loại kháng thể thừa bằng phương pháp ly tâm: 2000 g trong 5 phút ở 4°C. Mẫu tế bào không nhuộm kháng thể được sử dụng làm đối chứng. Tế bào nuôi cấy được cố định với paraformaldehyde 4% trong vòng 15 phút, rửa 2 lần với PBS. Tiếp theo, tế bào được xử lý với dung dịch đục lỗ màng trong 15 phút. Sau đó, tế bào được ủ với dung dịch khóa liên kết không đặc hiệu trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Ủ kháng thể thứ cấp Desmin (ab8592, 1:200) hoặc α -SMA (ab15734, 1:300) trong 1 giờ, sau đó rửa 2 lần với PBS. Kháng thể thứ cấp gắn huỳnh quang Alexa fluor 488 được thêm vào (ab150077, 1:500) và để ở nhiệt độ phòng 1 giờ, sau đó rửa 2 lần với PBS. Nhân tế bào được nhuộm với DAPI. Hình ảnh huỳnh quang được chụp bằng hệ thống Cytell TM Cell Imaging (GE Healthcare, Anh).

Xử lý thống kê

Tất cả số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM (SEM: sai số chuẩn của giá trị trung bình). Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm Graphpad Prism 6.05. Sự khác biệt thống kê được kiểm tra bằng Student's t-test với giá trị $p < 0,05$ được xem là khác biệt có ý nghĩa.

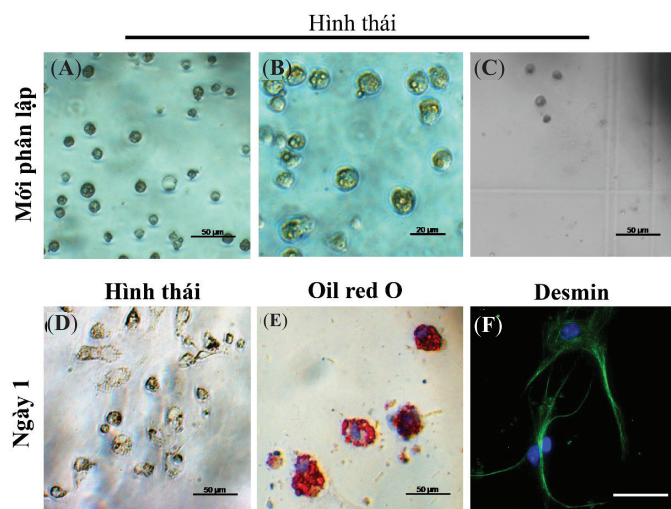
Kết quả và thảo luận

Sự hoạt hóa của tế bào hình sao trong nuôi cấy

Trên phương diện điều trị bệnh xơ hóa gan, các tế bào hình sao nuôi cấy sơ cấp trở thành một công cụ cần thiết cho nghiên cứu sàng lọc thuốc. Đặc biệt, các nghiên cứu về sự hoạt hóa của tế bào hình sao được xem là cách tiếp cận trực diện và cơ bản nhất hướng tới điều trị và phòng ngừa

xơ gan. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã bước đầu chỉ ra được mối liên hệ giữa sự tự thực trong cơ chế kích hoạt các tế bào hình sao hoạt hóa [9, 22, 23]. Điều này mở ra một hướng tiếp cận mới về liệu pháp điều trị xơ gan nhằm vào sự tự thực. Tuy nhiên, để thực hiện được, cần làm rõ vai trò của sự tự thực trong cơ chế hoạt hóa của các tế bào hình sao. Trong đó, nghiên cứu thực hiện trên các tế bào hình sao phân lập sơ cấp từ gan chuột là cần thiết, vì các tế bào này chưa bị chỉnh sửa như các dòng tế bào hình sao bắt từ, nhờ đó việc đánh giá sẽ chính xác hơn.

Tế bào hình sao sau phân lập có hình thái tròn không đều do chứa nhiều giọt mỡ bên trong tế bào chất, kích thước từ 12 đến 20 μm (hình 1A, 1B). Khi quan sát dưới điều kiện phản xạ ánh sáng khác, bề mặt của các tế bào có nhiều vết lõm (hình 1C). Sau một ngày nuôi cấy, tế bào bám vào bề mặt đĩa nuôi, bắt đầu trải rộng và xuất hiện các tua (hình 1D). Các tế bào hình sao này chứa nhiều giọt mỡ với nhiều kích thước khác nhau, tập trung xung quanh nhân tế bào, bắt màu với thuốc nhuộm ORO (hình 1E). Các đặc điểm này tương đồng với các nghiên cứu trước đây [1, 24]. Kết quả nhuộm hóa miễn dịch tế bào (ICC) cho thấy các tế bào này dương tính với kháng thể Desmin (hình 1F). Đây là một dấu chuẩn thường được sử dụng để định danh các tế bào hình sao [25-27]. Điều này giúp chứng minh quần thể tế bào phân lập được từ gan chuột trong nghiên cứu này chính là các tế bào hình sao.



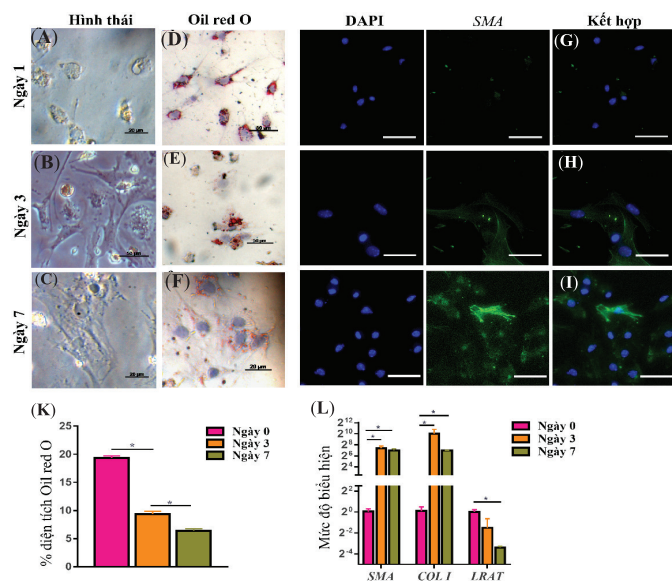
Hình 1. Định danh tế bào hình sao phân lập từ gan chuột. Tế bào hình sao mới phân lập từ gan chuột được đánh giá hình thái dưới kính hiển vi (A, B, C). Sau một ngày nuôi cấy, các tế bào hình sao được đánh giá hình thái (D), sự tích lũy các giọt mỡ thông qua nhuộm với ORO (E), và sự biểu hiện của marker Desmin (F). Thước kẻ: 50 μm nếu không có chú thích trên hình.

Trong thời gian nuôi cấy, hình ảnh chụp bằng kính hiển vi cho thấy có sự thay đổi về hình dạng của các tế bào hình sao. Sau 7 ngày nuôi cấy, các tế bào này mất dần các tua, nhánh; trải rộng phần thân tế bào và có hình dạng giống

nguyên bào sợi cơ (hình 2A, 2B, 2C). Hình ảnh nhuộm ORO cho thấy, các giọt mỡ mất dần ở ngày 3 và gần như không còn ở ngày 7 (hình 2D, 2E, 2F). Kết quả định lượng ORO cho thấy, có sự giảm đáng kể diện tích giọt mỡ tích trữ trong tế bào hình sao sau 3 và 7 ngày nuôi cấy (hình 2K).

Kết quả đánh giá sự biểu hiện các gen cho thấy, có sự tăng mạnh biểu hiện của các gen liên quan đến sự hoạt hóa $\alpha\text{-sma}$ (dấu chuẩn cho các nguyên bào sợi cơ), *collagen I* trên tế bào hình sao khi nuôi cấy trong 3 và 7 ngày (hình 2L). Ngược lại, sự biểu hiện của *lrat* (gen biểu hiện mạnh trên tế bào HSC không hoạt hóa) giảm đáng kể trên tế bào hình sao sau 3 và 7 ngày nuôi cấy (hình 2L). Kết quả nhuộm ICC một lần nữa cho thấy $\alpha\text{-SMA}$ biểu hiện mạnh trên tế bào hình sao nuôi cấy trong 3 và 7 ngày so với ngày 1 (hình 2G, 2H, 2I).

Quá trình nuôi cấy đã làm kích hoạt sự chuyển dạng của các tế bào hình sao từ dạng không hoạt hóa (hay ‘im lặng’) sang trạng thái hoạt hóa. Sự hoạt hóa của các tế bào hình sao được thể hiện thông qua sự thay đổi hình dạng từ dạng hình sao sang giống nguyên bào sợi cơ và mất dần các giọt mỡ theo thời gian (hình 2A-2F). Tương tự như quan sát từ các nghiên cứu trước [28-30], sự hoạt hóa của HSC được khẳng định thông qua sự tăng biểu hiện của các gen xơ hóa $\alpha\text{-sma}$, *collagen I* và sự giảm biểu hiện của gen *lrat*. Tất cả các kết quả trên cho thấy, HSC phân lập từ gan chuột ở nghiên cứu này có thể được sử dụng như một mô hình để nghiên cứu cơ chế của sự hoạt hóa.



Hình 2. Sự hoạt hóa của các tế bào hình sao in vitro. Sự hoạt hóa của các tế bào hình sao *in vitro* được đánh giá thông qua sự thay đổi hình thái (A, B, C); sự tích trữ giọt mỡ bằng nhuộm ORO (D, E, F); định lượng mức độ dự trữ giọt mỡ (K); sự biểu hiện mRNA của các gen $\alpha\text{-sma}$ (SMA), *collagen I* (COL 1) và *lrat* (LRAT) (L); sự biểu hiện của $\alpha\text{-SMA}$ thông qua nhuộm ICC (G, H, I). Thước kẻ: 50 μm nếu không có chú thích trên hình. * $p < 0,05$.

Sự thay đổi biểu hiện của các gen liên quan đến sự tự thực ở tế bào hình sao hoạt hóa

Một trong các nhân tố gần đây được chứng minh có liên quan đến sự hoạt hóa của các tế bào hình sao đó là sự tự thực. Cụ thể, các nghiên cứu *in vivo* trên mô hình chuột xơ gan do CCl₄ và thắt mật [10, 31] cho thấy sự tự thực được kích hoạt trong quá trình xơ hóa. Các nghiên cứu *in vitro* cũng cho thấy ức chế sự tự thực làm giảm sự hoạt hóa của các tế bào hình sao, tuy nhiên các nghiên cứu này [13, 15] chủ yếu được thực hiện trên các dòng tế bào hình sao bất tử. Chính vì vậy, vai trò của sự tự thực đối với sự hoạt hóa của tế bào hình sao chưa hoàn toàn được hiểu rõ và cần được nghiên cứu thêm.

Ở gan, sự tự thực diễn ra dưới dạng hình thành các thể tự thực nhờ vào sự tham gia của các gen quan trọng: *lc3*, *beclin 1*, *atg12*. Do đó, hoạt động tự thực cũng được phản

ánh thông qua mức độ biểu hiện của các gen tự thực. Cụ thể, *beclin 1* tham gia vào phức hợp PtdIns3K, cần thiết trong giai đoạn đầu hình thành thể tự thực. *atg12* tham gia vào giai đoạn kéo dài màng của thể tự thực. *lc3* là phân tử protein gắn lên màng của thể tự thực, điều hòa kích thước và sự đóng mở của thể tự thực [8]. Để nghiên cứu vai trò của sự tự thực trong quá trình hoạt hóa của các tế bào hình sao, chúng tôi tiến hành đánh giá sự biểu hiện của các gen chủ chốt tham gia vào bộ máy tự thực trên các tế bào hình sao mới phân lập và các tế bào hình sao đã hoạt hóa sau khi nuôi cấy sơ cấp. Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy có sự tăng biểu hiện của các gen tự thực: *lc3b*, *beclin1*, *atg12* trên tế bào hình sao đã hoạt hóa tại thời điểm 3 và 7 ngày nuôi cấy (hình 3D). Hình ảnh nhuộm ICC cũng thể hiện có sự tăng cường biểu hiện của protein LC3 trên tế bào hình sao sau 3 và 7 ngày nuôi cấy (hình 3A, 3B, 3C). Kết quả này tương ứng với kết quả đánh giá sự biểu hiện gen và cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây: giảm biểu hiện gen *beclin 1* bằng miRNA làm giảm sự hoạt hóa trên dòng tế bào T6 và LX-2 [14]; bất hoạt gen *lc3* làm giảm sự xơ hóa trên tế bào LX-2 [15]. Đáng chú ý, sự biểu hiện của các gen tự thực ở ngày 3 cao hơn ở ngày 7 (hình 3D). Điều này chỉ ra rằng, quá trình tự thực có thể đã được kích hoạt mạnh mẽ tại thời điểm các tế bào hình sao mới hoạt hóa.

Kết luận

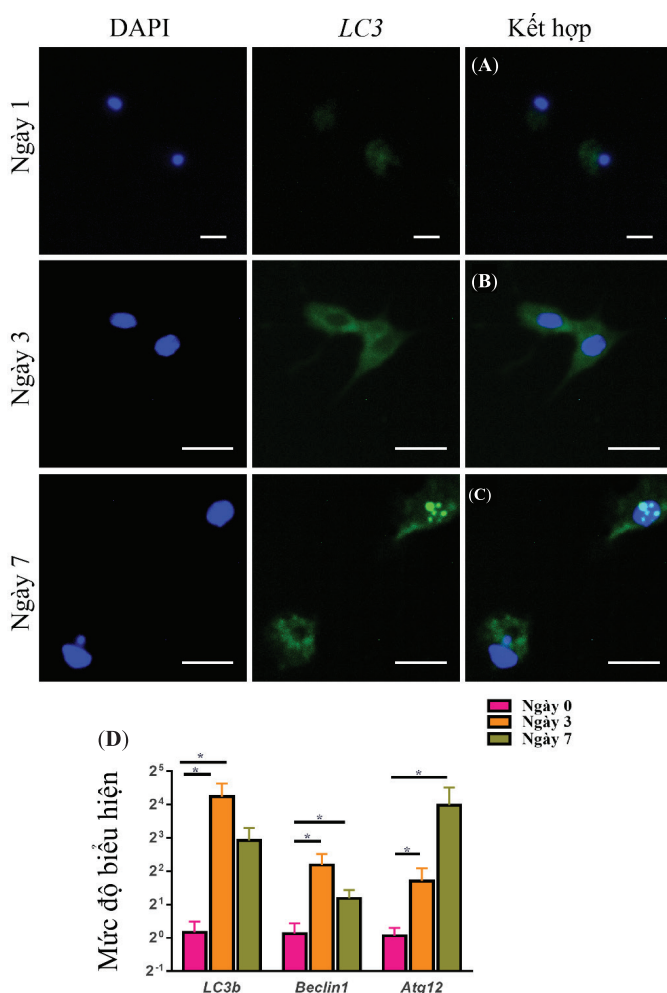
Các gen tự thực *lc3b*, *beclin 1* và *atg12* tăng biểu hiện trên tế bào hình sao đã hoạt hóa sau khi nuôi cấy *in vitro* trong 3 và 7 ngày. Các kết quả này là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế của sự tự thực đối với sự hoạt hóa của các tế bào hình sao. Bên cạnh đó, các tế bào hình sao phân lập sơ cấp từ gan chuột ở nghiên cứu này là một công cụ quan trọng để tiến hành các nghiên cứu về cơ chế hoạt hóa.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 108.05-2017.30. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] I. Mederacke, D.H. Dapito, S. Affò, H. Uchinami, R.F. Schwabe (2015), "High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers", *Nature Protocols*, **10**, pp.305-315.
- [2] D.N. D'Ambrosio, J.L. Walewski, R.D. Clugston, P.D. Berk, R.A. Rippe, W.S. Blanter (2011), "Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage", *PLOS ONE*, **6**(9), DOI: 10.1371/journal.pone.0024993.
- [3] F. Tacke and R. Weiskir Chen (2012), "Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques", *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, **6**(1),



Hình 3. Sự thay đổi biểu hiện của các gen tự thực trên tế bào hình sao hoạt hóa. Các tế bào HSCs hoạt hóa khi nuôi cấy *in vitro* được đánh giá mức độ biểu hiện mRNA của các gen tự thực *lc3b*, *beclin 1*, *atg12* (D); sự biểu hiện của protein LC3 bằng nhuộm ICC (A, B, C). Thước kẻ: 20 μ m nếu không có chú thích trên hình. *p < 0,05.

pp.67-80.

[4] T. Higashi, S.L. Friedman, Y. Hoshida (2017), "Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis", *Advanced Drug Delivery Reviews*, **121**, pp.27-42.

[5] T. Tsuchida and S.L. Friedman (2017), "Mechanisms of hepatic stellate cell activation", *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **14**(7), pp.397-411.

[6] F. Yu, S. Ji, L. Su, L. Wan, S. Zhang, C. Dai, et al. (2015), "Adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit activation of hepatic stellate cells in vitro and ameliorate rat liver fibrosis in vivo", *Journal of the Formosan Medical Association*, **114**(2), pp.130-138.

[7] R. Safadi and S. Friedman (2002), "Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation", *Med. Gen. Med.*, **4**(3), DOI: 10.1002/jgm.242.

[8] Y. Feng, D. He, Z. Yao, D.J. Klionsky (2014), "The machinery of macroautophagy", *Cell Research*, **24**(1), pp.24-41.

[9] Y.-Q. Mao and X.-M. Fan (2015), "Autophagy: a new therapeutic target for liver fibrosis", *World Journal of Hepatology*, **7**(16), pp.1982-1986.

[10] H.M. Ni, A. Bockus, N. Boggess, H. Jaeschke, W.X. Ding (2012), "Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity", *Hepatology*, **55**(1), pp.222-232.

[11] J. Feng, K. Chen, Y. Xia, L. Wu, J. Li, S. Li, et al. (2018), "Salidroside ameliorates autophagy and activation of hepatic stellate cells in mice via NF- κ B and TGF- β 1/Smad3 pathways", *Drug Des. Devel. Ther.*, **12**, pp.1837-1853.

[12] J. Li, K. Chen, S. Li, J. Feng, T. Liu, F. Wang, et al. (2016), "Protective effect of fucoidan from *Fucus vesiculosus* on liver fibrosis via the TGF- β 1/Smad pathway-mediated inhibition of extracellular matrix and autophagy", *Drug Design, Development and Therapy*, **10**, pp.619-630.

[13] K. Yu, N. Li, Q. Cheng, J. Zheng, M. Zhu, S. Bao, et al. (2018), "miR-96-5p prevents hepatic stellate cell activation by inhibiting autophagy via ATG7", *J. Mol. Med. (Berl.)*, **96**(1), pp.65-74.

[14] P.C.A. Benitez, A.I.P. Viglietti, C.K. Herrmann, V.A. Dennis, D.J. Comerci, G.H. Giambartolomei, et al. (2018), "Brucella abortus promotes a fibrotic phenotype in hepatic stellate cells, with concomitant activation of the autophagy pathway", *Infect. Immun.*, **86**(1), DOI: 10.1128/IAI.00522-17.

[15] W. He, B. Wang, J. Yang, Y. Zhuang, L. Wang, X. Huang, et al. (2014), "Chloroquine improved carbon tetrachloride-induced liver fibrosis through its inhibition of the activation of hepatic stellate cells: role of autophagy", *Biol. Pharm. Bull.*, **37**(9), pp.1505-1509.

[16] J.H. Kim, Y.H. Huh, H.R. Kim (2016), "Induction of autophagy in the striatum and hypothalamus of mice after 835 MHz radiofrequency exposure", *PLOS ONE*, **11**(4), DOI: 10.1371/journal.pone.0153308.

[17] S. Bang, H. Shin, H. Song, C.S. Suh, H.J. Lim (2014), "Autophagic activation in vitrified-warmed mouse oocytes", *Reproduction*, **148**(1), DOI: 10.1530/REP-14-0036.

[18] A.M. Sousa, T. Liu, O. Guevara, J. Stevens, B.L. Fanburg,

M. Gaestel, et al. (2007), "Smooth muscle α -actin expression and myofibroblast differentiation by TGF β are dependent upon MK2", *J. Cell Biochem.*, **100**(6), pp.1581-1592.

[19] L. Wu, Q. Zhang, W. Mo, J. Feng, S. Li, J. Li, et al. (2017), "Quercetin prevents hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and reducing autophagy via the TGF- β 1/Smads and PI3K/Akt pathways", *Scientific Reports*, **7**(1), pp.1-13.

[20] L. Liu and L. Gudas (2005), "Disruption of the lecithin: retinol acyltransferase gene makes mice more susceptible to vitamin A deficiency", *J. Biol. Chem.*, **280**(48), pp.40226-40234.

[21] N.T.M. Dan, T.H. Nhung, N.T. Linh, L.T. Thanh, P. Van Phuc (2017), "Evaluation of effects of Lingzhi mushroom (*Ganoderma lucidum*) on neural stem cells isolated from embryonic mouse brain (*Mus musculus* var. albino)", *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, **19**, pp.181-189.

[22] V. Hernández-Gea, Z. Ghiassi-Nejad, R. Rozenfeld, R. Gordon, M.I. Fiel, Z. Yue, et al. (2012), "Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues", *Gastroenterology*, **142**(4), pp.938-946.

[23] W. Chen, Z. Zhang, Z. Yao, L. Wang, F. Zhang, J. Shao, et al. (2018), "Activation of autophagy is required for Oroxylin A to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation", *International Immunopharmacology*, **56**, pp.148-155.

[24] S. Weiskirchen, C.G. Tag, S. Sauer-Lehnen, F. Tacke, R. Weiskirchen (2017), "Isolation and culture of primary murine hepatic stellate cells", *Methods Mol. Biol.*, pp.165-191, DOI: 10.1007/978-1-4939-7113-8_11.

[25] P. Maschmeyer, M. Flach, F. Winau (2011), "Seven steps to stellate cells", *Journal of Visualized Experiments*, **51**, DOI: 10.3791/2710.

[26] D.O. Minchenko, D. Tsybal, O. Yavorovsky, N. Solokha, O.H. Minchenko (2017), "Expression of genes encoding IGFBPs, SNARK, CD36, and PECAM1 in the liver of mice treated with chromium disilicide and titanium nitride nanoparticles", *Endocr. Regul.*, **51**(2), pp.84-95.

[27] M. Nitou, K. Ishikawa, N. Shiojiri (2000), "Immunohistochemical analysis of development of desmin-positive hepatic stellate cells in mouse liver", *J. Anat.*, **197**(4), pp.635-646.

[28] L. Atzori, G. Poli, A. Perra (2009), "Hepatic stellate cell: a star cell in the liver", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **41**(8-9), pp.1639-1642.

[29] H.L. Reeves and S.L. Friedman (2002), "Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis", *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, **7**(4), pp.808-826.

[30] Y. Yokoi, T. Namihisa, H. Kuroda, I. Komatsu, A. Miyazaki, S. Watanabe, et al. (1984), "Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells)", *Hepatology*, **4**(4), pp.709-714.

[31] L. Gao, Lv Gang, X. Guo, Y. Jing, Z. Han, S. Zhang, et al. (2014), "Activation of autophagy protects against cholestasis-induced hepatic injury", *Cell & Bioscience*, **4**(1), DOI: 10.1186/2045-3701-4-47.