

Nghiên cứu tác động của chloroquine ức chế sự tự thực bào ảnh hưởng đến quá trình hoạt hóa tế bào hình sao gan sơ cấp *in vitro*

Phạm Trần Huyền Trân¹, Phan Trọng Nhân¹, Lê Văn Trình^{2,3}, Đặng Minh Thành^{2,3}, Trương Hải Nhung^{2,3,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Bài báo trình bày việc phân lập quần thể tế bào hình sao gan (HSC) sơ cấp nhằm khảo sát tác động của chloroquine (CQ) lên hoạt động tự thực trong quá trình hoạt hóa quần thể tế bào hình sao gan (HSC) sơ cấp *in vitro*. Tế bào HSC sau khi phân lập, được đánh giá hiệu suất phân lập qua số lượng tế bào và các đặc tính đặc trưng của tế bào HSC như kích thước, khả năng dự trữ giọt lipid bằng nhuộm Oil Red O (ORO), biểu hiện desmin qua nhuộm Immunocytochemistry (ICC), hình thái thay đổi trong quá trình hoạt hóa khi nuôi cấy HSC *in vitro*. HSC sau khi được phân lập 1 ngày được xử lý với CQ nồng độ 10 μM trong 24 giờ. Tác động của CQ lên sự tự thực bào và quá trình hoạt hóa tế bào HSC được đánh giá thông qua hình thái, mức độ biểu hiện của protein I α 3, p62, α -sma, Collagen I (col) bằng nhuộm ICC. Kết quả cho thấy CQ ở nồng độ 10 μM đã gây ức chế tự thực bào, làm tăng biểu hiện protein I α 3 ($43,31 \pm 1,61\%$) và p62 ($61,28 \pm 2,64\%$) so với đối chứng ($p < 0,05$) ở ngày 2. Đồng thời, CQ 10 μM ức chế quá trình hoạt hóa HSC thông qua hình thái chưa chuyển dạng hoàn toàn thành các nguyên bào sợi cơ ở ngày 7 so với đối chứng; giảm biểu hiện α -sma ($24,17 \pm 7,40\%$) và col I ($18,05 \pm 0,49\%$) ở ngày 7 so với đối chứng ($p < 0,05$). Kết quả nghiên cứu bước đầu xác định mối quan hệ giữa hoạt động tự thực và quá trình hoạt hóa HSC, từ đó hướng đến các biện pháp nhằm trúng đích trong điều trị các bệnh về gan trong tương lai.

Từ khoá: chloroquine, tự thực, quá trình hoạt hóa tế bào hình sao gan (HSC)

1 MỞ ĐẦU

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, Việt Nam

²Phòng thí nghiệm Y Sinh học tái tạo, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Liên hệ

Trương Hải Nhung, Phòng thí nghiệm Y Sinh học tái tạo, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam
Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam
Email: thnhung@hcmu.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 14-12-2022
- Ngày sửa đổi: 25-8-2023
- Ngày chấp nhận: 12-9-2024
- Ngày đăng:

DOI:



Theo PGS.TS. Trịnh Thị Ngọc, Phó Chủ tịch Hội Gan mật Việt Nam, tỷ lệ mắc viêm gan virus ở Việt Nam vào khoảng 10–15% dân số. Viêm gan B là nguyên nhân gây ra hơn 80% số ca bệnh về gan như xơ gan, suy gan, ung thư gan. Theo số liệu thống kê ở Việt Nam trên trang Sở Y Tế Hà Nội cập nhật ngày 20/10/2022, mỗi năm Việt Nam ghi nhận khoảng hơn 10 triệu người nhiễm virus viêm gan B và C; 8 triệu người trong tình trạng viêm gan, xơ gan hoặc ung thư gan. Ngoài ra, Tổ chức Y tế thế giới (WHO) ghi nhận có 1.100.000 trường hợp tử vong mỗi năm do viêm gan B và C. Theo nhiều nghiên cứu trước đây, quá trình tiến triển từ gan bị tổn thương đến ung thư gan thì giai đoạn xơ hóa là giai đoạn được quan tâm vì ở giai đoạn này nếu được chữa trị kịp thời có thể giúp gan khôi phục lại khỏe mạnh trước khi bệnh đi vào giai đoạn “chai” gan và đến ung thư gan. Do đó, việc tìm hiểu và nghiên cứu về bệnh lý, các cơ chế và yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình tiến triển bệnh gan; nhất là ở giai đoạn xơ hóa khi gan còn khả năng phục hồi đóng vai trò mấu chốt để phát triển các phương pháp điều trị xơ gan. Các nhà khoa học hiện nay phát hiện ra dấu hiệu đặc trưng ở gan bị xơ hóa là sự hình thành các nguyên bào sợi cơ (MFB) được

biệt hóa đa phần từ tế bào hình sao gan (HSC hepatic stellate cell) được kích hoạt.

HSC là một loại tế bào chiếm 5–8% số lượng trong gan, với hình dạng nhiều nhánh nhô ra từ tế bào chất giống như “hình sao”, có protein desmin cấu tạo nên khung xương đặc trưng cho HSC. Ở điều kiện gan khỏe mạnh, HSC ở trạng thái “im lặng” và có khả năng dự trữ giọt lipid. Nhưng khi gan bị tổn thương, HSC được kích hoạt có khả năng tăng sinh mạnh, mất dần các giọt lipid, chuyển sang kiểu hình nguyên bào sợi cơ và tiết ra các chất gây tích lũy collagen¹⁻³. Quá trình này gọi là quá trình hoạt hóa HSC.

Gần đây, nhiều nghiên cứu cho thấy tác động vào con đường tự thực ảnh hưởng tới sự hoạt hóa HSC. Thử nghiệm loại bỏ phân tử liên quan tới quá trình tự thực như ATG5 hoặc ATG7 (autophagy related gene) trong HSC làm giảm sự hoạt hóa HSC và xơ hóa gan⁴. Ngược lại, cảm ứng tự thực bào bởi điều kiện môi trường như stress lưới nội chất hay stress oxy hóa dẫn đến thúc đẩy HSC hoạt hóa, tăng cường xơ hóa^{5,6}. Hơn thế nữa, sự tự thực lipid (lipophagy) được chứng minh là con đường tiêu hủy giọt lipid trong quá trình hoạt hóa HSC⁷.

Vai trò của tự thực bào trong sự hoạt hóa HSC được chỉ ra là con đường nội bào giúp cung cấp năng lượng cho quá trình chuyển dạng của tế bào⁸. Thật vậy, sự tự

Trích dẫn bài báo này: Trân P T H, Nhân P T, Trình L V, Thành D M, Nhung T H. **Nghiên cứu tác động của chloroquine ức chế sự tự thực bào ảnh hưởng đến quá trình hoạt hóa tế bào hình sao gan sơ cấp *in vitro*.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2024; ():1-10.

Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



thực là một quá trình tái sử dụng các acid amine, carbohydrate và acid béo thông qua sự hình thành thể tự thực để phân giải vật chất đáp ứng nhu cầu cần thiết của tế bào trong điều kiện thiếu dinh dưỡng. Hoạt động tự thực được thực hiện với sự tham gia của các gene và protein liên quan, thí dụ như: LC3, Beclin, ATG5, ATG7, ATG12, v.v.⁹. Giả thuyết đặt ra là nếu sử dụng các phương pháp được lý để ức chế các gene và protein liên quan đến con đường tự thực thì có thể ảnh hưởng như thế nào đến quá trình hoạt hóa HSC. Một số hóa chất được sử dụng rộng rãi để ức chế giai đoạn cuối của quá trình tự thực như chloroquine (CQ), bafilomycin A1 (BafA1) và một số loại chất ức chế protease của lysosome. Trong đó, CQ là thuốc được FDA chấp thuận sử dụng trong điều trị lâm sàng nhằm điều trị ung thư thông qua ức chế tự thực¹⁰.

Tuy nhiên, nghiên cứu *in vitro* đa phần sử dụng các dòng tế bào HSC bắt từ được thương mại hóa trên thị trường như: LX-2, HSC-T6, JS1. Do đó, nghiên cứu không thể theo dõi được diễn biến quá trình hoạt hóa của dòng tế bào HSC từ lúc chúng còn im lặng cũng như không phản ánh được hiệu quả của việc sử dụng các thuốc điều trị ức chế quá trình hoạt hóa ở giai đoạn đầu. Vì vậy, nghiên cứu việc sử dụng các tác nhân ức chế sự tự thực như CQ nhằm khảo sát ảnh hưởng lên quá trình hoạt hóa HSC sơ cấp là cần thiết. Bài báo trình bày việc khảo sát tác động của CQ 10 μM trên HSC để đánh giá mối liên hệ giữa tự thực và sự hoạt hóa trên HSC.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Chuột BALB/c *Albino*, khỏe mạnh trên 4 tháng tuổi, khối lượng từ 20-30 gram. Chuột được nuôi tại Phòng thí nghiệm chăm sóc và sử dụng động vật, Viện Tế Bào Gốc, Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM, trong hệ thống chuồng sạch, cho ăn cám viên và nước uống tự do với chu kỳ 12 giờ sáng – 12 giờ tối. Việc sử dụng động vật trong nghiên cứu được sự cho phép của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu trên động vật, Viện Tế Bào Gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM (mã số 200501/SCI-AEC).

Phân lập tế bào HSC từ gan chuột

Quy trình gồm 3 giai đoạn chính: (i) Truyền EGTA (Sigma, Mỹ) và dịch enzyme (pronase E (Merck, Đức), collagenase D (Roche Diagnostics, Đức) vào các mạch của gan giúp loại bỏ máu và phân tách tế bào; (ii) Phân tách mô gan thành các tế bào đơn bằng cách xé gan, thêm enzyme (pronase, collagenase và dnase I, Roche,

Đức) lắc đều và ủ trong 20 phút, 37°C. Lọc gan qua màng 70 μm , ly tâm rửa bằng GBSS/B 700g/8 phút và ly tâm 50g/3 phút để loại bỏ nhu mô gan (hepatocyte); (iii) Làm giàu quần thể tế bào HSC bằng ly tâm đẳng tỷ trọng Nycodenz 9,6% (Axis-shield, Scotland) với tốc độ 1400 g/17 phút. Thu nhận lớp chứa tế bào mục tiêu giữa 2 phân lớp và ly tâm rửa bằng GBSS/B 700g/8 phút. Quy trình được tham khảo từ Mederacke và cộng sự 2015¹¹ và đã được chỉnh sửa để phù hợp với điều kiện thực tế trong phòng thí nghiệm.

Nuôi cấy tế bào HSC *in vitro* và xử lý CQ trên tế bào

HSC phân lập được nuôi cấy trong DMEM (Sigma, Mỹ) với 10% FBS (Sigma, Mỹ), 1% kháng sinh penicillin/streptomycin (Gibco, Mỹ) để tế bào bám lên đĩa trong 24 giờ. Sau 24 giờ, cho CQ (Sigma, Mỹ) với nồng độ 10 μM ¹²⁻¹⁵ vào giếng nuôi cấy tế bào. Sau 24 giờ xử lý CQ, loại bỏ môi trường cũ chứa CQ thay bằng môi trường nuôi cấy và đánh giá ở các mốc nuôi cấy 2, 7 ngày tương đương sau xử lý CQ 1, 6 ngày (Hình 1).

Đánh giá mức độ dự trữ giọt lipid bằng Oil Red O

Tế bào được cố định bằng paraformaldehyde 1% (Merck, Đức) ít nhất 15 phút. Sau đó, tế bào được rửa lại với isopropanol (Merck, Đức) trong 10 phút. Nhuộm tế bào với Oil Red O [dung dịch ORO (Sigma, Mỹ) 0,5% pha loãng với nước cất tỷ lệ (3:2) trong 20 phút, rửa lại tế bào với PBS và quan sát dưới kính hiển vi. Diện tích bắt màu với ORO được định lượng bằng cách dùng phần mềm Image J (NIH, Mỹ).

Đánh giá mức độ biểu hiện protein bằng nhuộm hóa tế bào miễn dịch (ICC)

Tế bào được cố định bằng paraformaldehyde 1% và rửa lại bằng PBS. Sau đó, tế bào được ủ với dung dịch đục lỗ màng trong 10 phút, nhiệt độ phòng. Tiếp theo, tế bào được ủ với dung dịch khóa các vị trí không đặc hiệu trong 30 phút (PBS, 1% BSA và 4% huyết thanh dê), nhiệt độ phòng. Tiếp tục đưa tế bào ủ với kháng thể sơ cấp như: Desmin (ab8592, Abcam, Hoa Kỳ), lc3 (ab128025, Abcam, Mỹ), p62 (ab91526, Abcam, Mỹ), α -sma (ab15734, Abcam, Hoa Kỳ), col ở 4°C qua đêm và tránh sáng, rửa lại bằng PBS. Nhuộm kháng thể thứ cấp gắn huỳnh quang Alexa Fluor 488 (ab150077, Abcam, Hoa Kỳ) trong 1 giờ tránh sáng, rửa lại bằng PBS. Cuối cùng, tế bào được nhuộm DAPI trong 15 phút. Hình ảnh huỳnh quang được chụp bằng hệ thống kính hiển vi huỳnh quang (Zeiss, Đức).

150 Tổng lượng huỳnh quang tế bào đã hiệu chỉnh (CTCF
151 - corrected total cell fluorescence) được tính theo
152 công thức:

$$CTCF = ID - (AOSC \times MFOBR)$$

153 Trong đó, ID (Integrated Density): Độ phát huỳnh
154 quang của từng vùng tế bào đã chọn AOSC (Area of
155 selected cell): Diện tích vùng đã chọn MFOBR (Mean
156 fluorescence of background readings): Độ phát huỳnh
157 quang trung bình của nền ảnh.

158 Phần trăm tổng lượng huỳnh quang tế bào đã hiệu
159 chỉnh của các lô thử nghiệm tăng so với đối chứng
160 (% CTCF) được tính theo công thức:

$$\%CTCF = \frac{(CTCF_1 - CTCF_0)}{CTCF_0} \times 100$$

161 Trong đó, CTCF₁: Số lượng tế bào trong các lô xử lý
162 CQ CTCF₀: Số lượng tế bào trong lô đối chứng không
163 xử lý CQ.

164 Các lô thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại
165 gồm 3 thị trường khác nhau với CTCF là tổng 30 tế
166 bào được định lượng.

167 Xử lý thống kê

168 Tất cả số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SD
169 (Mean: giá trị trung bình, SD: độ lệch chuẩn). Phân
170 tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm Graph-
171 pad Prism. Sự khác biệt có ý nghĩa được kiểm tra bằng
172 t- tests với giá trị p < 0,05.

173 KẾT QUẢ

174 Hiệu quả phân lập và nuôi cấy HSC từ chuột

175 Dựa vào sự khác biệt về kích thước tế bào HSC và
176 các quần thể tế bào khác trong gan, đếm và ghi nhận
177 số lượng tế bào HSC sống sót ở các lần phân lập dựa
178 trên quan sát kính hiển vi và nhuộm trypan blue. Ở
179 Hình 2A,B những tế bào tròn sáng không bị nhuộm
180 màu và đạt kích thước từ 12–20 μm là những tế bào
181 mục tiêu trong quần thể phân lập¹⁶. Kết quả số lượng
182 HSC thu được trong mỗi lần phân lập bằng ly tâm
183 đẳng tỷ trọng Nycodenz 9,6% với hiệu suất phân lập
184 là (0,48 ± 0,04) × 10⁶ tế bào/ gram. Kết quả nhuộm
185 tế bào với Oil Red O cho thấy HSC dự trữ nhiều
186 giọt lipid với kích thước khác nhau trong tế bào chất
187 (Hình 2C). Lượng giọt lipid giữa các tế bào cũng có sự
188 khác nhau. Kết quả nhuộm ICC bằng marker Desmin
189 cho thấy số tế bào dương tính với Desmin chiếm 97,03
190 ± 1,30%, trong đó có 11 ± 1,84% dương tính mạnh
191 trong % dương tính. Có thể thấy sự biểu hiện marker
192 desmin ở quần thể tế bào HSC là không đồng nhất
193 (Hình 2D). Đa số các tế bào có biểu hiện dương tính
194 mạnh (chiếm 11 ± 1,84%) biểu hiện tín hiệu dạng sợi

195 và phủ từ tế bào chất kéo dài đến các nhánh tế bào.
196 Số tế bào dương tính còn lại biểu hiện dương tính yếu
197 hơn và phát quang tại tế bào chất ở một số vị trí. Các
198 kết quả trên giúp xác định quy trình phân lập quần
199 thể tế bào HSC từ mô gan chuột đã thành công, phân
200 lập HSC có độ tinh sạch cao.

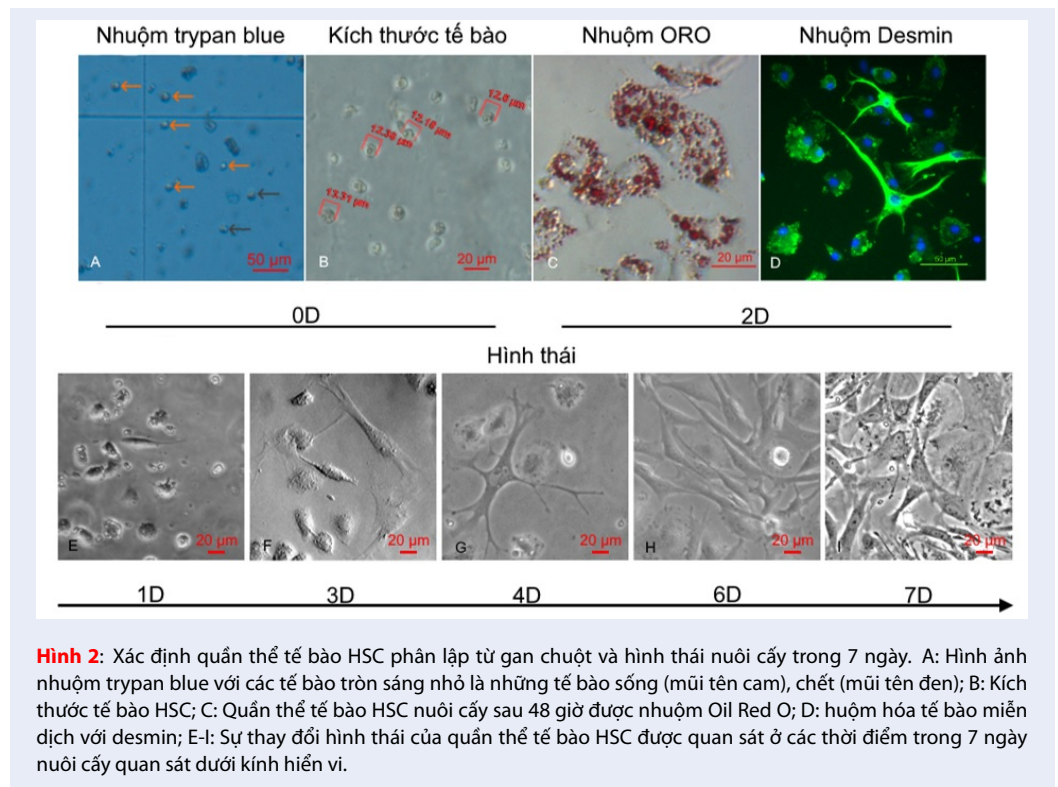
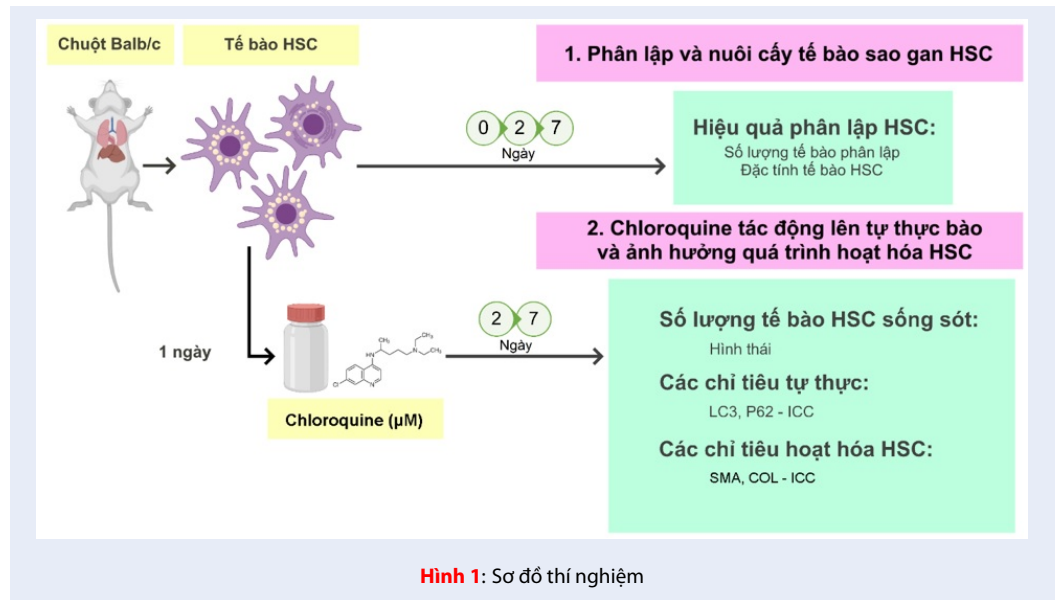
201 Về hình thái, quần thể tế bào HSC phân lập được quan
202 sát có sự thay đổi rõ rệt về hình dạng trong 7 ngày nuôi
203 cấy. Sau một ngày nuôi cấy, một số tế bào bắt đầu có
204 sự bám trải, có các nhánh nhỏ ngắn và kéo dài ra xung
205 quanh, tế bào có hình dạng như “hình sao” và các tế
206 bào còn lại ở dạng tròn do chưa khôi phục sau quá
207 trình phân lập. Và đến ngày 7, các tế bào HSC đa số
208 có hình dạng dẹt, trải rộng, nhân to, giống hình dạng
209 của các tế bào nguyên bào sợi chiếm đa số trong quần
210 thể tế bào (Hình 2E-I).

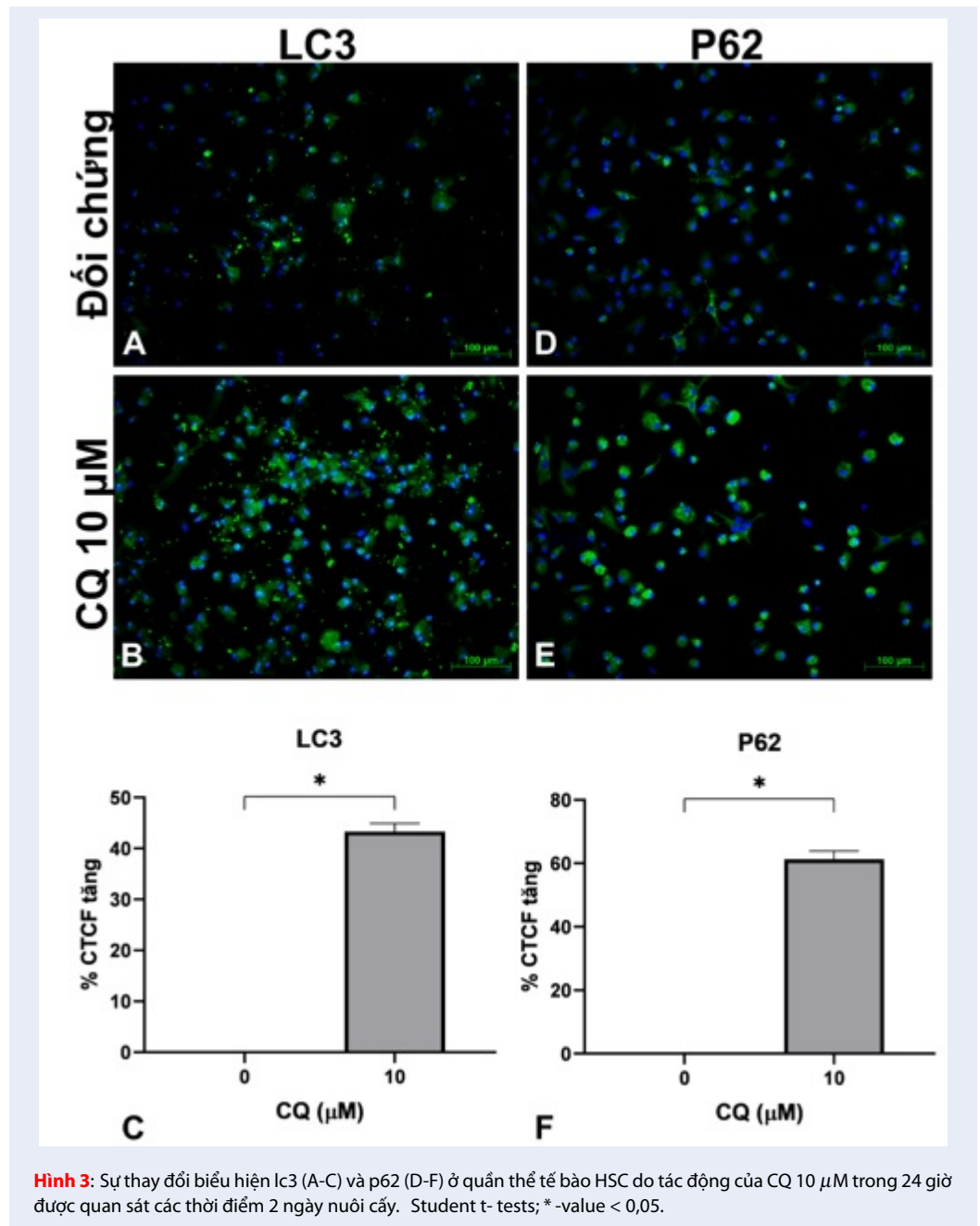
211 CQ ức chế sự tự thực bào ở quần thể tế bào 212 HSC sơ cấp *in vitro*.

213 CQ làm tăng biểu hiện lc3 ở mức độ protein
214 (Hình 3A-C). Ở ngày 2 nuôi cấy sau khi xử lý với CQ
215 24 giờ, lc3 trong quần thể tế bào xử lý CQ 10 μM tăng
216 biểu hiện so với đối chứng (43,31 ± 1,61%). CQ làm
217 tăng biểu hiện p62 ở mức độ protein (Hình 3D-F). Ở
218 ngày thứ 2 nuôi cấy sau khi xử lý với CQ 24 giờ, p62
219 trong quần thể tế bào xử lý CQ 10 μM tăng biểu hiện
220 so với đối chứng (61,28 ± 2,64%).

221 CQ có tác động ức chế quá trình hoạt hóa 222 HSC sơ cấp *in vitro*.

223 Ở Hình 4A-D, hình thái tế bào HSC có sự thay đổi
224 theo thời gian. Ở ngày 2 nuôi cấy sau khi xử lý với
225 CQ 24 giờ, những tế bào không xử lý với CQ có các
226 nhánh kéo dài hơn và đa số các tế bào đều bám trải tốt.
227 Một số các tế bào xử lý với CQ 10 μM cũng có sự kéo
228 dài của các nhánh nhưng ngắn và mảnh hơn; các tế
229 bào còn lại thì vẫn bám trải yếu và vẫn còn các tế bào
230 co tròn. Ở ngày 7 nuôi cấy, các tế bào không xử lý với
231 CQ đa phần đã chuyển sang hình dạng nguyên bào sợi
232 cơ: có tế bào lớn, dẹt và trải rộng; có tế bào hình thoi
233 dài. Các tế bào xử lý với CQ 10 μM thì hầu như không
234 thấy rõ sự chuyển dạng của tế bào; đa phần là các tế
235 bào có hình dạng HSC kích hoạt phân nhánh, nhỏ
236 hoặc vẫn còn hình dạng co tròn. Từ các kết quả trên
237 có thể thấy, CQ trì hoãn quá trình chuyển dạng của
238 HSC. CQ làm giảm biểu hiện α-sma và col I ở mức
239 độ protein. Ở ngày 7 nuôi cấy, α-sma trong quần thể
240 tế bào xử lý CQ 10 μM giảm so với tế bào đối chứng
241 không xử lý tương ứng là 24,17 ± 7,40%. Ở lô đối
242 chứng, nhiều tế bào biểu hiện α-sma thành các cụm
243 sợi đan xen nhau, là bằng chứng thể hiện HSC kích
244 hoạt và đang trong quá trình chuyển dạng. Ở các lô



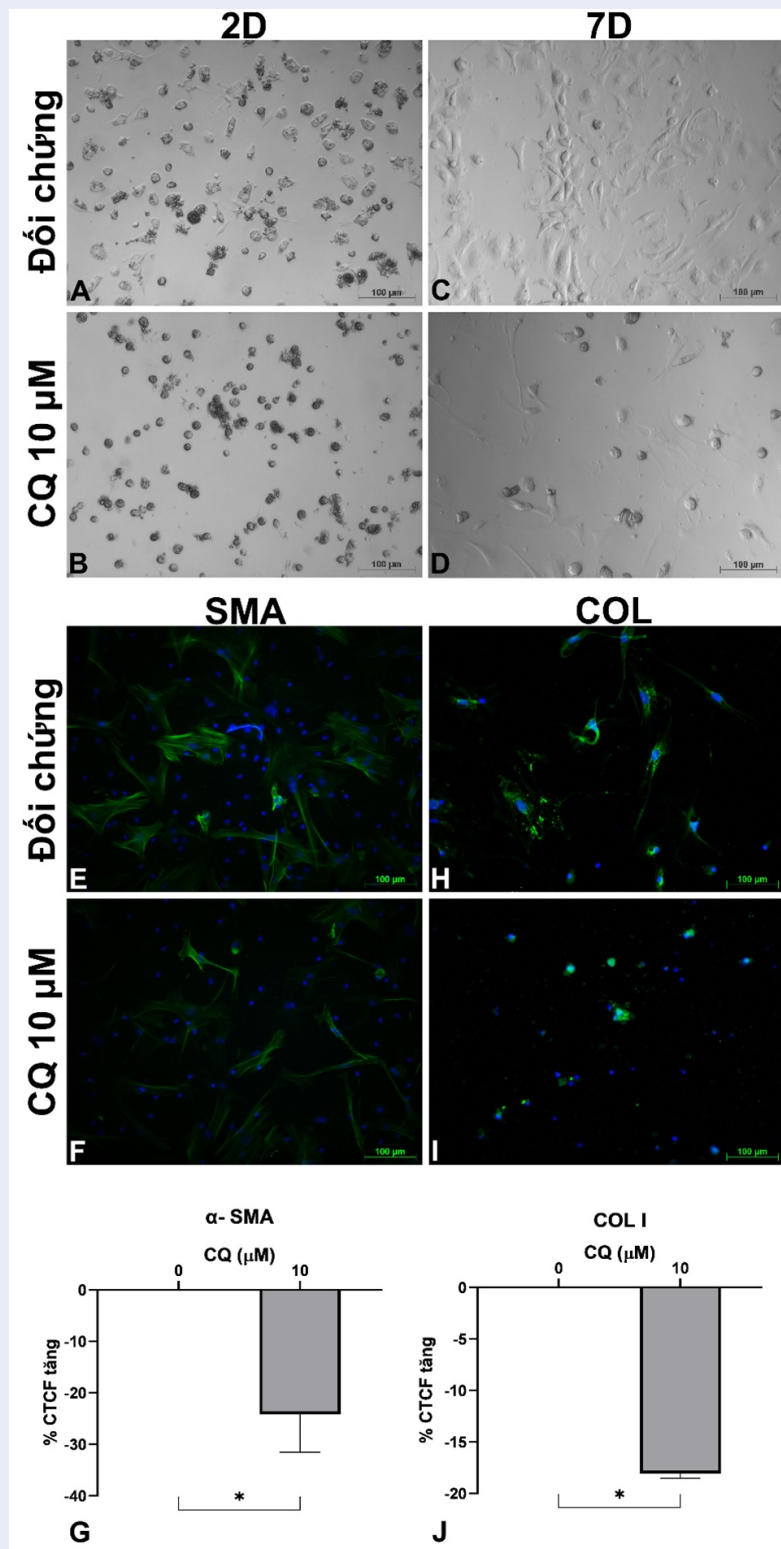


245 có xử lý CQ, các tế bào biểu hiện α -sma yếu, ít tạo
 246 thành các cụm sợi thậm chí là không hình thành cụm
 247 sợi mà chỉ bắt theo khung xương tế bào (Hình 4E-G).
 248 Bên cạnh đó, ở ngày 7 nuôi cấy, col I trong quần thể
 249 tế bào xử lý CQ ở các nồng độ 10 μM có sự giảm biểu
 250 hiện so với tế bào đối chứng không xử lý tương ứng
 251 là 18,05 ± 0,49%. Trên Hình 4 có thể thấy, col I biểu
 252 hiện thành các đốm sáng mạnh với diện tích lớn xung
 253 quanh rìa tế bào ở lô đối chứng trong khi lô xử lý CQ
 254 10 μM có các đốm sáng ít và diện tích phát sáng nhỏ

(Hình 4H-J).

THẢO LUẬN

Việc tạo mô hình nuôi cấy tế bào HSC sơ cấp phân
 lập từ gan chuột là điều cần thiết để mô phỏng lại quá
 trình gan bị tổn thương dẫn đến xơ gan. Kết quả đã
 thành công phân lập HSC sơ cấp với hiệu suất, độ tinh
 sạch cao; và nuôi cấy HSC sơ cấp *in vitro* tạo mô hình
 thử thuốc hoặc các tác nhân điều trị xơ hóa gan. Kết
 quả phân lập này có sự tương đồng với các công trình



Hình 4: Sự thay đổi hình thái (A-D) ở mốc 2, 7 ngày và biểu hiện α -sma (E-G) và col I (H-J) ở quần thể tế bào HSC do tác động của CQ 10 μ M xử lý 24 giờ được quan sát ở thời điểm 7 ngày. * t- tests; $p < 0,05$.

264 nghiên cứu khác, thí dụ như: ở chủng chuột C57BL/6,
 265 Patrick Maschmeyer và cộng sự (2011) khi sử dụng
 266 Nycodenz, phân lập tế bào HSC đạt hiệu suất là $2 \times$
 267 10^5 tế bào/ gan chuột trong khi Alexandre Balaphas
 268 và cộng sự (2022) thực hiện phân lập đạt hiệu suất
 269 350.595 ± 100.773 tế bào HSC trên gan chuột^{17,18}.
 270 Ngoài ra, theo Ingmar Mederacke và cộng sự (2015),
 271 quy trình phân lập từ chuột BALB/c cho hiệu suất
 272 phân lập cao hơn chuột C57BL/6J do các yếu tố di
 273 truyền bên cạnh các yếu tố ảnh hưởng khác như tuổi
 274 tác chuột, enzyme sử dụng phân tách gan, hóa chất
 275 ly tâm đẳng tỷ trọng. Tác giả cho rằng quy trình phân
 276 lập từ chuột BALB/c khỏe mạnh 12 tuần tuổi cho hiệu
 277 suất phân lập là 2–3 triệu tế bào/ chuột và độ tinh sạch
 278 từ 90–98%¹¹.
 279 Như đã đề cập; quần thể tế bào HSC có khả năng dự
 280 trữ giọt lipid, có desmin là protein cấu tạo nên khung
 281 xương tế bào, là những đặc điểm của tế bào HSC. Do
 282 đó, nhuộm Oil Red O và nhuộm ICC Desmin giúp xác
 283 định tế bào mục tiêu trong quần thể tế bào phân lập
 284 và xác định độ tinh sạch của quần thể tế bào này¹⁸⁻²¹.
 285 Kết quả cho thấy có tế bào dự trữ nhiều giọt lipid tập
 286 trung quanh nhân trong khi có tế bào chỉ rải rác các
 287 giọt lipid nhỏ hơn trong tế bào chất hoặc tế bào chưa
 288 bám trải nhiều sẽ dự trữ giọt lipid gom thành một
 289 cụm lớn¹⁶. Bên cạnh đó, sự khác biệt trong dự trữ
 290 giọt lipid cũng như biểu hiện marker Desmin cho thấy
 291 quần thể tế bào HSC phân lập được là một quần thể tế
 292 bào không đồng nhất. Những kết quả này cũng phù
 293 hợp với những nghiên cứu trước đây của nhóm cũng
 294 như các nghiên cứu khác trong và ngoài nước^{16,17}.
 295 Theo họ, khả năng dự trữ giọt lipid hay hàm lượng
 296 Desmin trong các tế bào HSC có sự khác biệt do phụ
 297 thuộc vào vị trí của các tế bào trong thùy gan, tuổi của
 298 tế bào và trạng thái chức năng của tế bào. Thí dụ như;
 299 các tế bào HSC quanh tĩnh mạch cửa ở vùng ngoại
 300 vi tiểu thùy chứa nhiều vitamin A hơn, và biểu hiện
 301 desmin nhiều hơn các tế bào HSC vùng tĩnh mạch
 302 trung tâm tiểu thùy^{22,23}.
 303 Thứ hai, CQ gây ức chế quá trình tự thực bào thông
 304 qua biểu hiện tăng LC3, P62 khi nhuộm ICC. Lc3 và
 305 p62 là hai phân tử được lựa chọn để đánh giá do vai
 306 trò quan trọng của nó liên quan tới tiến trình tự thực
 307 bào. Cụ thể, lc3 là phân tử tham gia vào quá trình hình
 308 thành màng của thể tự thực, qua đó kéo dài và trưởng
 309 thành cấu trúc thể tự thực. lc3 trong tế bào chất tồn tại
 310 ở dạng lc3-1, khi quá trình tự thực diễn ra, lc3-1 được
 311 phân cắt thành lc3-2 và gắn đuôi lipid tạo màng trên
 312 thể tự thực. P62 là protein đánh dấu các phân tử/bào
 313 quan của tế bào cần được phân hủy để đưa các phân tử
 314 này vào thể tự thực thông qua phức hợp. Sự biểu hiện
 315 tăng của lc3 là một dấu hiệu đặc trưng của sự tự thực
 316 bào. Tuy nhiên, CQ có khả năng gây ức chế phản ứng

317 dung hợp lysosome-autophagosome, ngăn chặn quá
 318 trình autophagy ở giai đoạn cuối¹⁰. Do đó, CQ sẽ làm
 319 tăng thêm biểu hiện lc3 do bị tích trữ không thể phân
 320 hủy được. P62 là protein kết hợp vào autophagosome
 321 thông qua liên kết trực tiếp với lc3 và bị phân hủy bởi
 322 quá trình autophagy. Do đó, quá trình tự thực xảy ra
 323 sẽ làm lc3 tăng, P62 giảm²⁴. Vì vậy, p62 tăng là một
 324 biểu hiện của quá trình tự thực không xảy ra. Đúng
 325 như dự kiến CQ sẽ làm tăng thêm biểu hiện lc3 và
 326 p62 do bị tích trữ không thể phân hủy được²⁴⁻²⁷, lc3
 327 và p62 trong quần thể tế bào HSC sau 1 ngày phân lập
 328 xử lý CQ $10 \mu\text{M}$ trong 24 giờ đều có sự tăng biểu hiện
 329 so với tế bào đối chứng không xử lý; cho thấy tác động
 330 ức chế quá trình tự thực bào do sự tích tụ của lc3 và
 331 p62 ở mốc thời gian ngày 2. Kết quả trên tương đồng
 332 với nghiên cứu của Virginia Hernandez Gea và cộng
 333 sự (2012) cho rằng CQ làm tăng lc3 II, p62 do sự tích
 334 tụ không thoái hóa được của các thể autophagosome
 335 qua việc đánh giá biểu hiện lc3, p62 bằng Western Blot
 336 (WB) nhưng được thực hiện và quan sát ở dòng tế bào
 337 HSC hoạt hóa bắt từ JS1 với CQ nồng độ 10 mM/L
 338 trong 12 giờ⁴. Yuepeng Jin và cộng sự (2016) cũng sử
 339 dụng CQ $5 \mu\text{M}$ trong 12 giờ gây ức chế tự thực qua
 340 biểu hiện tăng tích tụ lc3²⁴. Tương tự, Hye-Young
 341 Seo và cộng sự (2020) dùng CQ $10 \mu\text{M}$ trong 24 giờ
 342 làm tăng biểu hiện lc3, gây ức chế tự thực trên dòng
 343 tế bào gan từ chuột AML12¹³.
 344 Thứ ba, CQ gây ức chế quá trình hoạt hóa tế bào HSC
 345 sơ cấp nuôi cấy *in vitro*. Sự thay đổi hình dạng tế
 346 bào HSC trong quá trình nuôi cấy *in vitro* cho thấy
 347 tế bào HSC sơ cấp trên có sự biệt hóa thành các tế
 348 bào hình dạng như nguyên bào sợi trong thời gian
 349 nuôi cấy 7 ngày tương tự như mô tả ở các nghiên cứu
 350 trước^{13,18,28}. Và tại mốc thời gian này, tế bào biểu
 351 hiện mạnh protein α -sma, một dấu hiệu đặc trưng
 352 của nguyên bào sợi trưởng thành. Ngoài ra, HSC hoạt
 353 hóa tiết ra collagen (hơn 80% là collagen loại I), đồng
 354 nghĩa việc HSC ở ngày thứ bảy biểu hiện mạnh pro-
 355 tein col I. Vì vậy, α -sma và col I là 2 dấu hiệu được
 356 nhiều nghiên cứu sử dụng để xác định sự hoạt hóa
 357 của HSC^{20,24,27,29}. Theo nghiên cứu của chúng tôi,
 358 HSC biểu hiện mạnh α -sma và col I khi nuôi cấy 7
 359 ngày tương đồng với các nghiên cứu trước^{13,16,18,28}.
 360 Trong khi, quần thể tế bào HSC sau 1 ngày phân lập
 361 xử lý CQ $10 \mu\text{M}$ trong 24 giờ giảm biểu hiện α -sma và
 362 col I so với tế bào đối chứng không xử lý ở mốc ngày
 363 7. Đồng thời, khi phân tích về hình thái, các tế bào xử
 364 lý với CQ ở nồng độ $10 \mu\text{M}$ thì hầu như không thấy
 365 rõ sự chuyển dạng của tế bào so với mẫu đối chứng
 366 nuôi cấy bình thường. Các tế bào xử lý CQ giữ hình
 367 dạng hơi co lại, hoặc bám trải trên bề mặt đĩa với các
 368 tua nhánh dài và nhỏ trong khi tế bào nuôi cấy bình
 369 thường có hình dạng dẹt, trải rộng, nhân to hoặc hình

370 dạng thon dài, gần giống hình dạng nguyên bào sợi¹⁶.
 371 Kết quả trên tương đồng với nghiên cứu của Virginia
 372 Hernandez Gea và cộng sự (2012) cho rằng CQ làm
 373 giảm các dấu hiệu đặc trưng cho sự hoạt hóa dòng tế
 374 bào HSC bắt từ JS1 như: α -sma, col1, β -pdgfr, mmp-
 375 2 qua đánh giá WB⁴. Tương tự, Jing Deng và cộng sự
 376 (2014) sử dụng CQ 50 μ M trong 3 giờ gây ức chế tăng
 377 biểu hiện α -sma trong 15 phút và 1 giờ trong điều kiện
 378 thiếu oxy gây cảm ứng tự thực ở dòng tế bào LX-2³⁰.
 379 Theo một số nghiên cứu; quá trình hoạt hóa HSC
 380 thông qua biểu hiện thay đổi hình dạng, mất dự trữ
 381 giọt lipid, tăng sinh và tăng sản xuất các chất nền ngoại
 382 bào; xảy ra nhanh chóng trong nuôi cấy *in vitro* ở mô
 383 hình 2D trên đĩa nhựa. Các nghiên cứu sử dụng mô
 384 hình 3D, hay tạo ra các giá thể (như: gel giàu laminin)
 385 trắng trên bề mặt đĩa nhựa giúp duy trì kiểu hình tĩnh
 386 lặng của HSC cho thấy rằng độ cứng của bề mặt chất
 387 nền có thể là yếu tố quyết định trong sự hoạt hóa
 388 của tế bào HSC. Đồng thời, thành phần các chất nền
 389 ngoại bào có thể điều chỉnh tăng hoặc giảm quá trình
 390 hoạt hóa này (thí dụ: môi trường nuôi cấy có thành
 391 phần chất nền collagen I giúp tế bào HSC hoạt hóa
 392 thành nguyên bào sợi tốt hơn)²². Những nỗ lực để
 393 tinh chỉnh các yếu tố lý hóa trên hay hiểu thêm về các
 394 con đường truyền tín hiệu nội bào và ngoại bào với
 395 tế bào HSC ở trung tâm khi gan bị tổn thương cũng
 396 như chữa lành là rất quan trọng để biết thêm các chức
 397 năng của dòng tế bào HSC này. Từ đó, kết quả nghiên
 398 cứu này giúp hỗ trợ tìm ra các phương pháp điều trị
 399 trúng mục tiêu các thể loại bệnh về gan cũng như phát
 400 triển hệ thống nuôi cấy mô gan nhân tạo.
 401 Bài báo trình bày kết quả là CQ làm giảm số lượng tế
 402 bào HSC hoạt hóa, từ đó ức chế quá trình hoạt hóa tế
 403 bào HSC, làm tăng thêm thời gian cần để quần thể tế
 404 bào HSC chuyển dạng hoàn toàn. Đặc biệt, khi quần
 405 thể tế bào được xử lý CQ ở nồng độ 10 μ M nhiều tế
 406 bào HSC trong quần thể vẫn giữ trạng thái co tròn.
 407 Dựa vào kết quả này, một giả thuyết đặt ra là liệu đây
 408 có phải là những tế bào HSC im lặng và bất hoạt lâu
 409 dài, hay là những tế bào không thể kích hoạt và đang
 410 dần đi vào con đường apoptosis. Và nếu kéo dài thời
 411 gian nuôi cấy hơn 7 ngày thì những tế bào trên có thể
 412 bắt đầu hoạt hóa, trải các nhánh dài, tăng sinh và biệt
 413 hóa thành nguyên bào sợi không.
 414 Bên cạnh đó, việc sử dụng CQ trong quá trình điều
 415 trị bệnh xơ hóa gan cần phải cân trọng về liều lượng,
 416 thời gian, thời điểm tác động do CQ gây ra rất nhiều
 417 tác động phản ứng từ tế bào. Thí dụ như ở các dòng
 418 tế bào ung thư, CQ có tác động gây ức chế tự thực,
 419 cảm ứng tăng apoptosis, loại bỏ tế bào gốc ung thư
 420 hay tăng cường sự phát triển của tế bào ung thư, bình
 421 thường hóa hệ mạch của khối u, lưu trữ thuốc trị liệu
 422 trong các tế bào/ khối u, đáp ứng miễn dịch và tăng

423 cường trình bày chéo, ức chế miễn dịch, v.v.³¹. Theo
 424 hiểu biết của chúng tôi, các tác động của CQ lên HSC
 425 nói riêng, và của gan nói chung, vẫn còn nhiều mối
 426 quan hệ và tương tác chưa được làm rõ.

KẾT LUẬN

427
 428 Bài báo này trình bày việc phân lập quần thể tế bào sao
 429 gan từ chuột và nuôi cấy HSC *in vitro*. Bên cạnh đó,
 430 CQ ở nồng độ 10 μ M có tác động gây ức chế tự thực
 431 bào, đồng thời gây ức chế quá trình hoạt hóa HSC *in*
 432 *vitro*. Kết quả này cung cấp thêm bằng chứng về mối
 433 liên hệ giữa tự thực và quá trình hoạt hóa HSC sơ cấp
 434 *in vitro*, thúc đẩy nghiên cứu sâu hơn về cơ chế phân
 435 tử tác động qua lại giữa hai hoạt động này, từ đó ứng
 436 dụng vào điều trị các bệnh lý về gan.

LỜI CẢM ƠN

437
 438 Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa
 439 học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề
 440 tài mã số 108.05-2017.30.

VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU TRÊN ĐỘNG VẬT

441
 442 Tất cả các thí nghiệm trên động vật đã được cấp giấy
 443 chấp thuận của Hội đồng Đạo đức trên Động vật
 444 thuộc Viện Tế bào gốc của Trường Đại học Khoa học
 445 Tự nhiên, ĐHQG-HCM (Ref N0: 200501/SCI-AEC).
 446
 447

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

448
 449 COL I: Collagen I
 450 CQ: Chloroquine
 451 CTCF: Cường độ huỳnh quang tế bào (Corrected To-
 452 tal Cell Fluorescence)
 453 DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
 454 EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid
 455 EGTA Ethylene Glycol-Bis(β -Aminoethyl Ether)-
 456 N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
 457 FBS: Huyết thanh bào thai bò (Fetal Bovine Serum)
 458 GBSS/B: Gey's Balanced Salt Solution B
 459 HSC: Tế bào hình sao gan (Hepatic Stellate Cell)
 460 ICC: Nhuộm hoá tế bào miễn dịch (Immunocyto-
 461 chemistry)
 462 LDL: Giọt lipid (Lipid Droplet)
 463 ORO: Oil Red O
 464 PBS: Dung dịch muối đệm Phosphate (Phosphate
 465 Buffered Saline Dung)
 466 WB: Western Blot

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

467
 468 Các tác giả đồng ý không có bất kỳ xung đột lợi ích
 469 nào liên quan đến các kết quả đã công bố.
 470

470 ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

471 Phạm Trần Huyền Trân thực hiện thí nghiệm, thu
472 thập, xử lý dữ liệu, viết bản thảo.
473 Phan Trọng Nhân hỗ trợ các thí nghiệm thực nghiệm,
474 phân lập tế bào HSC.
475 Lê Văn Trình hỗ trợ thí nghiệm thực nghiệm, phân
476 lập tế bào, kế hoạch nghiên cứu.
477 Đặng Minh Thành hỗ trợ các thí nghiệm thực nghiệm.
478 phương pháp nghiên cứu.
479 Trương Hải Nhung đóng góp ý tưởng, định hướng
480 thiết kế nghiên cứu; góp ý, chỉnh sửa và hoàn thiện
481 bản thảo.

482 TÀI LIỆU THAM KHẢO

483 1. Alpini G, Phillips JO, Vroman B, LaRusso NF. Re-
484 cent advances in the isolation of liver cells. *Hepato-*
485 *logy*. 1994;20(2):494–514;Available from: <https://doi.org/10.1002/hep.1840200231>.
486
487 2. Hendriks HF, Verhoofstad WA, Brouwer A, de Leeuw
488 AM, Knook DL. Perisinusoidal fat-storing cells are
489 the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp*
490 *Cell Res*. 1985;160(1):138–49;Available from: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(85\)90243-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(85)90243-5).
491
492 3. Xu R, Zhang Z, Wang FS. Liver fibrosis: mechanisms
493 of immune-mediated liver injury. *Cell Mol Immunol*.
494 2012;9(4):296–301;Available from: <https://doi.org/10.1038/cmi.2011.53>.
495
496 4. Hernández-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel
497 MI, Yue Z, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibro-
498 genesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human
499 tissues. *Gastroenterology*. 2012;142(4):938–46;Available
500 from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.044>.
501
502 5. Hernández-Gea V, Hilscher M, Rozenfeld R, Lim MP, Nieto N,
503 Werner S, et al. Endoplasmic reticulum stress induces fibro-
504 genic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *J*
505 *Hepatol*. 2013;59(1):98–104;Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.016>.
506
507 6. Kim RS, Hasegawa D, Goossens N, Tsuchida T, Athwal V, Sun X,
508 et al. The XBP1 Arm of the unfolded protein response induces
509 fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy.
510 *Sci Rep*. 2016;6:39342;Available from: <https://doi.org/10.1038/srep39342>.
511
512 7. Umemura A, He F, Taniguchi K, Nakagawa H, Yamachika
513 S, Font-Burgada J, et al. p62, upregulated during preneo-
514 plasia, induces hepatocellular carcinogenesis by maintain-
515 ing survival of stressed HCC-initiating cells. *Cancer Cell*.
516 2016;29(6):935–48;Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.04.006>.
517
518 8. Allaire M, Rautou P-É, Codogno P, Lotersztajn SJJH. Au-
519 topophagy in liver diseases: time for translation? *J Hepatol*.
520 2019;70(5):985–98;Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.01.026>.
521
522 9. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular
523 mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*.
524 2009;335:1–32;Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_1.
525
526 10. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hi-
527 jlkema KJ, et al. Chloroquine inhibits autophagic
528 flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*.
529 2018;14(8):1435–55;Available from: <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>.
530
531 11. Mederacke I, Dapito DH, Affò S, Uchinami H, Schwabe
532 RF. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate
533 cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc*.
534 2015;10(2):305–15;Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.017>.

535 12. Mizui T, Yamashina S, Tanida I, Takei Y, Ueno T, Sakamoto
536 N, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by chloro-
537 quine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol*.
538 2010;45(2):195–203;Available from: <https://doi.org/10.1007/s00535-009-0132-9>.
539
540 13. Seo HY, Lee SH, Lee JH, Kang YN, Hwang JS, Park KG, et al. Src
541 inhibition attenuates liver fibrosis by preventing hepatic stel-
542 late cell activation and decreasing connective tissue growth
543 factor. *Cells*. 2020;9(3);Available from: <https://doi.org/10.3390/cells9030558>.
544
545 14. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Nari-
546 matsu K, et al. Free cholesterol accumulation in hep-
547 atic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation
548 in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*.
549 2014;59(1):154–69;Available from: <https://doi.org/10.1002/hep.26604>.
550
551 15. Wang F, Tang J, Li P, Si S, Yu H, Yang X, et al. Chloroquine
552 enhances the radiosensitivity of bladder cancer cells by in-
553 hibiting autophagy and activating apoptosis. *Cell Physiol*
554 *Biochem*. 2018;45(1):54–66;Available from: <https://doi.org/10.1159/000486222>.
555
556 16. Dang TM, Le TV, Do HQ, Nguyen VT, Holterman AXL, Dang
557 LTT, et al. Optimization of the isolation procedure and cultur-
558 ing conditions for hepatic stellate cells obtained from mouse.
559 *J Hepatol*. 2021;41(1);Available from: <https://doi.org/10.1042/BSR20202514>.
560
561 17. Balaphas A, Meyer J, Gameiro C, Frobert A, Giraud MN, Egger
562 B, et al. Optimized isolation and characterization of C57BL/6
563 mouse hepatic stellate cells. *Cells*. 2022;11(9):1379;Available
564 from: <https://doi.org/10.3390/cells11091379>.
565
566 18. Maschmeyer P, Flach M, Winau F. Seven steps to stellate cells.
567 *J Vis Exp*. 2011;(51);Available from: <https://doi.org/10.3791/2710>.
568
569 19. Chang W, Yang M, Song L, Shen K, Wang H, Gao X, et al. Iso-
570 lation and culture of hepatic stellate cells from mouse liver.
571 *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014;46(4):291–8;Available from:
572 <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt143>.
573
574 20. Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda
575 KJH. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic
576 stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepato-*
577 *logy*. 1999;29(6):1760–7;Available from: <https://doi.org/10.1002/hep.510290640>.
578
579 21. Shang L, Hosseini M, Liu X, Kisseleva T, Brenner DA. Hu-
580 man hepatic stellate cell isolation and characterization. *J Gas-*
581 *troenterol*. 2018;53(1):6–17;Available from: <https://doi.org/10.1007/s00535-017-1404-4>.
582
583 22. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, mul-
584 ti-functional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol*
585 *Rev*. 2008;88(1):125–72;Available from: <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>.
586
587 23. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and
588 functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*.
589 2001;21(3):311–35;Available from: <https://doi.org/10.1055/s-2001-17550>.
590
591 24. Jin Y, Bai Y, Ni H, Qiang L, Ye L, Shan Y, et al. Activation of au-
592 topophagy through calcium-dependent AMPK/mTOR and PKC θ
593 pathway causes activation of rat hepatic stellate cells under
594 hypoxic stress. *FEBS Lett*. 2016;590(5):672–82;Available from:
595 <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12090>.
596
597 25. Dai C, Xiao X, Li D, Tun S, Wang Y, Velkov T, et al. Chloroquine
598 ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury in
599 mice via the concomitant inhibition of inflammation and in-
600 duction of apoptosis. *J Cell Physiol*. 2018;9(12):1–13;Available
601 from: <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1136-2>.
602
603 26. Meng D, Li Z, Wang G, Ling L, Wu Y, Zhang C. Carvedilol at-
604 tenuates liver fibrosis by suppressing autophagy and promot-
605 ing apoptosis in hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol*.
2018;108:1617–27;Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.005>.
606
607 27. Yu F, Dong B, Dong P, He Y, Zheng J, Xu P. Hypoxia induces
608 the activation of hepatic stellate cells through the PVT1-miR-

- 606 152-ATG14 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;465(1):115–23; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03672-y>.
- 608
- 609 28. Kim B-M, Abdelfattah AM, Vasan R, Fuchs BC, Choi MY. Hepatic stellate cells secrete Ccl5 to induce hepatocyte steatosis. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–10; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25699-9>.
- 610
- 611
- 612
- 613 29. De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology.* 2007;132(5):1937–46; Available from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.033>.
- 614
- 615
- 616
- 617
- 618 30. Deng J, Huang Q, Wang Y, Shen P, Guan F, Li J, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates autophagy to activate hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;454(2):328–34; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.076>.
- 619
- 620
- 621
- 622
- 623 31. Pascolo S. Time to use a dose of chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. *Eur J Pharmacol.* 2016;771:139–44; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.017>.
- 624
- 625
- 626

Studying the impact of autophagy inhibition by chloroquine to primary hepatic stellate cell activation *in vitro*

Pham Tran Huyen Tran¹, Phan Trong Nhan¹, Le Van Trinh^{2,3}, Dang Minh Thanh^{2,3}, Truong Hai Nhung^{2,3,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

This paper presented the isolation of primary hepatic stellate cell (HSC) to investigate the effects of chloroquine (CQ) on autophagy during the primary hepatic stellate cell activation *in vitro*. After isolation, HSC cells were evaluated for the isolation efficiency through the cell number and specific characteristics of HSC cells, such as cell size, lipid droplet storage capacity by Oil Red O (ORO) staining, Desmin expression by Immunocytochemistry (ICC) staining, and morphological changes during HSC culture *in vitro*. The HSC after being isolated for 1 day were treated with CQ 10 μM for 24 h. The ability of CQ to inhibit the autophagy and prevent HSC activation *in vitro* was assessed through their morphology and the expression levels of LC3, P62, α -SMA, Collagen I (COL I) by ICC staining. The results showed that CQ 10 μM inhibited the autophagy via increasing the expression of LC3 ($43.31 \pm 1.61\%$) and P62 ($61.28 \pm 2.64\%$) compared with the control at day 2. CQ 10 μM also prevented HSC the activation *in vitro* through the incomplete transformation of myofibroblast-like cells and decreased expression of α -SMA ($24.17 \pm 7.40\%$) and COL I ($18.05 \pm 0.49\%$) at day 7 compared with the control. This result could be one step in determining the relationship between the autophagy and HSC activation, aiming to develop therapy targeting autophagy in the treatment of liver fibrosis.

Key words: chloroquine, autophagy, hepatic stellate cell (HSC) activation

¹Laboratory of Stem cell Research and Application, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

²Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

³Viet Nam National University, Ho Chi Minh city, Vietnam

Correspondence

Truong Hai Nhung, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

Viet Nam National University, Ho Chi Minh city, Vietnam

Email: thnhung@hcmus.edu.vn

History

- Received: 14-12-2022
- Revised: 25-8-2023
- Accepted: 12-9-2024
- Published Online:

DOI :



Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Tran P T H, Nhan P T, Trinh L V, Thanh D M, Nhung T H. **Studying the impact of autophagy inhibition by chloroquine to primary hepatic stellate cell activation *in vitro*.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2024; (0):1-1.