Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ – Natural Sciences 2024, 8(3):2992-3002

Open Access Full Text Article

Bài nghiên cứu

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 Trân[1], Phan Trọng Nhân[1], Lê Văn Trình[2,3], Đặng Minh Thành[2,3], Trương Hải Nhung[2,3,*]

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 Reo 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 lc3, 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 lc3 (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 nhắm 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]*Phòng 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*

[2]*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*

[3]*Đại 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@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 14-12-2022
- Ngày sửa đổi: 25-8-2023
- Ngày chấp nhận: 12-9-2024
- Ngày đăng: 30-9-2024

DOI :

https://doi.org/10.32508/stdjns.v8i3.1255

Check for updates

MỞ ĐẦU

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 collagen [1–3]. 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 gan [4]. 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 HSC [7].

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 bào [8]. 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; 8(3):2992-3002.

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 dược 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 thực[10].

Tuy nhiên, nghiên cứu *in vitro* đa phần sử dụng các dòng tế bào HSC bất tử 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^{o}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 2015[11] 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^{o}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).

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

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

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

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

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

Trong đó, $CTCF_1$: Số lượng tế bào trong các lô xử lý CQ $CTCF_0$: Số lượng tế bào trong lô đối chứng không xử lý CQ.

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

Xử lý thống kê

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

KẾT QUẢ

Hiệu quả phân lập và nuôi cấy HSC từ chuột

Dựa vào sự khác biệt về kích thước tế bào HSC và các quần thể tế bào khác trong gan, đếm và ghi nhận số lượng tế bào HSC sống sót ở các lần phân lập dựa trên quan sát kính hiển vi và nhuộm trypan blue. Ở Hình 2A,B những tế bào tròn sáng không bị nhuộm màu và đạt kích thước từ 12−20 μm là những tế bào mục tiêu trong quần thể phân lập [16]. Kết quả số lượng HSC thu được trong mỗi lần phân lập bằng ly tâm đẳng tỷ trọng Nycodenz 9,6% với hiệu suất phân lập là (0,48 ± 0,04) × 10^6 tế bào/ gram. Kết quả nhuộm tế bào với Oil Red O cho thấy HSC dự trữ nhiều giọt lipid với kích thước khác nhau trong tế bào chất (Hình 2C). Lượng giọt lipid giữa các tế bào cũng có sự khác nhau. Kết quả nhuộm ICC bằng marker Desmin cho thấy số tế bào dương tính với Desmin chiếm 97,03 ± 1,30%, trong đó có 11 ± 1,84% dương tính mạnh trong % dương tính. Có thể thấy sự biểu hiện marker desmin ở quần thể tế bào HSC là không đồng nhất (Hình 2D). Đa số các tế bào có biểu hiện dương tính mạnh (chiếm 11± 1,84%) biểu hiện tín hiệu dạng sợi và phủ từ tế bào chất kéo dài đến các nhánh tế bào. Số tế bào dương tính còn lại biểu hiện dương tính yếu hơn và phát quang tại tế bào chất ở một số vị trí. Các kết quả trên giúp xác định quy trình phân lập quần thể tế bào HSC từ mô gan chuột đã thành công, phân lập HSC có độ tinh sạch cao.

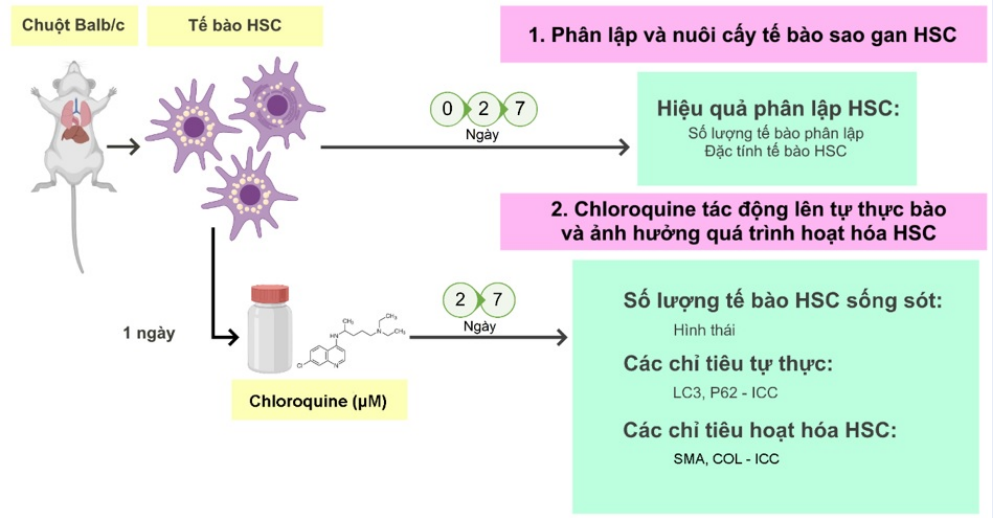
Về hình thái, quần thể tế bào HSC phân lập được quan sát có sự thay đổi rõ rệt về hình dạng trong 7 ngày nuôi cấy. Sau một ngày nuôi cấy, một số tế bào bắt đầu có sự bám trải, có các nhánh nhỏ ngắn và kéo dài ra xung quanh, tế bào có hình dạng như "hình sao" và các tế bào còn lại ở dạng tròn do chưa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

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

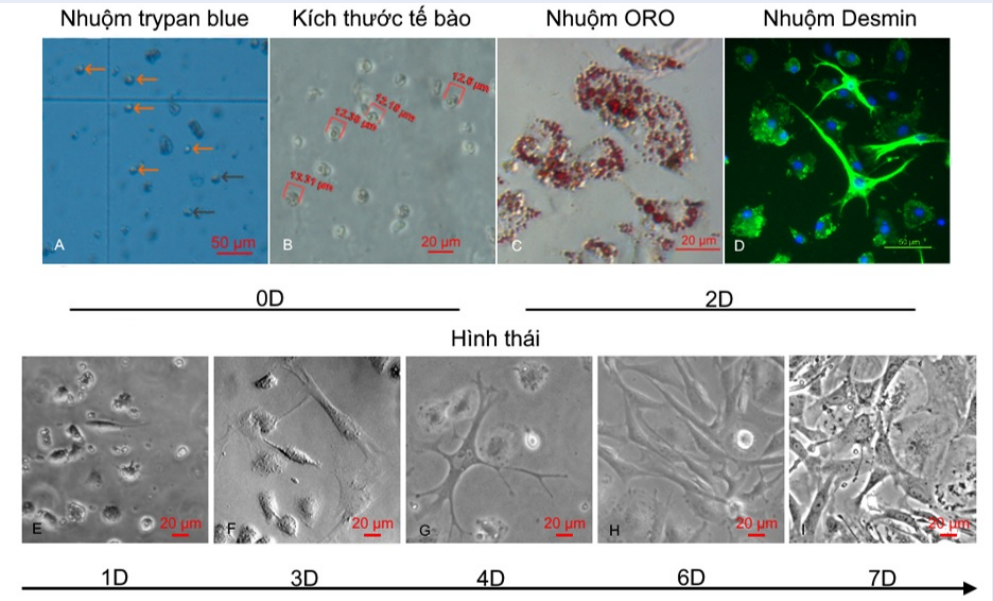
CQ làm tăng biểu hiện lc3 ở mức độ protein (Hình 3A-C). Ở ngày 2 nuôi cấy sau khi xử lý với CQ 24 giờ, lc3 trong quần thể tế bào xử lý CQ 10 μM tăng biểu hiện so với đối chứng (43,31 ± 1,61%). CQ làm tăng biểu hiện p62 ở mức độ protein (Hình 3D-F). Ở ngày thứ 2 nuôi cấy sau khi xử lý với CQ 24 giờ, p62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

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

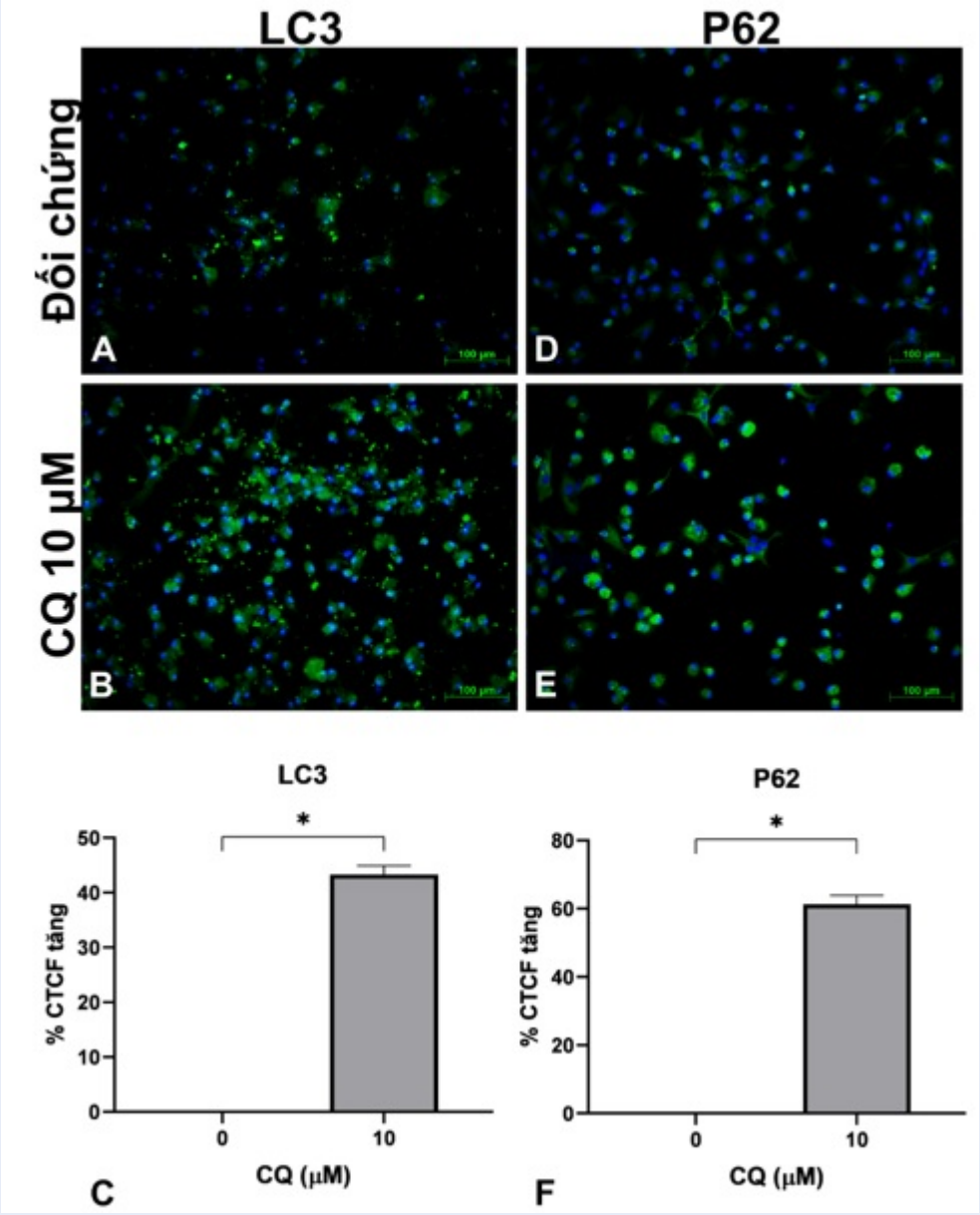
Ở Hình 4A-D, hình thái tế bào HSC có sự thay đổi theo thời gian. Ở ngày 2 nuôi cấy sau khi xử lý với CQ 24 giờ, những tế bào không xử lý với CQ có các nhánh kéo dài hơn và đa số các tế bào đều bám trải tốt. Một số các tế bào xử lý với CQ 10 μM cũng có sự kéo dài của các nhánh nhưng ngắn và mảnh hơn;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



Hình 1: Sơ đồ thí nghiệm



Hình 2: Xác định quần thể tế bào HSC phân lập từ gan chuột và hình thái nuôi cấy trong 7 ngày. A: Hình ảnh nhuộm trypan blue với các tế bào tròn sáng nhỏ là những tế bào sống (mũi tên cam), chết (mũi tên đen); B: Kích thước tế bào HSC; C: Quần thể tế bào HSC nuôi cấy sau 48 giờ được nhuộm Oil Red O; D: huộm hóa tế bào miễn dịch với desmin; E-I: Sự thay đổi hình thái của quần thể tế bào HSC được quan sát ở các thời điểm trong 7 ngày nuôi cấy quan sát dưới kính hiển vi.

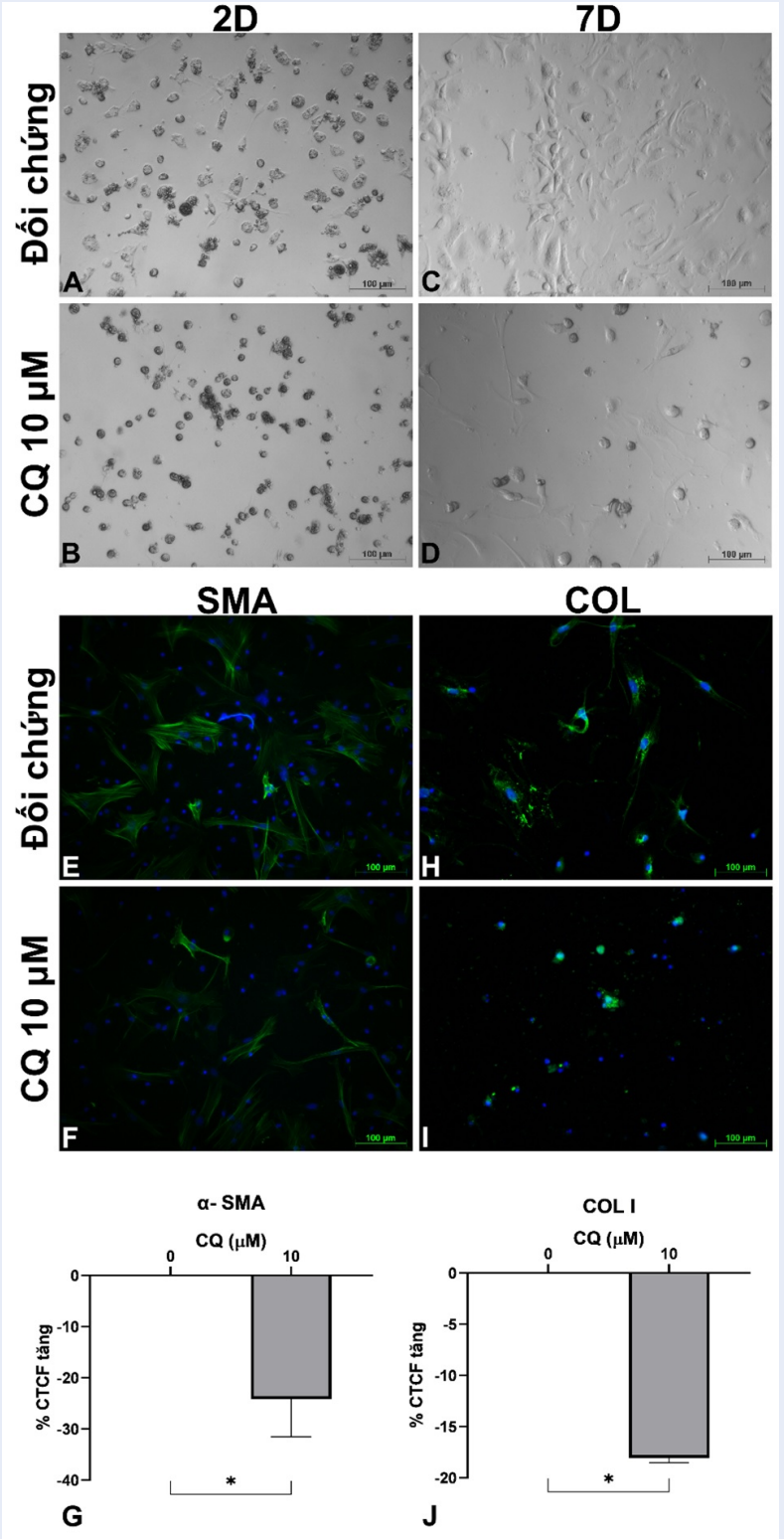


Hình 3: Sự thay đổi biểu hiện lc3 (A-C) và p62 (D-F) ở quần thể tế bào HSC do tác động của CQ 10 μM trong 24 giờ được quan sát các thời điểm 2 ngày nuôi cấy. Student t- tests; * -value < 0,05.

có xử lý CQ, các tế bào biểu hiện α-sma yếu, ít tạo thành các cụm sợi thậm chí là không hình thành cụm sợi mà chỉ bắt theo khung xương tế bào (Hình 4E-G). Bên cạnh đó, ở ngày 7 nuôi cấy, col I trong quần thể tế bào xử lý CQ ở các nồng độ 10 μM có sự giảm biểu hiện so với tế bào đối chứng không xử lý tương ứng là 18,05 $\pm$ 0,49%. Trên Hình 4 có thể thấy, col I biểu hiện thành các đốm sáng mạnh với diện tích lớn xung quanh rìa tế bào ở lô đối chứng trong khi lô xử lý CQ 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 μM xử lý 24 giờ được quan sát ở thời điểm 7 ngày. * t- tests; $p < 0,05$.

nghiên cứu khác, thí dụ như: ở chủng chuột C57BL/6, Patrick Maschmeyer và cộng sự (2011) khi sử dụng Nycodenz, phân lập tế bào HSC đạt hiệu suất là 2×10^5 tế bào/ gan chuột trong khi Alexandre Balaphas và cộng sự (2022) thực hiện phân lập đạt hiệu suất 350.595 ± 100.773 tế bào HSC trên gan chuột[17,18]. Ngoài ra, theo Ingmar Mederacke và cộng sự (2015), quy trình phân lập từ chuột BALB/c cho hiệu suất phân lập cao hơn chuột C57BL/6J do các yếu tố di truyền bên cạnh các yếu tố ảnh hưởng khác như tuổi tác chuột, enzyme sử dụng phân tách gan, hóa chất ly tâm đẳng tỷ trọng. Tác giả cho rằng quy trình phân lập từ chuột BALB/c khỏe mạnh 12 tuần tuổi cho hiệu suất phân lập là 2−3 triệu tế bào/ chuột và độ tinh sạch từ 90−98%[11].

Như đã đề cập; quần thể tế bào HSC có khả năng dự trữ giọt lipid, có desmin là protein cấu tạo nên khung xương tế bào, là những đặc điểm của tế bào HSC. Do đó, nhuộm Oil Red O và nhuộm ICC Desmin giúp xác định tế bào mục tiêu trong quần thể tế bào phân lập và xác định độ tinh sạch của quần thể tế bào này[18–21]. Kết quả cho thấy có tế bào dự trữ nhiều giọt lipid tập trung quanh nhân trong khi có tế bào chỉ rải rác các giọt lipid nhỏ hơn trong tế bào chất hoặc tế bào chưa bám trải nhiều sẽ dự trữ giọt lipid gom thành một cụm lớn[16]. Bên cạnh đó, sự khác biệt trong dự trữ giọt lipid cũng như biểu hiện marker Desmin cho thấy quần thể tế bào HSC phân lập được là một quần thể tế bào không đồng nhất. Những kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu trước đây của nhóm cũng như các nghiên cứu khác trong và ngoài nước[16,17]. Theo họ, khả năng dự trữ giọt lipid hay hàm lượng Desmin trong các tế bào HSC có sự khác biệt do phụ thuộc vào vị trí của các tế bào trong thùy gan, tuổi của tế bào và trạng thái chức năng của tế bào. Thí dụ như; các tế bào HSC quanh tĩnh mạch cửa ở vùng ngoại vi tiểu thùy chứa nhiều vitamin A hơn, và biểu hiện desmin nhiều hơn các tế bào HSC vùng tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy[22,23].

Thứ hai, CQ gây ức chế quá trình tự thực bào thông qua biểu hiện tăng LC3, P62 khi nhuộm ICC. Lc3 và p62 là hai phân tử được lựa chọn để đánh giá do vai trò quan trọng của nó liên quan tới tiến trình tự thực bào. Cụ thể, lc3 là phân tử tham gia vào quá trình hình thành màng của thể tự thực, qua đó kéo dài và trưởng thành cấu trúc thể tự thực. lc3 trong tế bào chất tồn tại ở dạng lc3-1, khi quá trình tự thực diễn ra, lc3-1 được phân cắt thành lc3-2 và gắn đuôi lipid tạo màng trên thể tự thực. P62 là protein đánh dấu các phân tử/bào quan của tế bào cần được phân hủy để đưa các phân tử này vào thể tự thực thông qua phức hợp. Sự biểu hiện tăng của lc3 là một dấu hiệu đặc trưng của sự tự thực bào. Tuy nhiên, CQ có khả năng gây ức chế phản ứng dung hợp lysosome-autophagosome, ngăn chặn quá trình autophagy ở giai đoạn cuối[10]. Do đó, CQ sẽ làm tăng thêm biểu hiện lc3 do bị tích trữ không thể phân hủy được. P62 là protein kết hợp vào autophagosome thông qua liên kết trực tiếp với lc3 và bị phân hủy bởi quá trình autophagy. Do đó, quá trình tự thực xảy ra sẽ làm lc3 tăng, P62 giảm[24]. Vì vậy, p62 tăng là một biểu hiện của quá trình tự thực không xảy ra. Đúng như dự kiến CQ sẽ làm tăng thêm biểu hiện lc3 và p62 do bị tích trữ không thể phân hủy được[24–27], lc3 và p62 trong quần thể tế bào HSC sau 1 ngày phân lập xử lý CQ 10 μM trong 24 giờ đều có sự tăng biểu hiện so với tế bào đối chứng không xử lý; cho thấy tác động ức chế quá trình tự thực bào do sự tích tụ của lc3 và p62 ở mốc thời gian ngày 2. Kết quả trên tương đồng với nghiên cứu của Virginia Hernandez Gea và cộng sự (2012) cho rằng CQ làm tăng lc3 II, p62 do sự tích tụ không thoái hóa được của các thể autophagosome qua việc đánh giá biểu hiện lc3, p62 bằng Western Blot (WB) nhưng được thực hiện và quan sát ở dòng tế bào HSC hoạt hóa bất tử JS1 với CQ nồng độ 10 mM/L trong 12 giờ[4]. Yuepeng Jin và cộng sự (2016) cũng sử dụng CQ 5 μM trong 12 giờ gây ức chế tự thực qua biểu hiện tăng tích tụ lc3[24]. Tương tự, Hye-Young Seo và cộng sự (2020) dùng CQ 10 μM trong 24 giờ làm tăng biểu hiện lc3, gây ức chế tự thực trên dòng tế bào gan từ chuột AML12[13].

Thứ ba, CQ gây ức chế quá trình hoạt hóa tế bào HSC sơ cấp nuôi cấy *in vitro*. Sự thay đổi hình dạng tế bào HSC trong quá trình nuôi cấy *in vitro* cho thấy tế bào HSC sơ cấp trên có sự biệt hóa thành các tế bào hình dạng như nguyên bào sợi trong thời gian nuôi cấy 7 ngày tương tự như mô tả ở các nghiên cứu trước[13,18,28]. Và tại mốc thời gian này, tế bào biểu hiện mạnh protein α-sma, một dấu hiệu đặc trưng của nguyên bào sợi trưởng thành. Ngoài ra, HSC hoạt hóa tiết ra collagen (hơn 80% là collagen loại I), đồng nghĩa việc HSC ở ngày thứ bảy biểu hiện mạnh protein col I. Vì vậy, α-sma và col I là 2 dấu hiệu được nhiều nghiên cứu sử dụng để xác định sự hoạt hóa của HSC[20,24,27,29]. Theo nghiên cứu của chúng tôi, HSC biểu hiện mạnh α-sma và col I khi nuôi cấy 7 ngày tương đồng với các nghiên cứu trước[13,16,18,28]. Trong khi, quần thể tế bào HSC sau 1 ngày phân lập xử lý CQ 10 μM trong 24 giờ giảm biểu hiện α-sma và col I so với tế bào đối chứng không xử lý ở mốc ngày 7. Đồng thời, khi phân tích về hình thái, các tế bào xử lý với CQ ở nồng độ 10 μM thì hầu như không thấy rõ sự chuyển dạng của tế bào so với mẫu đối chứng nuôi cấy bình thường. Các tế bào xử lý CQ giữ hình dạng hơi co lại, hoặc bám trải trên bề mặt đĩa với các tua nhánh dài và nhỏ trong khi tế bào nuôi cấy bình thường có hình dạng dẹt, trải rộng, nhân to hoặc hình

dạng thon dài, gần giống hình dạng nguyên bào sợi [16]. Kết quả trên tương đồng với nghiên cứu của Virginia Hernandez Gea và cộng sự (2012) cho rằng CQ làm giảm các dấu hiệu đặc trưng cho sự hoạt hóa dòng tế bào HSC bất tử JS1 như: α-sma, col1, ß-pdgfr, mmp-2 qua đánh giá WB [4]. Tương tự, Jing Deng và cộng sự (2014) sử dụng CQ 50 μM trong 3 giờ gây ức chế tăng biểu hiện α-sma trong 15 phút và 1 giờ trong điều kiện thiếu oxy gây cảm ứng tự thực ở dòng tế bào LX-2 [30]. Theo một số nghiên cứu; quá trình hoạt hóa HSC thông qua biểu hiện thay đổi hình dạng, mất dự trữ giọt lipid, tăng sinh và tăng sản xuất các chất nền ngoại bào; xảy ra nhanh chóng trong nuôi cấy *in vitro* ở mô hình 2D trên đĩa nhựa. Các nghiên cứu sử dụng mô hình 3D, hay tạo ra các giá thể (như: gel giàu laminin) tráng trên bề mặt đĩa nhựa giúp duy trì kiểu hình tĩnh lặng của HSC cho thấy rằng độ cứng của bề mặt chất nền có thể là yếu tố quyết định trong sự hoạt hóa của tế bào HSC. Đồng thời, thành phần các chất nền ngoại bào có thể điều chỉnh tăng hoặc giảm quá trình hoạt hóa này (thí dụ: môi trường nuôi cấy có thành phần chất nền collagen I giúp tế bào HSC hoạt hóa thành nguyên bào sợi tốt hơn) [22]. Những nỗ lực để tinh chỉnh các yếu tố lý hóa trên hay hiểu thêm về các con đường truyền tín hiệu nội bào và ngoại bào với tế bào HSC ở trung tâm khi gan bị tổn thương cũng như chữa lành là rất quan trọng để biết thêm các chức năng của dòng tế bào HSC này. Từ đó, kết quả nghiên cứu này giúp hỗ trợ tìm ra các phương pháp điều trị trúng mục tiêu các thể loại bệnh về gan cũng như phát triển hệ thống nuôi cấy mô gan nhân tạo.

Bài báo trình bày kết quả là CQ làm giảm số lượng tế bào HSC hoạt hóa, từ đó ức chế quá trình hoạt hóa tế bào HSC, làm tăng thêm thời gian cần để quần thể tế bào HSC chuyển dạng hoàn toàn. Đặc biệt, khi quần thể tế bào được xử lý CQ ở nồng độ 10 μM nhiều tế bào HSC trong quần thể vẫn giữ trạng thái co tròn. Dựa vào kết quả này, một giả thuyết đặt ra là liệu đây có phải là những tế bào HSC im lặng và bất hoạt lâu dài, hay là những tế bào không thể kích hoạt và đang dần đi vào con đường apoptosis. Và nếu kéo dài thời gian nuôi cấy hơn 7 ngày thì những tế bào trên có thể bắt đầu hoạt hóa, trải các nhánh dài, tăng sinh và biệt hóa thành nguyên bào sợi không.

Bên cạnh đó, việc sử dụng CQ trong quá trình điều trị bệnh xơ hóa gan cần phải cẩn trọng về liều lượng, thời gian, thời điểm tác động do CQ gây ra rất nhiều tác động phản ứng từ tế bào. Thí dụ như ở các dòng tế bào ung thư, CQ có tác động gây ức chế tự thực, cảm ứng tăng apoptosis, loại bỏ tế bào gốc ung thư hay tăng cường sự phát triển của tế bào ung thư, bình thường hóa hệ mạch của khối u, lưu trữ thuốc trị liệu trong các tế bào/ khối u, đáp ứng miễn dịch và tăng cường trình bày chéo, ức chế miễn dịch, v.v. [31]. Theo hiểu biết của chúng tôi, các tác động của CQ lên HSC nói riêng, và của gan nói chung, vẫn còn nhiều mối quan hệ và tương tác chưa được làm rõ.

KẾT LUẬN

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

LỜI CẢM ƠN

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

VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU TRÊN ĐỘNG VẬT

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

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

COL I: Collagen I
CQ: Chloroquine
CTCF: Cường độ huỳnh quang tế bào (Corrected Total Cell Fluorescence)
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGTA Ethylene Glycol-Bis(ß-Aminoethyl Ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
FBS: Huyết thanh bào thai bò (Fetal Bovine Serum)
GBSS/B: Gey's Balanced Salt Solution B
HSC: Tế bào hình sao gan (Hepatic Stellate Cell)
ICC: Nhuộm hoá tế bào miễn dịch (Immunocytochemistry)
LDL: Giọt lipid (Lipid Droplet)
ORO: Oil Red O
PBS: Dung dịch muối đệm Phosphate (Phosphate Buffered Saline Dung)
WB: Western Blot

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

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

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Phạm Trần Huyền Trân thực hiện thí nghiệm, thu thập, xử lý dữ liệu, viết bản thảo.

Phan Trọng Nhân hỗ trợ các thí nghiệm thực nghiệm, phân lập tế bào HSC.

Lê Văn Trình hỗ trợ thí nghiệm thực nghiệm, phân lập tế bào, kế hoạch nghiên cứu.

Đặng Minh Thành hỗ trợ các thí nghiệm thực nghiệm. phương pháp nghiên cứu.

Trương Hải Nhung đóng góp ý tưởng, định hướng thiết kế nghiên cứu; góp ý, chỉnh sửa và hoàn thiện bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alpini G, Phillips JO, Vroman B, LaRusso NF. Recent advances in the isolation of liver cells. Hepatology. 1994;20(2):494–514;Available from: https://doi.org/10.1002/hep.1840200231.
2. Hendriks HF, Verhoofstad WA, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. Exp Cell Res. 1985;160(1):138–49;Available from: https://doi.org/10.1016/0014-4827(85)90243-5.
3. Xu R, Zhang Z, Wang FS. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. Cell Mol Immunol. 2012;9(4):296–301;Available from: https://doi.org/10.1038/cmi.2011.53.
4. Hernández-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. Gastroenterology. 2012;142(4):938–46;Available from: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.044.
5. Hernández-Gea V, Hilscher M, Rozenfeld R, Lim MP, Nieto N, Werner S, et al. Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. J Hepatol. 2013;59(1):98–104;Available from: https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.016.
6. Kim RS, Hasegawa D, Goossens N, Tsuchida T, Athwal V, Sun X, et al. The XBP1 Arm of the unfolded protein response induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. Sci Rep. 2016;6:39342;Available from: https://doi.org/10.1038/srep39342.
7. Umemura A, He F, Taniguchi K, Nakagawa H, Yamachika S, Font-Burgada J, et al. p62, upregulated during preneoplasia, induces hepatocellular carcinogenesis by maintaining survival of stressed HCC-initiating cells. Cancer Cell. 2016;29(6):935–48;Available from: https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.04.006.
8. Allaire M, Rautou P-É, Codogno P, Lotersztajn SJJH. Autophagy in liver diseases: time for translation? J Hepatol. 2019;70(5):985–98;Available from: https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.01.026.
9. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. Curr Top Microbiol Immunol. 2009;335:1–32;Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_1.
10. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. Autophagy. 2018;14(8):1435–55;Available from: https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314.
11. Mederacke I, Dapito DH, Affò S, Uchinami H, Schwabe RF. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. Nat Protoc. 2015;10(2):305–15;Available from: https://doi.org/10.1038/nprot.2015.017.
12. Mizui T, Yamashina S, Tanida I, Takei Y, Ueno T, Sakamoto N, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. J Gastroenterol. 2010;45(2):195–203;Available from: https://doi.org/10.1007/s00535-009-0132-9.
13. Seo HY, Lee SH, Lee JH, Kang YN, Hwang JS, Park KG, et al. Src inhibition attenuates liver fibrosis by preventing hepatic stellate cell activation and decreasing connective tissue growth factor. Cells. 2020;9(3);Available from: https://doi.org/10.3390/cells9030558.
14. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, et al. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. Hepatology. 2014;59(1):154–69;Available from: https://doi.org/10.1002/hep.26604.
15. Wang F, Tang J, Li P, Si S, Yu H, Yang X, et al. Chloroquine enhances the radiosensitivity of bladder cancer cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis. Cell Physiol Biochem. 2018;45(1):54–66;Available from: https://doi.org/10.1159/000486222.
16. Dang TM, Le TV, Do HQ, Nguyen VT, Holterman AXL, Dang LTT, et al. Optimization of the isolation procedure and culturing conditions for hepatic stellate cells obtained from mouse. J Hepatol. 2021;41(1);Available from: https://doi.org/10.1042/BSR20202514.
17. Balaphas A, Meyer J, Gameiro C, Frobert A, Giraud MN, Egger B, et al. Optimized isolation and characterization of C57BL/6 mouse hepatic stellate cells. Cells. 2022;11(9):1379;Available from: https://doi.org/10.3390/cells11091379.
18. Maschmeyer P, Flach M, Winau F. Seven steps to stellate cells. J Vis Exp. 2011;(51);Available from: https://doi.org/10.3791/2710.
19. Chang W, Yang M, Song L, Shen K, Wang H, Gao X, et al. Isolation and culture of hepatic stellate cells from mouse liver. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2014;46(4):291–8;Available from: https://doi.org/10.1093/abbs/gmt143.
20. Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda KJH. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. Hepatology. 1999;29(6):1760–7;Available from: https://doi.org/10.1002/hep.510290640.
21. Shang L, Hosseini M, Liu X, Kisseleva T, Brenner DA. Human hepatic stellate cell isolation and characterization. J Gastroenterol. 2018;53(1):6–17;Available from: https://doi.org/10.1007/s00535-017-1404-4.
22. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. Physiol Rev. 2008;88(1):125–72;Available from: https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007.
23. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin Liver Dis. 2001;21(3):311–35;Available from: https://doi.org/10.1055/s-2001-17550.
24. Jin Y, Bai Y, Ni H, Qiang L, Ye L, Shan Y, et al. Activation of autophagy through calcium-dependent AMPK/mTOR and PKCθ pathway causes activation of rat hepatic stellate cells under hypoxic stress. FEBS Lett. 2016;590(5):672–82;Available from: https://doi.org/10.1002/1873-3468.12090.
25. Dai C, Xiao X, Li D, Tun S, Wang Y, Velkov T, et al. Chloroquine ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice via the concomitant inhibition of inflammation and induction of apoptosis. J Cell Physiol. 2018;9(12):1–13;Available from: https://doi.org/10.1038/s41419-018-1136-2.
26. Meng D, Li Z, Wang G, Ling L, Wu Y, Zhang C. Carvedilol attenuates liver fibrosis by suppressing autophagy and promoting apoptosis in hepatic stellate cells. Biochem Pharmacol. 2018;108:1617–27;Available from: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.005.
27. Yu F, Dong B, Dong P, He Y, Zheng J, Xu P. Hypoxia induces the activation of hepatic stellate cells through the PVT1-miR-152-ATG14 signaling pathway. Biochem Biophys Res Com-

mun. 2020;465(1):115−23;Available from: https://doi.org/10.1007/s11010-019-03672-y.
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.
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.
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.
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.

Science & Technology Development Journal – Natural Sciences 2024, 8(3):2992-3002

Open Access Full Text Article

Research Article

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

Pham Tran Huyen Tran[1], Phan Trong Nhan[1], Le Van Trinh[2,3], Dang Minh Thanh[2,3], Truong Hai Nhung[2,3,*]

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 Reo 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

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

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

[3]*Viet 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: 30-9-2024

DOI : https://doi.org/10.32508/stdjns.v8i3.1255

Check for updates

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, 8(3):2992-3002.