

THÔNG TIN VỀ LUẬN ÁN TIẾN SĨ

1. Họ và tên nghiên cứu sinh: Phạm Thị Hồng Nhung
2. Giới tính: Nữ
3. Ngày sinh: 26/03/1988
4. Nơi sinh: TP. Hải Phòng
5. Quyết định công nhận nghiên cứu sinh: 4050/QĐ-KHTN-CTSV ngày 19/9/2013 của Hiệu trưởng Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQGHN.
6. Các thay đổi trong quá trình đào tạo:
 - Quyết định gia hạn số 1033/QĐ-ĐHKHTN ngày 25/4/2017 và số 597/QĐ-ĐHKHTN ngày 6/3/2018 của Hiệu trưởng Trường Đại học Khoa học Tự nhiên;
 - Quyết định buộc thôi học số 3055/QĐ-ĐHKHTN ngày 25/9/2019 của Hiệu trưởng Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.
7. Tên đề tài luận án: Nghiên cứu thiết kế vector biểu hiện thụ thể neurokinin-1 người tái tổ hợp trên dòng tế bào CHO định hướng ứng dụng trong nghiên cứu và phát triển dược phẩm
8. Chuyên ngành: Di truyền học
9. Mã số: 94 20 101.21
10. Cán bộ hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Đinh Đoàn Long
PGS.TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung
11. Tóm tắt các kết quả mới của luận án:
 - Đã thiết kế được hệ thống vector biểu hiện pSFV-KLEPT1.2 có nguồn gốc từ vector biểu hiện virus Semliki Forest pSFV2 có cải biến bổ sung đuôi ái lực Flag, poly-Histidin, vị trí Thrombin và vùng nhân dòng đa điểm nhằm biểu hiện *NK1R* và vector pSFV2 mang trình tự mã *eGFP* phục vụ nghiên cứu động học biểu hiện. Hệ thống quy trình kỹ thuật biểu hiện *NK1R* tái tổ hợp của người thông qua hệ vector biểu hiện SFV cải biến cũng được thiết lập. Quy trình tạo hạt SFV mang trình tự mã hóa *NK1R* thông qua đồng biến nạp bằng xung điện RNA phiên mã *in vitro* từ vector SFV biểu hiện và vector hỗ trợ vào tế bào BHK-21 cho phép tạo ra khoảng 50×10^{10} hạt virus/mL sau 42 giờ chuyển gen. Sau 24 - 48 giờ lây nhiễm hạt SFV, một lượng lớn tế bào CHO biểu hiện *NK1R* tái tổ hợp được tạo ra sẵn sàng cho các nghiên cứu dược lý.
 - Trong bốn dòng tế bào nuôi cấy là CHO, U937, HeLa và HEK-293, dòng CHO ở dạng tự nhiên không biểu hiện *NK1R* và phù hợp nhất để biểu hiện *NK1R* tái tổ hợp của người. Nồng độ Ca^{2+} nội bào tăng khi *NK1R* tái tổ hợp biểu hiện trên tế bào CHO tương tác với chất chủ vận SP và giảm khi thụ thể này tương tác với chất đối kháng aprepitant cho thấy thụ thể có hoạt tính chức năng đầy đủ.

- Mô hình đánh giá tương tác dược lý phân tử trên đích NK1R với dịch chiết methanol và một số tinh chất thu từ 10 loài dược liệu Việt Nam đã được thử nghiệm. Dịch chiết từ Hồ tiêu, Bình vôi và Hòe có hoạt độ đối kháng NK1R tương đối ổn định. Mối tương quan giữa dược lực *in vitro* của các dịch chiết Bình vôi trên thụ thể NK1R và hàm lượng Rotundin bước đầu được tìm thấy. Hoạt lực ức chế NK1R ở Rotundin tương đối mạnh với IC_{50} là 0,88 μ M. Hoạt độ đối kháng NK1R tương đối ổn định với các dịch chiết Hồ tiêu (IC_{50} trong khoảng 5,7 và 60,5 μ g/mL) và Hòe (IC_{50} trong khoảng 15,4 và 140,6 μ g/mL). NK1R không phải đích tác động phân tử chính theo cơ chế đối kháng thụ thể của các dịch chiết methanol Canhkina, Sâm vũ diệp, Tam thất hoang, Râu mèo, Ba kích và Đảng sâm.

12. Khả năng ứng dụng thực tiễn:

Tế bào biểu hiện NK1R tái tổ hợp của người với đầy đủ hoạt tính có thể ứng dụng để sàng lọc các hoạt chất hướng đích NK1R thu từ các cây dược liệu Việt Nam. Nghiên cứu mở ra triển vọng ứng dụng mới trong thực tiễn phát triển thuốc dược liệu, tiêu chuẩn hoá và hiện đại hoá các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên, góp phần phát huy thế mạnh về nguồn tài nguyên dược liệu phong phú của Việt Nam.

13. Các hướng nghiên cứu tiếp theo:

- Mở rộng áp dụng sàng lọc các hợp chất hướng đích khác trên NK1R tái tổ hợp sử dụng hệ thống biểu hiện SFV.
- Phát triển thuốc đối kháng trên NK1R từ rotundine, capsaicine và piperine (tối ưu hóa thuốc, nghiên cứu chuyên hóa, thử tiền lâm sàng,...).
- Biểu hiện các dạng NK1R mang các đột biến điểm phổ biến trong quần thể người đã được ghi nhận, qua đó đánh giá tác động của các biến thể NK1R tới đáp ứng thuốc.

14. Các công trình công bố liên quan đến luận án:

- [1] Long Doan Dinh, Nhung Hong Thi Pham, Nhung My Thi Hoang, Cuong Trinh Tat, Van Hong Thi Nguyen, Lan Thuong Thi Vo, Huyen Thanh Pham, Kenneth Lundstrom (2015), "Expression of Human Neurokinin 1 Receptor in CHO Cells to Evaluate Involvement with Vietnamese Medicinal Plant Extracts", *12th Protein Expression in Animal Cells*, pp.175.
- [2] Long Doan Dinh, Nhung Hong Thi Pham, Nhung My Thi Hoang, Cuong Trinh Tat, Van Hong Thi Nguyen, Lan Thuong Thi Vo, Huyen Thanh Pham, Kenneth Lundstrom (2015), "Interaction of Vietnamese Medicinal Plant Extracts with

Recombinantly Expressed Human Neurokinin 1 Receptor”, *Journal of Planta Medica Letters* 2(1), pp. e42 - e47.

- [3] Tác giả phụ của Bằng độc quyền sáng chế: “Quy trình sản xuất dòng tế bào biểu hiện thụ thể Neurokinin 1 của người (hNK1R)”. Cấp theo Quyết định số 49722/QĐ-SHTT, ngày 25/07/2017 tại Cục Sở hữu Trí tuệ (Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam).
- [4] Phạm Thị Hồng Nhung, Đinh Đoàn Long (2018), “Xây dựng mô hình sàng lọc *in vitro* hoạt chất hướng đích dựa trên các thụ thể hệ thần kinh trung ương tái tổ hợp”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 34(1), tr.105-110.

Ngày tháng năm
Nghiên cứu sinh

Phạm Thị Hồng Nhung

INFORMATION ON DOCTORAL THESIS

1. Full name: Pham Thi Hong Nhung
2. Sex: Female
3. Date of birth: 26/03/1988
4. Place of birth: Hai Phong
5. Admission decision number: 4050/QĐ-KHTN-CTSV, dated on 19/9/2013 by Rector of VNU University of Science.
6. Changes in academic process:
 - Extended time by decision No 1033/QĐ-DHKHTN and 597/QĐ-DHKHTN signed by Rector of Rector of VNU University of Science.
 - Decision No 3055/QĐ-DHKHTN, dated on 25/9/2019 by Rector of VNU University of Science that sending PhD. student back to office.
7. Official thesis title: Construction of recombinant neurokinin-1 receptor expression vector in CHO cells for application in drug discovery and development
8. Major: Genetics
9. Code: 94 20 101.21
10. Supervisors: Assoc. Prof. Dr. Dinh Doan Long
Assoc. Prof. Dr. Hoang Thi My Nhung
11. Summary of the new findings of the thesis
 - A novel expression vector pSFV-KLEPT1.2 was constructed from the pSFV2 vector by joining a new DNA sequence that has additional affinity tails (Flag-tag and poly-Histidine-tag), thrombin cleavage site, and multiple cloning sites. The *eGFP* construct was cloned into the pSFV2 vector for expression kinetic studies. The human recombinant neurokinin-1 receptor gene (*NK1R*) was expressed according to the novel SFV expression system procedures. BHK-21 cells yielded about 50×10^{10} infectious recombinant particles/mL when cotransfected with recombinant and helper RNA and incubated for 42 hours. After 24 to 48 hours of infection with SFV, a large number of CHO cells expressing recombinant *NK1R* with full activity for molecular pharmacological studies.
 - Comparison of U937, HeLa, and HEK-293 cell lines, natural CHO cell line did not express NK1R and is most suitable for human recombinant *NK1R* expression. In CHO cells, intracellular Ca^{2+} concentration increases when recombinant NK1R interacts with SP agonists and decreases when this receptor interacts with AP antagonists indicating that the receptor is fully functional.

- The molecular pharmacological model of NK1R for interaction with methanol extracts and some compounds from 10 Vietnamese medicinal plants was established. Extracts from *Piper nigrum* L, *Stephania cambodica* Gagnep and *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott were found to exert inhibition on agonist-induced NK1R activity. The correlation between *in vitro* pharmacodynamic of the *Stephania cambodica* extracts with NK1R and rotundine in this extracts was initially found. Strong inhibition of NK1R was observed for extracts revealing the highest inhibitory potency for rotundine with IC₅₀ of 0,88 μM. The NK1R antagonistic activities are relatively stable with *P. nigrum* extracts (IC₅₀ between 5,7 and 60,5 μg/mL) and *S. japonicum* extracts (IC₅₀ between 15,4 and 140,6 μg/mL). NK1R is not the main molecular target in the antagonistic activity with methanol extracts of *Cinchona officinalis* L, *Codonopsis javanica* Blume, *Eleusine indica* L. Graerth., *Eleusine indica* L. Graerth., *Orthosiphon stamineus* Benth, *Panax bipinnatifidus* Seem, *Panax stipuleanatus* Tsai & Feng.

12. Paratical applicability:

The CHO cell expressing human recombinant NK1R with full activity can be applied to screen for target compounds from Vietnamese medicinal plants. The research opens new prospects for herbal medicine development, standardization and modernization of natural origin products.

13. Các hướng nghiên cứu tiếp theo:

- Extending the application of other target compounds screening on recombinant NK1R using the SFV expression system.
- Developing NK1R antagonists from rotundine, capsaicine and piperine (drug optimization, metabolic studies, preclinical studies, ...).
- The expression of common mutant human NK1Rs, thereby assessing the impact of NK1R variants on drug response.

13. Further research directions:

14. Thesis-related publications:

[1] Long Doan Dinh, Nhung Hong Thi Pham, Nhung My Thi Hoang, Cuong Trinh Tat, Van Hong Thi Nguyen, Lan Thuong Thi Vo, Huyen Thanh Pham, Kenneth Lundstrom (2015), "Expression of Human Neurokinin 1 Receptor in CHO Cells to Evaluate Involvement with Vietnamese Medicinal Plant Extracts", 12th Protein Expression in Animal Cells, pp.175.

- [2] Long Doan Dinh, Nhung Hong Thi Pham, Nhung My Thi Hoang, Cuong Trinh Tat, Van Hong Thi Nguyen, Lan Thuong Thi Vo, Huyen Thanh Pham, Kenneth Lundstrom (2015), “Interaction of Vietnamese Medicinal Plant Extracts with Recombinantly Expressed Human Neurokinin 1 Receptor”, *Journal of Planta Medica Letters* 2(1), pp. e42 - e47.
- [3] Patent: Process for the production of CHO cell expressing the human Neurokinin 1 receptor (hNK1R). Inventors: Dinh Doan Long, Vo Thi Thuong Lan, Hoang Thi My Nhung, Pham Thi Hong Nhung, Trinh Tat Cuong. Admission decision number 49722/QĐ-SHTT, dated on 25/07/2017 by National Office of Intellectual Property of Vietnam.
- [4] Pham Thi Hong Nhung, Dinh Doan Long (2018), “Establishment of an in vitro Screening Model of Bioactive Compounds Using the Recombinant Central Nervous System Receptors”, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology* 34 (1): pp.105-110.

Date:

Full name: Pham Thi Hong Nhung