

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Phạm Thị Hồng Nhung

**NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH BIỂU HIỆN
THỤ THỂ NEUROKININ-1 TÁI TỔ HỢP TRÊN MỘT SỐ
HỆ THỐNG TẾ BÀO ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG
NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN DƯỢC PHẨM**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 9420101.21

DỰ THẢO TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2019

Công trình được hoàn thành tại:

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Đinh Đoàn Long

2. PGS.TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung

Phản biện:

Phản biện:

Phản biện:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng cấp cơ sở chấm luận án
tiến sĩ họp tại: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN
vào hồi:.....giờ.....phút, ngày.....tháng.....năm 2019

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm Thông tin - Thư viện, Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Thụ thể neurokinin - 1 (viết tắt là NK1R) nói riêng và thụ thể kết cặp với G-protein (viết tắt là GPCR) nói chung là đích tác dụng quan trọng của rất nhiều thuốc hiện nay. Khi NK1R tương tác với chất chủ vận nội sinh sẽ dẫn truyền cảm giác đau đớn từ vùng thần kinh ngoại vi về thần kinh trung ương, gây ra trạng thái lo âu và các triệu chứng giống trầm cảm. Trên cơ sở những nghiên cứu về cấu trúc và chức năng của NK1R, nhiều loại thuốc giảm đau cho các bệnh nhân bị chứng đau nửa đầu, thuốc chống trầm cảm, chống nôn cho các bệnh nhân ung thư... đã và đang được các hãng dược phẩm đầu tư phát triển và thương mại hóa.

Sàng lọc các hợp chất có hoạt tính sinh học hướng đích GPCR để phát triển thành thuốc là nhu cầu mang tính thời sự trong các nghiên cứu dược lý học phân tử. Có một số lượng lớn các hợp chất mới có nguồn gốc tự nhiên, bán tổng hợp hoặc tổng hợp (được gọi chung là các thuốc thử) cần xác định đích thụ thể tác dụng cũng như cơ chế tác động lên cơ thể. Việc sử dụng các GPCR tự nhiên trong các nghiên cứu này thường gặp khó khăn do các GPCR tự nhiên biểu hiện ở mức độ thấp, có nhiều dạng biến thể khác nhau. Tuy nhiên, những khó khăn trên có thể khắc phục bằng cách sử dụng các tế bào biểu hiện GPCR tái tổ hợp của người. GPCR tái tổ hợp biểu hiện ở mức độ cao và đầy đủ hoạt tính sẽ cung cấp nguồn nguyên liệu dồi dào cho các thí nghiệm xác định hoạt tính liên kết với phối tử cũng như chức năng liên kết của các G-protein. Chính vì vậy, xây dựng mô hình biểu hiện mạnh GPCR tái tổ hợp của người trên các hệ thống tế bào động vật là nghiên cứu cấp thiết và có giá trị thực tiễn trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

Mặc dù nhiều hệ thống biểu hiện đã được phát triển, đến nay biểu hiện hiệu suất cao và chủ động các protein xuyên màng tế bào vẫn là một thách thức lớn. Có một thuận lợi là các GPCR dù đa dạng về trình tự axit amin song có cấu trúc không gian tương đồng lớn (đều là đơn chuỗi polipeptit với 7 miền xuyên màng kỵ nước); vì vậy, mô hình biểu hiện thành công cho một thụ thể có khả năng mở rộng áp dụng cho rất nhiều thụ thể khác, đặc biệt là các thụ thể cùng họ GPCR. Trong các hệ thống biểu hiện, hệ thống biểu hiện của Semliki Forest virus (viết tắt là SFV) được ghi nhận là một trong những hệ thống biểu hiện protein màng tế bào động vật trong thời gian nhanh nhất. Theo tài liệu, hệ thống này đã được một số hãng dược phẩm (như Hoffman La Roche) ứng dụng biểu hiện cho hơn 100 GPCR phục vụ cho nghiên cứu và phát triển thuốc, nhưng các dòng tế bào tái tổ hợp không được thương mại hóa trên thị trường. Trong bối cảnh đó, việc ứng dụng và làm chủ được hệ thống biểu hiện SFV hứa hẹn cung cấp một công cụ sinh học hữu ích trong nghiên cứu y sinh được học ở Việt Nam.

Từ những tiền đề và cơ sở thực tiễn nêu trên, tôi tiến hành thực hiện luận án: ***“Nghiên cứu tối ưu hóa quy trình biểu hiện thụ thể neurokinin-1 tái tổ hợp trên một số hệ thống tế bào định hướng ứng dụng trong nghiên cứu và phát triển dược phẩm”***.

2. Mục tiêu nghiên cứu

2.1. Mục tiêu tổng quát

Biểu hiện được NK1R tái tổ hợp của người hoạt động chức năng trên dòng tế bào tự nhiên vốn không biểu hiện thụ thể này nhằm ứng dụng bước đầu cho sàng lọc hoạt chất và dịch chiết dược liệu hướng đích NK1R. Qua đó, xây dựng được mô hình biểu hiện thụ thể

tái tổ hợp cho các GPCR trên các dòng tế bào động vật khác nhau phục vụ cho các nghiên cứu và phát triển dược phẩm ở Việt Nam.

2.2. Mục tiêu cụ thể

- (1) Xây dựng được quy trình kỹ thuật biểu hiện NK1R tái tổ hợp của người thông qua hệ thống biểu hiện SFV trên dòng tế bào động vật.
- (2) Đánh giá được hoạt động chức năng của NK1R tái tổ hợp biểu hiện trên tế bào động vật.
- (3) Áp dụng được tế bào động vật biểu hiện thụ thể NK1R để bước đầu sàng lọc một số dược liệu tiềm năng.

3. Nội dung nghiên cứu

- (1) Phát triển hệ vectơ SFV biểu hiện NK1R tái tổ hợp của người.
- (2) Nuôi cấy và lựa chọn dòng tế bào nhân chuẩn phù hợp cho việc biểu hiện NK1R tái tổ hợp.
- (3) Xây dựng quy trình biểu hiện NK1R tái tổ hợp của người trên dòng tế bào động vật có vú.
- (4) Đánh giá mức độ biểu hiện và hoạt tính chức năng của NK1R tái tổ hợp.
- (5) Tạo ra một lượng lớn tế bào biểu hiện NK1R tái tổ hợp của người với đầy đủ chức năng, ứng dụng bước đầu trong nghiên cứu được lý *in vitro* trên thụ thể NK1R tái tổ hợp với dịch chiết methanol và tinh chất của 10 loài dược liệu Việt Nam.

4. Những đóng góp mới của luận án

Luận án là công trình đầu tiên ở Việt Nam nghiên cứu có hệ thống biểu hiện thụ thể màng của người tái tổ hợp, từ xây dựng vectơ chuyển gen mã hóa *NK1R* của người đến biểu hiện thụ thể tái tổ hợp trên các dòng tế bào động vật có vú. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học các hoạt chất hướng đích NK1R *in vitro* của luận án có giá trị khoa học và thực tiễn. Dòng tế bào động vật biểu hiện thụ thể

tái tổ hợp của người mà ở dạng tự nhiên không biểu hiện là công cụ hiện đại và hiệu quả phục vụ cho các nghiên cứu y sinh học.

Hệ thống biểu hiện SFV đã được thiết lập để tạo được dòng tế bào biểu hiện mạnh NK1R lần đầu tiên ở Việt Nam. Đây là cơ sở biểu hiện thụ thể có khả năng mở rộng áp dụng biểu hiện cho nhiều GPCR khác.

Mô hình sàng lọc *in vitro* các hoạt chất hướng đích NK1R được xây dựng là một công cụ mới, hiện đại phục vụ cho các nghiên cứu dược lý, phù hợp với định hướng phát triển các thuốc dược liệu của Việt Nam hiện nay.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Về mặt khoa học

Gen mã hóa *NK1R* của người đã được biểu hiện thành công trên dòng tế bào CHO, mở ra hướng nghiên cứu kỹ thuật biểu hiện ổn định các thụ thể tái tổ hợp phục vụ cho các nghiên cứu về cấu trúc phân tử, dược lý *in vitro*, góp phần định hướng cho các nghiên cứu phát triển thuốc ở các giai đoạn sau (nghiên cứu dược lý *in vivo*, nghiên cứu lâm sàng,...).

Cơ sở khoa học và hiệu quả của kỹ thuật chuyển gen, biểu hiện protein tái tổ hợp với hệ thống biểu hiện SFV đã được khẳng định thông qua việc phát triển thành công vector SFV mang gen mã hóa *NK1R* của người và biểu hiện hiệu quả trên tế bào động vật.

Về mặt thực tiễn

Hệ thống tế bào biểu hiện NK1R có hoạt tính được sử dụng trong các nghiên cứu dược lý *in vitro* có thể ứng dụng để sàng lọc các hoạt chất hướng đích thu từ các nguồn dược liệu khác của 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.

Không chỉ biểu hiện hiệu quả protein thụ thể, hệ thống SFV được xây dựng trong nghiên cứu này còn là công cụ hữu ích để chuyển gen và biểu hiện các loại protein khác nhau trên các dòng tế bào động vật. Nhiều nghiên cứu khác nhau trên thế giới đã cho thấy đây cũng là công cụ có tiềm năng ứng dụng trong liệu pháp gen trị liệu ung thư hay công nghệ sản xuất vắc-xin.

CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án có 153 trang (kể cả tài liệu tham khảo) được chia thành các chương, phần: Mở đầu (05 trang), Chương 1: Tổng quan tài liệu (33 trang), Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (19 trang), Chương 3: Kết quả nghiên cứu (28 trang), Chương 4: Bàn luận kết quả nghiên cứu (28 trang), Kết luận và kiến nghị (02 trang), Các công trình công bố liên quan đến luận án (01 trang), Tài liệu tham khảo (23 trang), Phụ lục (12 trang). Luận án có 9 bảng, 39 hình và tham khảo 173 tài liệu.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Luận án đã tổng kết các nội dung có liên quan, bao gồm: (1) thụ thể kết cặp G - protein (GPCR); (2) Tachikinin và các thụ thể neurokinin; (3) Sự biểu hiện của NK1R trên các dòng tế bào; (4) Các hệ thống biểu hiện thụ thể tái tổ hợp, (5) Sơ lược về các cây thuốc được thử nghiệm trong nghiên cứu.

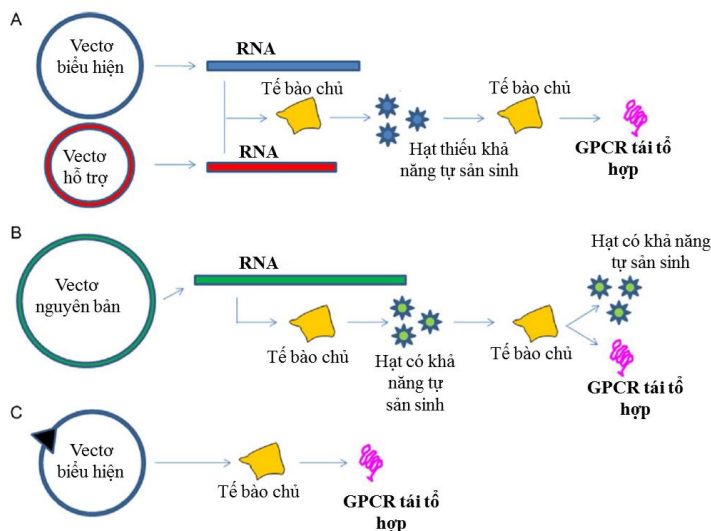
Có bốn siêu họ thụ thể chính, trong đó, GPCR là siêu họ thụ thể lớn và đa dạng nhất ở người (Lundstrom K., 2009). Theo thống kê năm 2017, 108 GPCR là đích tác dụng của 475 (chiếm khoảng 34%) thuốc được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Thuốc Hoa Kỳ

phê duyệt. Tổng doanh thu của các thuốc này trên thế giới lên đến 180 tỷ đô la Mỹ tương ứng 27% thị phần mỗi năm (Hauser A.S., 2017). Do sự liên quan đáng kể đến sinh lý bệnh của cơ thể và giá trị trong khám phá dược lý, các GPCR hiện nay là đích nghiên cứu thuốc có giá trị và được quan tâm nhiều nhất.

Tuy vậy, nghiên cứu dược lý phân tử và sàng lọc thuốc sử dụng các GPCR tự nhiên gặp nhiều trở ngại. Cụ thể, các GPCR tự nhiên thường chỉ được biểu hiện ở mức độ rất thấp, đồng thời có ở nhiều dạng phụ khác nhau hoặc các dạng biến thể khác nhau dẫn đến những nhận định không chính xác về khả năng tương tác với các thuốc thử (Lankiewicz S., 1998; Hassaine G., 2006, Lundstrom K., 2006). Thêm nữa, các dòng tế bào tự nhiên thường biểu hiện tín hiệu yếu với nhiều loại thụ thể GPCR nên các phép đo xác định thông số dược lực học phân tử có kết quả sai số lớn. Dễ dàng nhận thấy những khó khăn trên có thể được khắc phục bằng cách sản xuất các tế bào biểu hiện protein GPCR tái tổ hợp của người và dùng chúng làm đích phân tử cho các thí nghiệm nghiên cứu dược lý phân tử và sàng lọc thuốc. Bằng công nghệ DNA tái tổ hợp, từng đích phân tử protein có giá trị dược lý quan trọng (kể cả các dạng phụ hay các biến thể của từng loại) có thể được phân lập, nhân dòng và chủ động sản xuất ở lượng đủ lớn phục vụ cho các nghiên cứu dược lý phân tử và sàng lọc thuốc mới (Hassaine G., 2006).

Hiện nay, GPCR tái tổ hợp đã được nghiên cứu biểu hiện trong hệ thống dịch mã phi tế bào, hệ thống biểu hiện ở tế bào nhân sơ và nhân chuẩn. Trong đó, hệ thống biểu hiện của Semiliki Forest virus (viết tắt là SFV) được đánh giá là một trong những hệ thống có hiệu quả sản xuất GPCR tái tổ hợp của người trên các dòng tế bào động vật. Hệ thống này có thể tạo ra một lượng lớn các thụ thể biểu hiện

chức năng không khác biệt so với dạng tự nhiên. Các vector SFV đến nay đã được ứng dụng biểu hiện cho hơn 100 GPCR và mức độ biểu hiện trong phần lớn trường hợp là rất cao khi đo bằng phối tử đánh dấu và lai Western (Lundstrom K., 2006).



Hình 1.11. Các hệ thống vector biểu hiện GPCR xây dựng trên SFV. (A) Hệ thống gồm vector biểu hiện và vector hỗ trợ. (B) DNA vector có độ dài đầy đủ của hệ gen SFV. (C) Các vector DNA biểu hiện biến nạp trực tiếp vào các tế bào động vật có vú để biểu hiện GPCR.

Thụ thể neurokinin-1 (viết tắt là NK1R) thuộc phân họ thụ thể tachykinin, thuộc họ thụ thể A (họ thụ thể lớn nhất trong siêu họ GPCR). Ở hệ thần kinh trung ương, NK1R đóng vai trò quyết định sự sống của tế bào thần kinh, tham gia điều hòa phản xạ nôn, các chức năng tim mạch, hô hấp và điều chỉnh các hành vi phản xạ (Ebner K. và cs, 2006; Marieke V.D.H., 2009). Hiện nay, nhiều chất

đổi vận với NK1R đã được phát triển thành các thuốc dùng cho giảm đau trong điều trị đau nửa đầu, thuốc chống trầm cảm, thuốc chống nôn cho các bệnh nhân ung thư, ... Một số nghiên cứu còn chỉ ra các chất đối kháng thụ thể NK1, sau khi liên kết với thụ thể NK1 có tác dụng chống ung thư do ức chế sự tăng sinh, xâm lấn, di cư của tế bào ung thư và cảm ứng tế bào ung thư chết theo chu trình (Berger M và cs, 2014; Munoz M. và cs, 2015).

Mười cây thuốc được lựa chọn cho thử nghiệm đánh giá tương tác với thụ thể NK1R dựa trên kinh nghiệm dân gian và tài liệu y học cổ truyền. Ngoài canhkin là loài ngoại nhập, chín loài còn lại đều là những cây thuốc Việt Nam được sử dụng trong nhiều bài thuốc y học cổ truyền. Ngoài trừ Râu mèo được chọn ngẫu nhiên, các cây thuốc còn lại được chọn dựa trên tác dụng của chúng liên quan đến tác dụng sinh lý đã biết của NK1R như an thần, giảm đau, kháng viêm, chữa thấp khớp, hen suyễn, tăng cường miễn dịch, chống nôn, tăng co hoặc giãn cơ trơn, thúc đẩy phân bào.... Trong nghiên cứu này, giả thiết ban đầu của chúng tôi là những tác dụng của các cây thuốc này có thể liên quan đến NK1R.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vector **pEGFP-NK1** và **pJET1.2-NK1** mang cDNA mã *NK1R* do PGS. TS. Võ Thị Thương Lan (Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội) cung cấp. Vector **pSFV2** và **pSFV-Helper2** là quà tặng của TS. Ghérici Hassain (Trường Đại học Công nghệ Liên Bang Laussane, Thụy Sĩ).

Chúng vi khuẩn *E.coli* DH5 α mua từ Invitrogen (Mỹ). Các dòng tế bào động vật có vú: BHK-21 (Tế bào thận chuột Hamster

con), HEK-293 (tế bào thận phôi người), CHO (tế bào buồng trứng chuột Hamster Trung Quốc), U937 (tế bào ung thư bạch cầu đơn nhân người), HeLa (tế bào ung thư cổ tử cung người) mua từ CLS (Cell lines service, Đức).

Dịch chiết methanol có nồng độ gốc 50 mg/mL thu từ 10 loài dược liệu là canhkina, đảng sâm, cỏ màn trâu, ba kích, râu mèo, sâm vũ diệp, tam thất hoang, hồ tiêu, hòe và bình vôi. Bốn tinh chất thu từ các mẫu dược liệu trên gồm Capsaicin và Piperine ở Hồ tiêu, Rotundin ở Bình vôi, Rutin ở Hòe.

Các bộ kit, hóa chất được mua tại các hãng nổi tiếng thế giới như Thermo Fisher Scientific, QIAGEN, Sigma-Aldrich, Biorad ..

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phát triển hệ thống vector SFV biểu hiện NK1R, bao gồm các phương pháp: (1) Thiết kế cặp mồi khuếch đại gen trong PCR dựa trên phần mềm PerPrimer phiên bản 1.1.14; (2) Phát triển vector biểu hiện pSFV-KLEPT1.2; (3) Tạo vector tái tổ hợp pSFV-KLEPT1.2-NK1 và pSFV-EGFP-NK1 mang đoạn chèn *NK1* dựa trên công nghệ DNA tái tổ hợp; (3) Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt; (4) Sàng lọc chủng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp bằng kỹ thuật colony-PCR và giải trình tự; (5) Nhân dòng, tách chiết thu hồi các vector.

2.2.2. Phiên mã *in vitro* từ vector biểu hiện và vector hỗ trợ, gồm 2 bước cơ bản: (1) Mở vòng plasmid pSFV-NK1 và pSFV-Helper 2 bằng enzym giới hạn; (2) Thực hiện phản ứng phiên mã *in vitro* sử dụng enzym SP6 RNA polymerase và mũ m7G.

2.2.3. Tạo hạt SFV chuyển gen NK1R của người

mRNA mã NK1R và mRNA vỏ virus được đồng biến nạp vào tế bào BHK-21 để sản xuất hạt virus SFV mang gen mã hóa

NK1R. Công đoạn này gồm 3 bước: (1) Chuẩn bị tế bào BHK-21 đạt khoảng 80% tế bào đồng dòng để chuyển gen; (2) Đồng biến nạp RNA vào tế bào BHK-21 bằng xung điện; (3) Thu hoạch hạt virut tạo ra từ tế bào BHK-21 với màng lọc 0,22 μm ; (4) Định lượng hạt virut SFV thu được thông qua đo hấp thụ quang ở bước sóng 260 và 280 nm.

2.2.4. Biểu hiện NK1R tái tổ hợp thông qua lây nhiễm SFV

Virut SFV được hoạt hóa thông qua α -chymotrypsin và apotinin trước khi lây nhiễm. Khi tế bào trong bình T25 đạt 70 đến 80% đồng dòng, 0,5 mL dịch chứa hạt SFV đã hoạt hóa được bổ sung vào bình nuôi cấy. Tế bào sẽ tiếp tục được nuôi ở 37°C qua đêm trong tủ CO₂ để virut lây nhiễm và biểu hiện NK1R trên tế bào chủ. Sau 12 - 48 giờ nuôi cấy, thu tế bào để thử hoạt tính trước khi sử dụng cho đánh giá tương tác thuốc thử - thụ thể tiếp theo.

2.2.5. Đánh giá mức độ biểu hiện và hoạt tính NK1R.

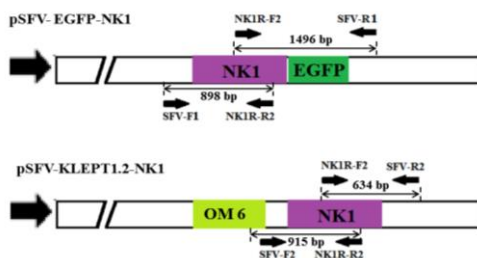
Hạt virut tạo ra từ vector pSFV-EGFP-NK1 được dùng để nghiên cứu động học biểu hiện protein tái tổ hợp thông qua sự biểu hiện của protein huỳnh quang lực mạnh eGFP. Hai phương pháp được sử dụng để kiểm tra biểu hiện thụ thể NK1R là (1) Đánh giá sự có mặt của NK1R thông qua lai Western; (2) Đánh giá biểu hiện chức năng của NK1R qua phép thử Fura-2 với phối tử đặc hiệu của NK1R là chất P (viết tắt là SP). Chúng tôi sử dụng Kit Fura-2AM và đo động học trên máy đo huỳnh quang Chameleon liên tục trong 60 giây. Quá trình đo động học liên tục giúp xác định sự biến thiên nồng độ Ca²⁺ nội bào theo thời gian. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và tiến hành trên đĩa 96 giếng với 100 μl môi trường chứa khoảng 60.000 tế bào.

2.2.6. Nghiên cứu dược lý *in vitro* dịch chiết methanol và tính chất của một số dược liệu Việt Nam trên thụ thể NK1 tái tổ hợp

Trong phép thử Fura 2AM đánh giá tương tác giữa thụ thể và phối tử, thuốc thử được thử với với ba lần lặp lại trong vùng nồng độ 10^{-1} - 10^3 $\mu\text{g/mL}$ với dịch chiết methanol và 10^{-3} - 10^3 μM với tinh chất. Các giá trị thu được từ mỗi nồng độ của thuốc thử được dùng để dựng đường cong liều lượng - đáp ứng bằng phần mềm Graph Prism 6.01 theo mô hình sigmoid. Thông số động học của thuốc thử (EC_{50}/K_d đối với chất chủ vận hoặc IC_{50}/K_i đối với chất đối kháng) được xác định qua đường cong liều lượng - đáp ứng.

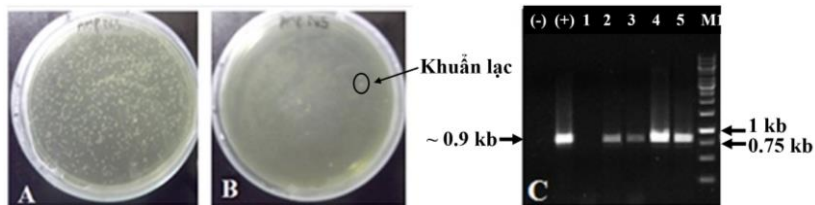
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phát triển vector SFV biểu hiện NK1R

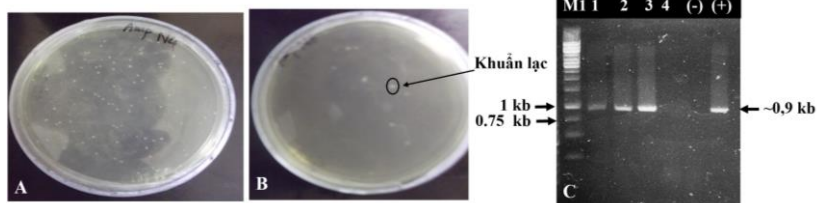


Hình 3.1. Vị trí các môi dùm nhân dòng đoạn chèn mã cho *NK1R* trong vector pSFV2-EGFP-NK1 và pSFV-KLEPT1.2-NK1. NK1: gen mã cho neurokinin-1, EGFP: gen mã cho protein huỳnh quang lục mạnh, OM6: đoạn trình tự mã hóa cho đuôi Flag, poly-Histidin và vị trí Thrombin

Các cặp môi phục vụ cho sàng lọc vector SFV mang gen mã *NK1R* được thiết kế với vị trí mô tả ở Hình 3.1. Khuẩn lạc mang đoạn chèn *NK1* đúng chiều trong vector sẽ tạo ra sản phẩm colony-PCR có kích thước khoảng 900 bp.



Hình 3.4. Kết quả sàng lọc khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pSFV-KLEPT1.2-NK1. Kết quả nuôi cấy trên đĩa LB đặc có bổ sung ampicillin của khuẩn lạc *E.coli* được biến nạp: **(A)** hỗn hợp nối pSFV-KLEPT1.2-NK1; **(B)** hỗn hợp nối chỉ chứa pSFV-KLEPT1.2 đã mở vòng. **(C)** Kết quả điện di sản phẩm colony - PCR với cặp mồi SFV-F2/NK1R-R2: (-): đối chứng âm (PCR *E.coli* không biến nạp); (+): đối chứng dương; **1-5**: sản phẩm colony - PCR với mồi SFV-F1 và NK1R2; **M1**: thang chuẩn DNA 1kb

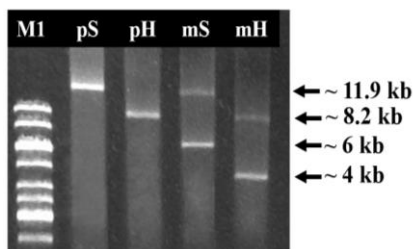


Hình 3.6. Kết quả sàng lọc khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pSFV-EGFP-NK1. Kết quả nuôi cấy trên đĩa LB đặc có bổ sung ampicillin của khuẩn lạc *E.coli* được biến nạp: **(A)** hỗn hợp nối pSFV-EGFP-NK1; **(B)** hỗn hợp nối chỉ chứa pSFV2 đã mở vòng. **(C)** Kết quả điện di sản phẩm colony - PCR với cặp mồi SFV-F1/NK1R-R2: (-): đối chứng âm (PCR *E.coli* không biến nạp); (+): đối chứng dương; **1-4**: sản phẩm colony - PCR với mồi SFV-F1 và NK1R2; **M1**: thang chuẩn DNA 1kb.

Kết quả giải trình tự đoạn chèn của vector cho thấy đoạn chèn mã cho *NK1R*, có độ tương đồng 100% với trình tự cDNA mã *NK1R* trên vector nhân dòng pJET1.2-NK1. Như vậy chúng tôi đã tạo

thành công vector biểu hiện pSFV chèn cDNA mã hóa *NK1R* có chiều dài đầy đủ.

3.2. Phiên mã *in vitro* từ vector biểu hiện và vector hỗ trợ



Hình 3.7. Kiểm tra chất lượng DNA plasmit được mở vòng và sản phẩm RNA được phiên mã *in vitro* trên gel agarose 1%. M1: thang chuẩn DNA 1kb; pS: DNA plasmit pSFV- KLEPT1.2-NK1R được mở vòng bằng enzym *NruI* (kích thước khoảng 11,9 kb); pH: DNA plasmit pSFV-Helper2 được mở vòng bằng enzym *SpeI* (kích thước khoảng 8,2 kb); mS: RNA của pSFV- KLEPT1.2-NK1R được phiên mã *in vitro*; mH: RNA của pSFV-Helper2 được phiên mã *in vitro*.

Kết quả điện di trên Hình 3.7, làn pS (DNA plasmit pSFV- KLEPT1.2-NK1R được mở vòng bằng enzym *NruI*) và làn pH (DNA plasmit pSFV-Helper2 được mở vòng bằng enzym *SpeI*) thu được duy nhất một băng DNA tương đồng với kích thước lý thuyết. Kết quả điện di sản phẩm RNA được tạo ra từ 2 vector pSFV- KLEPT1.2-NK1R và pSFV-Helper2 có độ đặc hiệu cao, sản phẩm được phiên mã hoàn toàn với độ dài đầy đủ; không có vệt băng kéo dài do phản ứng phiên mã không hoàn toàn.

3.3. Tạo hạt SFV mang gen *NK1R* của người

Ở bước tạo hạt virus, hai đoạn RNA được tạo ra từ pSFV- NK1R và pSFV-Helper2 được đồng biến nạp vào tế bào BHK-21

bằng phương pháp xung điện với các điều kiện sau khi tối ưu về hiệu điện thế và kiểu bắn xung trình bày ở **Bảng 3.2**. Sau 2 lần lặp lại thí nghiệm tối ưu cùng kết quả quan sát trong các lô tạo hạt virus sau đó, chúng tôi nhận thấy hiện tượng tan bào BHK-21 ổn định sau 42 giờ. Chính vì vậy, 42 giờ sau khi chuyển gen bằng xung điện thường được lựa chọn là thời điểm thu hạt virus từ môi trường nuôi cấy sử dụng màng lọc 0.22 μm .

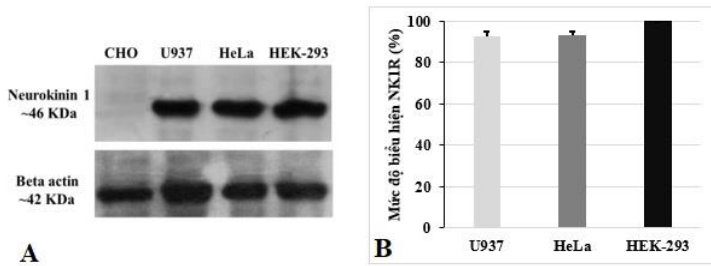
Bảng 3.2. Chế độ xung điện đồng biến nạp RNA hệ SFV vào tế bào BHK-21 bằng thiết bị Gene pulser Xcell II

Bình nuôi T75 (chứa BHK-21)	Kiểu bắn xung	Trở kháng (μF)	Hiệu điện thế (V)	Số lần bắn xung	Thời gian (ms)
Bình tạo virus (<i>bổ sung RNA</i>)	Phân rã theo hàm mũ	75	360	1	0.9
Đối chứng vật lý (<i>không RNA</i>)	Phân rã theo hàm mũ	75	360	1	
Đối chứng sinh học (<i>không RNA</i>)	-	-	-	0	

Mật độ virus tạo ra từ pSFV-KLEPT1.2-NK1 sau khi cô đặc thu được trung bình là 34,9 ng/mL tương ứng khoảng 50×10^{10} (hạt virus/mL) với $\text{OD}_{260/280}$ $1,04 \pm 0,2$. Mật độ virus tạo ra từ pSFV-EGFP-NK1 sau khi cô đặc trung bình là 32,6 ng/mL tương ứng khoảng $46,9 \times 10^{10}$ (hạt virus/mL) với $\text{OD}_{260/280}$ $1,24 \pm 0,3$.

3.4. Nuôi cấy và chọn dòng tế bào biểu hiện NK1R tái tổ hợp

Kết quả lai Western được thể hiện ở Hình 3.9 cho thấy 3 dòng tế bào là U937, HeLa, HEK-293 xuất hiện băng có kích thước phù hợp với thụ thể NK1R (khoảng 46 kDa). Trong 4 dòng tế bào nuôi cấy, chỉ có dòng tế bào CHO không biểu hiện NK1R ở dạng tự nhiên và được chúng tôi lựa chọn để biểu hiện NK1R tái tổ hợp của người.

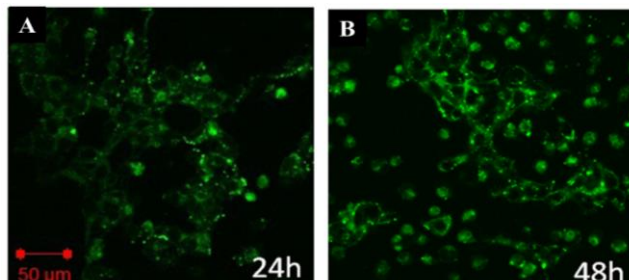


Hình 3.9. Biểu hiện NK1R trên một số dòng tế bào. A: Kết quả lai Western của một số dòng tế bào với kháng thể kháng neurokinin 1 và kháng thể kháng beta actin, kí hiệu trên các làn là tên dòng tế bào phân tích. B: Mức độ biểu hiện NK1 của các dòng tế bào (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn).

3.5. Đánh giá biểu hiện NK1R tái tổ hợp trên tế bào CHO

3.5.1. Đánh giá động học biểu hiện protein

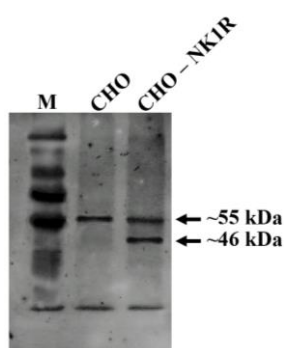
Kết quả quan sát tế bào CHO cho thấy tế bào biểu hiện eGFP mạnh sau 24 đến 48 giờ lây nhiễm virus SFV mang gen eGFP tái tổ hợp. Như vậy, tế bào CHO có thể được sử dụng trong các nghiên cứu liên quan đến biểu hiện protein tái tổ hợp trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ sau lây nhiễm virus SFV.



Hình 3.10. Ảnh hiển vi huỳnh quang tế bào CHO được lây nhiễm virus SFV mang gen eGFP tái tổ hợp. Ảnh chụp tế bào sau khi lây nhiễm hạt SFV-eGFP 24 giờ (A) và 48 giờ (B).

3.5.2. Kiểm tra biểu hiện NK1R trên tế bào CHO qua lai Western

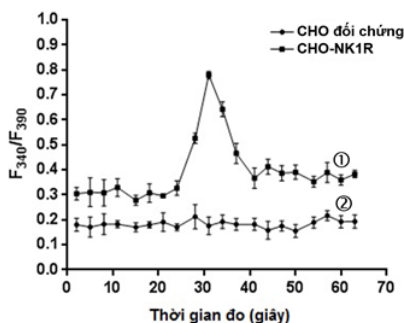
Kết quả hiện băng khi lai Western trên Hình 3.12 cho thấy chỉ có dòng tế bào CHO-NK1R xuất hiện băng tương ứng với kích thước của thụ thể NK1R là 46 KDa. Như vậy, chúng tôi đã biểu hiện thành công thụ thể NK1 của người trên dòng tế bào CHO mà ở dạng tự nhiên không biểu hiện thụ thể này thông qua hệ thống biểu hiện SFV.



Hình 3.12. Ảnh lai Western với kháng thể kháng beta-III-tubulin và kháng thể kháng neurokinin 1 của tế bào CHO tự nhiên và tế bào CHO nhiễm hạt SFV-NK1R. CHO: mẫu tế bào CHO tự nhiên; **CHO -NK1R:** mẫu tế bào CHO được phân tích 24 giờ sau lây nhiễm hạt SFV-NK1R; **M:** thang chuẩn PageRuler Prestained Protein

3.5.3. Phép thử chức năng thụ thể bằng Fura-2AM

Với phép thử chức năng thụ thể bằng phương pháp Fura-2, Lượng Ca^{2+} được giải phóng được tính từ tỉ số F340/F390 tăng do SP kích thích cho thấy tế bào CHO-NK1R đã biểu hiện thụ thể có chức năng truyền tín hiệu (đường số ①, **Hình 3.13**), trong khi tế bào CHO không lây nhiễm virus SFV không có đáp ứng tế bào trong suốt thời gian đo dù được bổ sung SP (đường số ②, **Hình 3.13**). Từ kết quả lai Western và Fura-2, CHO được lây nhiễm hạt virus SFV được khẳng định đã biểu hiện thành công thụ thể NK1R hoạt động chức năng, sẵn sàng sử dụng cho các nghiên cứu được lý phân tử và sàng lọc thuốc.



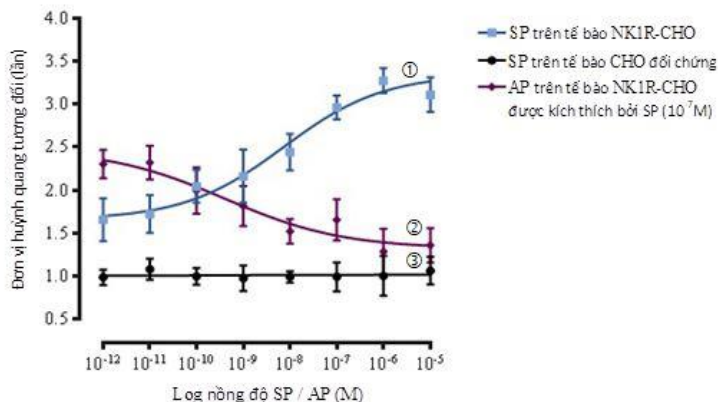
Hình 3.13. Sự thay đổi Ca^{2+} nội bào của tế bào CHO và CHO-NK1R theo thời gian sau khi bổ sung chất P. SP được bổ sung ngay trước khi đo. Đường số ①) là kết quả đo với tế bào CHO-NK1R. Đường số ②) là kết quả đo với tế bào CHO tự nhiên đối chứng

3.6. Nghiên cứu dược lý *in vitro* dịch chiết methanol và tinh chất của một số dược liệu Việt Nam trên thụ thể NK1 tái tổ hợp

3.6.1. Xác định các thông số dược lực học của chất chủ vận và chất đối kháng đặc hiệu NK1R

Kết quả ở **Hình 3.14** cho thấy tế bào CHO không lây nhiễm virus (CHO đối chứng) không có đáp ứng tế bào nào xảy ra khi được xử lý với SP ở mọi nồng độ. Trong khi đó ở đường số ①, khi nồng độ SP tăng từ 10^{-12} đến 10^{-5}M tế bào CHO được lây nhiễm SFV-NK1R đã xuất hiện đáp ứng nội bào, thể hiện qua lượng Ca^{2+} được giải phóng tăng theo hàm sigmoid và trở nên bắt đầu bão hòa ở nồng độ cao của SP (10^{-7} đến 10^{-6}M). Từ hàm hồi quy thu được, chúng tôi xác định được K_d của SP là $7,32 \pm 1,24\text{ nM}$, thuộc vùng nanomol, giống như phần lớn các phối tử đặc hiệu tương tác với các thụ thể GPCR nói chung (Kroeze W.K.,2003; Marinissen M.J.,2001) và các thụ thể tachykinin (NK-1R, NK-2R và NK3-R) nói riêng (Almeida Ta,2004; Pannefather Jn, 2004). Từ kết quả này chúng tôi cũng xác định được EC_{80} (nồng độ kích thích thụ thể đạt 80% hoạt độ tối đa) của SP $\approx 10^{-7}\text{M}$. Trong điều kiện có mặt 10^{-7}M SP, chúng tôi đã bổ sung nồng độ tăng dần từ 10^{-12} đến 10^{-5}M của chất đối kháng đặc

hiệu AP. Ở kết quả thể hiện ở đường số ② trên **Hình 3.14**, hoạt độ thụ thể giảm rõ rệt khi nồng độ AP tăng dần. Qua đó, chúng tôi xác định được giá trị K_i của AP thông qua Phương trình Cheng-Prusoff trong mô hình tế bào CHO-NK1R của nghiên cứu này là $41,1 \pm 9,90$ nM, cũng thuộc vùng nanomol.



Hình 3.14. Đường cong đáp ứng theo liều thể hiện hoạt tính biểu hiện chức năng của thụ thể NK1R tái tổ hợp của người.

Trong thí nghiệm sơ cấp, các dịch chiết methanol và tinh chất của 10 loài cây thuốc được chọn cho nghiên cứu được thử nghiệm với tế bào CHO được lây nhiễm SFV-NK1R đều không gây đáp ứng tăng sinh Ca^{2+} nội bào ở mọi nồng độ được thử nghiệm trong dải từ 0 đến 1000 $\mu\text{g/mL}$ (được chuẩn bị theo dãy Log10). Điều đó chứng tỏ không có dịch chiết nào trong những loài cây thuốc này có xu hướng biểu hiện hoạt tính chủ vận, hay hoạt hóa thụ thể.

Từ kết quả sơ bộ đó, chúng tôi tiến hành thí nghiệm thứ cấp với giả thiết các dịch chiết/ tinh chất có thể có hoạt tính đối kháng thụ thể NK1R. Phân tích kết quả chúng tôi nhận thấy trong số 10 loài được liệu được sàng lọc, tính trung bình hoạt độ mạnh nhất được

quan sát thấy ở loài Bình vôi với giá trị IC_{50} được xác định trong khoảng từ $4,7 \pm 0,21$ đến $53,1 \pm 1,93$ $\mu\text{g/mL}$; giá trị IC_{50} trung bình (IC_{50}^{TB}) của loài $\approx 20,1$ $\mu\text{g/mL}$. Tiếp theo là Hồ tiêu với giá trị IC_{50} dao động từ $5,7 \pm 0,41$ đến $60,5 \pm 2,77$ $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50}^{TB} \approx 29.9$ $\mu\text{g/mL}$) và Hòe với các giá trị IC_{50} từ $15,4 \pm 0,27$ đến $63,5 \pm 1,42$ $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50}^{TB} \approx 58.5$ $\mu\text{g/mL}$). Nhìn chung, dịch chiết methanol các loài khác có hoạt độ yếu hơn ($IC_{50}^{TB} > 60$ $\mu\text{g/mL}$) với hoạt lực xác định theo trật tự: Cỏ mần trầu ($IC_{50}^{TB} \approx 76,1$ $\mu\text{g/mL}$) > Râu mèo ($IC_{50}^{TB} \approx 93,1$ $\mu\text{g/mL}$) > 2 loài Panax ($IC_{50}^{TB} \approx 99,2$ $\mu\text{g/mL}$) > Đẳng sâm ($IC_{50}^{TB} \approx 100,1$ $\mu\text{g/mL}$) > Canh ki na ($IC_{50}^{TB} \approx 433,7$ $\mu\text{g/mL}$). Riêng đối với các dịch chiết Ba Kích, chỉ số IC_{50} không xác định được do tín hiệu huỳnh quang có xu hướng không đổi khi nồng độ dịch chiết tăng tới 100 $\mu\text{g/mL}$, nhưng tại nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$ tín hiệu tăng đột ngột. Vì đây là nồng độ rất cao của dịch chiết nên hiện tượng này biểu hiện một kiểu tương tác không đặc hiệu nào đó. Tiếp tục phân tích sâu hơn, chúng tôi đã tìm thấy hoạt độ ức chế mạnh nhất ở rotundin từ Bình vôi với IC_{50} được xác định bằng 0,88 μM . Hoạt tính ức chế thấp hơn được quan sát thấy đối với capsaicin và piperine từ Hồ tiêu với IC_{50} của hai chất này vào khoảng 2,0 μM . Trong khi đó, rutin hầu như không ức chế thụ thể NK1R ngay cả khi nồng độ được tăng cao đến 100 μM .

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4.1. Phát triển vector SFV biểu hiện NK1R của người trên tế bào CHO

Để biểu hiện thụ thể màng thông qua lây nhiễm hạt SFV, tế bào CHO đã được lựa chọn sử dụng trong nhiều nghiên cứu bởi hệ thống nội màng phát triển, đồng thời phù hợp cho các phép thử tương tác thụ thể do tế bào khỏe và thời gian sống kể từ khi lây

niễm virus thường dài hơn so với tế bào HEK-293 hoặc BHK-21 (Simmen U., 1999; Sjöberg M., 2005). Lundström K. là người thiết lập hệ vectơ SFV và đã sử dụng hệ vectơ này để biểu hiện NK1R của người trên dòng tế bào CHO từ năm 1994. Phép thử Fura-2 được xây dựng trong nghiên cứu này đã khắc phục được hai nhược điểm trong phép đo của nghiên cứu trên. Thứ nhất, nghiên cứu của tôi thực hiện phép đo Fura-2 trên tế bào bám đáy. Điều này giảm thiểu sự mất và vỡ tế bào qua các lần ly tâm thu tế bào, qua đó giảm lượng tế bào phải sử dụng và nuôi cấy cho phép thử. Thứ hai, thực hiện phép thử chức năng thụ thể bằng Fura-2 được thực hiện trên đĩa 96 giếng cho phép đồng thời thực hiện nhiều phân tích tại một thời điểm, tăng cường hiệu suất sàng lọc các thuốc thử. Với số lượng thuốc thử có nguồn gốc từ dược liệu tự nhiên hoặc tổng hợp rất lớn hiện nay, phát triển các phương pháp sàng lọc thuốc hiệu năng cao là nhu cầu cấp thiết của ngành dược phẩm.

Chỉ số K_d của SP cũng như K_i của AP thu được trong nghiên cứu này trên tế bào CHO-NK1R tương ứng vào khoảng 5 - 9 nM và 30 - 50 nM, cao hơn so với một số nghiên cứu trước đây khi các chỉ số này được tìm thấy lần lượt xấp xỉ 1 nM với SP (Eistetter H., 1992; Steiner D., 1992) hay <10 nM đối với AP (Huang S., 2010). Điều này có thể là do khác biệt về dòng tế bào được sử dụng. Trong thực tiễn, nhìn chung các dòng GPCR tái tổ hợp cho các chỉ số K_d và K_i của các chất chủ vận và đối kháng thụ thể trong vùng nanomol thường được chấp nhận là đủ hoạt tính phục vụ cho các nghiên cứu dược lực học phân tử và sàng lọc thuốc (Simment U., 1998).

4.2. Nghiên cứu các dạng biến thể của thụ thể

Việc xuất hiện bốn đột biến trên cDNA thu được từ mẫu mô người Việt Nam so với trình tự gen mã hóa NK1R công bố trên

NCBI đã cho thấy khả năng tồn tại có các dạng biến thể NK1R khác nhau trong quần thể người. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tác động thay đổi ái lực liên kết với phối tử đặc hiệu của NK1R của một số đột biến điểm trên gen mã cho *NK1R*. Các đột biến điểm này làm thay đổi axit amin trong chuỗi polypeptit, dẫn đến thay đổi khả năng tương tác của NK1R với các phối tử khác nhau. Nghiên cứu hoạt tính của các dạng phụ NK1R sẽ cung cấp cơ sở sinh học cho cá thể hóa trong điều trị. Mỗi bệnh nhân mang dạng phụ NK1R khác nhau do các biến đổi di truyền có thể có đáp ứng thuốc là phối tử của NK1R ở mức độ khác nhau. Bác sĩ dựa vào kết quả của các nghiên cứu cấu trúc và chức năng của các dạng phụ này có thể khuyến cáo cho bệnh nhân loại thuốc nào là tối ưu nhất trong quá trình điều trị.

4.3. Nghiên cứu dược lý *in vitro* các hoạt chất hướng đích thụ thể NK1R tái tổ hợp

Trong thí nghiệm sơ cấp, không có dịch chiết nào trong những loài cây thuốc này có xu hướng biểu hiện hoạt tính chủ vận, hay hoạt hóa thụ thể. Kết quả nghiên cứu này khá trùng lặp với nhiều nghiên cứu sàng lọc trước đây, cho thấy ít khi bắt gặp các hợp chất tự nhiên có hoạt tính chủ vận đối với các thụ thể hệ thần kinh trung ương (Matsushima.M., 1994; Simmen U., 1999).

Việc xác định được rotundin từ cây Bình vôi có hoạt tính ức chế thụ thể NK1R ở cấp độ *in vitro* trong nghiên cứu này giải thích cho các tác dụng sinh lý được biết từ lâu và một số kết quả nghiên cứu dược lý *in vivo* và thử nghiệm lâm sàng sau này được thực hiện bởi các nhà khoa học trong nước với các dịch chiết và chế phẩm làm thuốc từ Bình vôi. Ngay từ năm 1941, Trần Văn Thuyết đã phát hiện rotundin có tác dụng an thần, gây ngủ, hạ huyết áp, điều hòa tim, giãn cơ trơn, giảm các cơn đau do co cơ trơn. Năm 1994,

Phạm Thị Kim thử nghiệm Rotundin liều cao trên chuột vừa khẳng định tính an toàn của hợp chất này ($LD_{50} > 150$ mg/kg thể trọng), vừa xác nhận các tác dụng giảm đau, an thần, gây ngủ trên động vật thí nghiệm. Trong y học hiện đại, rotundin được xác định là L.tetrahydropalmatin, được dùng làm thuốc an thần, gây ngủ, giảm đau, điều trị một số trường hợp rối loạn tâm thần chức năng, trạng thái căng thẳng thần kinh, mất ngủ dai dẳng nguyên nhân tâm thần. Đây cũng là các tác dụng dược lý từng biết đối với các chất đối kháng thụ thể NK1R như aprepitant và các dẫn xuất của nó (Huang S., 2010).

Không giống rotundin lần đầu tiên được xác định có hoạt tính đối kháng NK1R, capsaicin và piperine cùng nhiều dẫn xuất cùng thuộc nhóm alkaloid của chúng trước đây đã được tìm thấy có tính đối kháng với thụ thể NK1R. Nhiều hãng dược phẩm đã đăng ký bản quyền cho các chế phẩm từ Hồ tiêu này, trong đó có thể kể đến piperidin của Janssen, piperazin và 4-aminopiperidin của Boehringer Ingelheim, DNK333 của Novartis, ezlopitant và maropitant của Pfizer, dapitant của Rhone-Poulenc, các dẫn xuất phenylpiperidin của Hisamitsu.

Việc các dịch chiết Hồ có hoạt độ ức chế NK1R tương đối ổn định, song Rutin hầu như không có ảnh hưởng đáng kể nào đến hoạt động của thụ thể cho thấy trong dịch chiết Hồ có thể có thành phần khác tác động lên thụ thể NK1.

Hiện nay không chỉ Việt Nam mà trên thế giới, xu hướng phát triển các thuốc dược liệu có thành phần từ tự nhiên ngày càng phát triển. Khác với thuốc tân dược thường chỉ chứa dược chất có cơ chế dược lý đã biết rõ, các cây dược liệu bản địa thường có dạng đa chất, có thể gồm hoạt chất chưa rõ về cơ chế lẫn với các chất không có

hoạt tính, thậm chí độc chất. Chính vì vậy, việc tiêu chuẩn hoá và phát triển các sản phẩm thuốc có nguồn gốc tự nhiên đang là đòi hỏi cấp bách trong quá trình hiện đại hoá, công nghiệp hoá nền y học cổ truyền. Muốn vậy, các nghiên cứu nhằm xác định các cơ chế tác dụng của thuốc, phát hiện các mục tiêu tác dụng của thuốc, xác định các hợp chất có hoạt tính sinh học cần phải được triển khai một cách toàn diện và có hệ thống. Đối với dược liệu tự nhiên, các phép thử sinh học tương tác với các protein thụ thể có thể đồng thời giúp dự đoán hoặc xác định cơ chế tác dụng dược lý của dược liệu và đích dược lý phân tử của các thành phần dược liệu. Theo đó, mô hình sàng lọc các hợp chất có hoạt tính sinh học và nghiên cứu dược lý trên cơ sở các mô hình đánh giá tương tác với các GPCR tái tổ hợp ở người có nhiều tiềm năng và cần được quan tâm thúc đẩy.

KẾT LUẬN

1. Đã thiết lập được hệ thống quy trình kỹ thuật biểu hiện thụ thể neurokinin-1 (NK1R) tái tổ hợp của người thông qua hệ vector biểu hiện Semliki Forest Virut (SFV) được cải biến. Quy trình tạo hạt SFV mang gen mã hóa *NK1R* thông qua đồng biến nạp bằng xung điện RNA phiên mã *in vitro* từ vectơ SFV biểu hiện và vectơ hỗ trợ vào tế bào BHK-21 cho phép tạo ra khoảng 50×10^{10} hạt virut/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.
2. 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 khi NK1R tái tổ hợp biểu hiện trên tế bào CHO tương

tác với chất chủ vận (chất P) và giảm khi thụ thể này tương tác với chất đối kháng (aprepitant) cho thấy thụ thể có hoạt tính chức năng đầy đủ.

3. 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. 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 ($IC_{50} = 0,88 \mu M$) cho thấy NK1R nhiều khả năng là một đích dược lý phân tử quan trọng của chất này. Hoạt độ đối kháng NK1R tương đối ổn định với các dịch chiết Hồ tiêu (IC_{50} trong khoảng 5,7 và 60,5 $\mu g/mL$) và Hòe (IC_{50} trong khoảng 15,4 và 140,6 $\mu g/mL$). 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.

KIẾN NGHỊ VỀ NHỮNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

1. Mở rộng áp dụng thụ thể NK1R tái tổ hợp được tạo ra từ đề tài trong các nghiên cứu dược lý của các loài cây dược liệu khác ở Việt Nam.
2. Áp dụng mở rộng nhân dòng và biểu hiện các thụ thể GPCR khác có vai trò dược lý quan trọng phục vụ cho các nghiên cứu dược lý phân tử và phát triển thuốc ở Việt Nam. Phân lập và biểu hiện các dạng biến dị phổ biến, đặc trưng trong các gen mã thụ thể GPCR ở người Việt Nam nhằm làm sáng tỏ mối quan hệ phần lớn còn chưa biết đầy đủ giữa cấu trúc gen và hoạt động chức năng của thụ thể.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ 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 *invitro* 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.