

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

DIỆP THỊ HƯƠNG GIANG

**ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA RETINOIC ACID
LÊN SỰ BIỂU HIỆN CỦA CÁC GEN LIÊN QUAN
TỚI SỰ LÃO HÓA VÀ CON ĐƯỜNG TÍN HIỆU NOTCH
Ở TẾ BÀO UNG THƯ DẠ DÀY MKN45**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

THÁI NGUYÊN - 2019

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

DIỆP THỊ HƯƠNG GIANG

**ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA RETINOIC ACID
LÊN SỰ BIỂU HIỆN CỦA CÁC GEN LIÊN QUAN
TỚI SỰ LÃO HÓA VÀ CON ĐƯỜNG TÍN HIỆU NOTCH
Ở TẾ BÀO UNG THƯ DẠ DÀY MKN45**

**Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
Mã số: 84 20 201**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Phú Hùng

THÁI NGUYÊN - 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào. Mọi kết quả thu được không chỉnh sửa, sao hoặc chép từ các nghiên cứu khác. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Phú Hùng đã định hướng khoa học, tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất trong suốt quá trình tôi tiến hành nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô và cán bộ Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã tận tình dạy dỗ, chỉ bảo và truyền cho tôi niềm đam mê nghiên cứu khoa học.

Đề tài luận văn nhận được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp bộ mã số B2017 – TNA48.

Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã nhiệt tình động viên cho tôi thêm động lực hoàn thành tốt quá trình học tập và nghiên cứu khoa học.

Thái Nguyên, tháng 5 năm 2019

Tác giả

Diệp Thị Hương Giang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Dịch tễ học của ung thư dạ dày	3
1.2. Retionic acid.....	4
1.2.1. Khái niệm	4
1.2.2. Vai trò của Retinoic acid trong điều trị ung thư	6
1.2.3. Thụ thể của Retionic acid trong ung thư dạ dày	9
1.3. Sự lão hóa tế bào	10
1.3.1. Khái niệm	10
1.3.2. Các gen trong con đường tín hiệu của sự lão hóa tế bào	11
1.4. Con đường tín hiệu NOTCH.....	12
1.4.1. Vai trò của con đường tín hiệu NOTCH trong ung thư.....	12
1.4.2. Vai trò của con đường tín hiệu NOTCH trong ung thư dạ dày	13
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.1. Vật liệu nghiên cứu	15
2.2 Địa điểm và thời gian	15
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	16

2.3.1. Nuôi cấy tăng sinh tế bào 2D	16
2.3.2. Nuôi cấy tế bào 3D và xử lý tế bào với ATRA.....	16
2.3.3. Tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA	17
2.3.4. Phân tích sự biểu hiện gen bằng Realtime PCR	17
2.3.5. Phân tích sự biểu hiện của protein P21 bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang	18
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	20
3.1. Nuôi cấy tăng sinh tế bào và nuôi cấy tạo các tumorsphere 3D	20
3.1.1. Nuôi cấy tăng sinh tế bào trong điều kiện 2D	20
3.1.2. Nuôi cấy tạo các tumorsphere 3D và xử lý tumorsphere với ATRA....	20
3.2. Kết quả tách chiết RNA tổng số.....	22
3.3. ATRA làm tăng cường sự phiên mã các gen p53, p21 và GADD45.....	23
3.4. ATRA cảm ứng sự biểu hiện tăng của protein p21	25
3.5. ATRA điều hòa sự biểu hiện các gen thuộc con đường tín hiệu phân tử Notch.....	26
3.5.1. ATRA ức chế sự biểu hiện của gen Notch.....	26
3.5.2. ATRA điều hòa giảm sự biểu hiện các gen mã hóa cho các Ligand của Notch.....	27
KẾT LUẬN	31
KIẾN NGHỊ	31
TÀI LIỆU THAM KHẢO	32

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

AMP	: Adenosine monophosphate
ATRA	: Axit retinoic all-trans
CDK	: Cyclin-dependent kinases
cDNA	: complementary DNA
CK	: Cyclin kinases
COX-2	: Cyclooxygenase-2
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	: Dimethyl sulfoxit
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EGF	: Epidermal Growth Factor
EMT	: Biểu mô trung mô
FGF	: Fibroblast growth factor
GCSPC	: Tế bào gốc ung thư dạ dày
JNK	: Jun N-terminal kinase
mRNA	: RNA thông tin
NICD	: Vùng Notch nội bào (intracellular domain)
NRR	: Vùng điều hòa âm tính
NST	: Nhiễm sắc thể
<i>PBS</i>	: Phosphate buffer saline
RA	: Retinoic acid
RAR / RXR	: Bộ dị vòng
RARE	: Yếu tố phản ứng RA
RARs	: Thụ thể acid retinoic
Rb	: Retinoblastoma
RNA	: Axit ribonucleic
RXR / RXR	: Bộ đồng phân
RXR	: Thụ thể X retinoid

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Mã số các cặp mồi sử dụng cho Realtime-PCR	18
Bảng 2.2. Mã số các cặp mồi cho phản ứng Realtime PCR	18
Bảng 3.1. Nồng độ RNA tổng số thu được từ quá trình tinh sạch	23

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1.	Cấu trúc thể hệ thứ nhất của retioids	5
Hình 1.2.	Cấu trúc thể hệ thứ hai của retioids	5
Hình 1.3.	Cấu trúc thể hệ thứ ba của retioids	5
Hình 1.4.	Cơ chế phân chia của tế bào ung thư	7
Hình 1.5.	Con đường tín hiệu Notch.....	13
Hình 3.1.	Hình ảnh nuôi cấy tăng sinh tế bào trong 3 ngày nuôi cấy.....	20
Hình 3.2.	Nuôi cấy tạo tumorsphere (A) trong 5 ngày và xử lý các tumorsphere trong 48h với ATRA (B), mũi tên màu đen chỉ các tế bào chết.....	21
Hình 3.3.	Phổ hấp thụ của RNA tổng số thu được từ quá trình tách chiết.....	22
Hình 3.4.	Mức độ biểu hiện gene P21, P53 và GADD45A giữa mẫu đối chứng và mẫu xử lý với ATRA.	23
Hình 3.5 .	Ảnh hưởng của ATRA lên sự biểu hiện của protein p21	25
Hình 3.6.	Ảnh hưởng của ATRA lên sự hiệu hiện của các gen	26
Hình 3.7.	Ảnh hưởng của ATRA lên sự hiệu hiện các Ligand của Notch	27

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Ung thư dạ dày là bệnh lý ác tính của dạ dày. Ung thư dạ dày là loại ung thư phổ biến thứ tư và là loại ung thư nguy hiểm thứ hai trên toàn thế giới, với một triệu bệnh nhân mới được chẩn đoán và 600000 ca tử vong mỗi năm [38]. Khoảng 70% các trường hợp ung thư dạ dày xảy ra ở Đông Á, Trung và Đông Âu, Nam Phi và Trung và Nam Mỹ [43].

Việt Nam là một trong 20 quốc gia có tỷ lệ mắc ung thư dạ dày cao nhất thế giới, với tỷ lệ mắc trung bình là 16 người trên 100 nghìn dân. Tỷ lệ sống sót trên 5 năm của các bệnh nhân ung thư dạ dày cũng thấp dưới 20% (theo Globocan, 2014).

Bằng chứng ủng hộ sự tồn tại của tế bào gốc ung thư trong ung thư dạ dày đã xuất hiện trong những năm gần đây, các tế bào gốc ung thư thường được biến đổi từ các tế bào gốc đặc hiệu của mô [73]. Tế bào gốc ung thư, lần đầu tiên được xác định trong bệnh bạch cầu tủy cấp tính và sau đó là trong các khối u rắn, đóng vai trò quan trọng trong việc bắt đầu ung thư. Tế bào gốc ung thư thường là các tế bào gốc đặc hiệu mô hoặc các tế bào tiền thân khuếch đại chuyển hóa khác biệt. Trong nghiên cứu, điều trị và phát hiện tế bào gốc ung thư dạ dày, có thể sử dụng các chỉ thị ALDH, CD33 và CD44 [57].

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng Retinoic acid (RA) có khả năng ức chế sự hình thành và sinh trưởng của khối u trong nhiều loại ung thư khác nhau như ung thư vú, ung thư tụy và cả ung thư dạ dày, RA có thể tác dụng bằng cách tham gia vào quá trình này thông qua hoạt hóa con đường apoptosis, ức chế phân chia tế bào, cảm ứng sự lão hoá (senescence) và sự biệt hoá (differentiation) tế bào. Đặc biệt đối với ung thư dạ dày, RA có khả năng gây biệt hoá tế bào gốc ung thư dạ dày [40]. Nghiên cứu gần đây đã chỉ ra được all trans retinoic có khả năng ức chế tế bào gốc ung thư dạ dày, gây biệt hoá tế bào này. Tuy nhiên vẫn còn thiếu các phân tích về ảnh hưởng của All trans retinoic acid lên các con đường tín hiệu phân tử.