

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

MAI VĂN LINH

**NGHIÊN CỨU TÁC ĐỘNG CỦA ALL TRANS RETINOIC
ACID LÊN SỰ BIỂU HIỆN CÁC GEN TRONG CON ĐƯỜNG
TÍN HIỆU EGF VÀ JAK/STAT CỦA TẾ BÀO GỐC UNG THƯ
DẠ DÀY**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

THÁI NGUYÊN – 2019.

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

MAI VĂN LINH

**NGHIÊN CỨU TÁC ĐỘNG CỦA ALL TRANS RETINOIC
ACID LÊN SỰ BIỂU HIỆN CÁC GEN TRONG CON ĐƯỜNG
TÍN HIỆU EGF VÀ JAK/STAT CỦA TẾ BÀO GỐC UNG THƯ
DẠ DÀY**

**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

Mai Văn Linh

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và thực hiện đề tài nghiên cứu tại Khoa Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên, em đã nhận được sự giúp đỡ, giảng dạy và truyền đạt kiến thức của các thầy cô trong khoa, các phòng ban trong nhà trường.

Đầu tiên, em xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất đến Thầy giáo - TS. Nguyễn Phú Hùng, Thầy đã định hướng khoa học, tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất trong suốt quá trình em học tập, tiến hành nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.

Em xin cảm ơn các thầy cô và cán bộ Khoa Công nghệ Sinh học và bộ phận Đào tạo sau đại học - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã tận tình dạy dỗ, chỉ bảo và giúp đỡ trong suốt quá trình em học tập tại trường.

Đề tài luận văn đã nhận được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ, mã số B2017 - TNA - 48.

Cuối cùng, em xin chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè và các anh chị lớp Cao học K11 đã luôn cổ vũ, động viên em hoàn thành tốt quá trình học tập và nghiên cứu khoa học.

Thái Nguyên, tháng 10 năm 2019

Tác giả

Mai Văn Linh

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.....	vi
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Tổng quan về ung thư và ung thư dạ dày.....	3
1.1.1. Khái quát về ung thư và tế bào gốc ung thư	3
1.1.2. Tổng quan về ung thư dạ dày.....	7
1.2. All-trans retinoic acid (ATRA).....	13
1.2.1. Retinoids và all-trans retinoic acid (ATRA)	13
1.2.2. Thụ thể của ATRA.....	16
1.2.3. Retinoids trong điều trị.....	17
1.3. Con đường tín hiệu EGF	19
1.4. Con đường tín hiệu JAK/STAT	22
1.5. Khái quát về apoptosis	25
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	26
2.1. Vật liệu nghiên cứu	26
2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	26
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.3.1. Phương pháp nuôi cấy tăng sinh tế bào 2D	27
2.3.2. Phương pháp nuôi cấy tế bào 3D và xử lý tế bào với ATRA.....	27
2.3.3. Phương pháp tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA	28

2.3.4. Phân tích sự biểu hiện của các gen chủ chốt của con đường tín hiệu EGF bằng Realtime PCR	28
2.3.5. Phân tích sự biểu hiện của các gen chủ chốt của con đường tín hiệu JAK/STAT bằng Realtime PCR	29
2.3.6. Phân tích sự biểu hiện của các gen chủ chốt của con đường apoptosis bằng Realtime PCR	30
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	31
3.1. Kết quả nuôi cấy tăng sinh tế bào và nuôi cấy tạo các tumorsphere	31
3.1.1. Kết quả nuôi cấy tăng sinh tế bào trong điều kiện 2D	31
3.1.2. Nuôi cấy tạo các tumorsphere 3D và xử lí tumorsphere với ATRA	31
3.2. Kết quả tách chiết RNA tổng số.....	33
3.3. Tác động của ATRA lên sự biểu hiện các gen thuộc con đường tín hiệu EGF	34
3.3.1 ATRA ức chế sự biểu hiện các gen GAB2, NUP62, RPS6KA5 và EGFR	34
3.3.2. Tác động của ATRA lên sự biểu hiện của các gen CBL, EPS8, BCAR1, NCK2 và SHC1	38
3.4. Ảnh hưởng của ATRA lên sự biểu hiện các gen thuộc con đường tín hiệu JAK/STAT	40
3.4.1. ATRA ức chế biểu hiện của các gen STAT1 và STAT3	40
3.4.2. Ảnh hưởng của ATRA đến sự điều hòa biểu hiện của các gen GAB1, GAB2, SRC và PPP2CA.....	41
3.5. Ảnh hưởng ATRA lên sự biểu hiện của các gen củ quá trình apoptosis. 43	
3.5.1. ATRA tác động lên sự biểu hiện của các gen ức chế apoptosis	44
3.5.2. ATRA ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các gen thúc đẩy apoptosis..	46
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	48
1. Kết luận	48
2. Kiến nghị	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO	49

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Từ viết đầy đủ
AML	Acute myeloid leukemia
ATRA	All trans retinoic acid
BMDCs	Bone marrow derived Dendritic cells
CSC	Cancer stem cells
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ErbB	Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog
GSCs	Gastric stem cells
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
JAK	Janus kinases
RA	Retinoic acid
RAR	Retinoic acid receptor
RXR	Retinoid X receptor
STAT	Signal transducer and activator of transcription (proteins)
TNM	Tumor – Node - Metastasis

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
Bảng 2.1	Mã số cặp môi của các gen trong con đường tín hiệu EGF	29
Bảng 2.2	Mã số cặp môi của các gen trong con đường tín hiệu JAK/STAT	29
Bảng 2.3	Mã số cặp môi của các gen trong con đường apoptosis	30

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
Hình 1.1	Ước tính số ca mắc mới ung thư năm 2018	6
Hình 1.2	Ước tính số lượng tử vong do ung thư năm 2018	6
Hình 1.3	Phân loại ung thư biểu mô dạ dày theo Lauren	9
Hình 1.4	Cấu tạo một tuyến dạ dày	11
Hình 1.5	Mô hình nhuộm Lgr5 trong mô ung thư dạ dày	12
Hình 1.6	Các thể hệ của retinoids	15
Hình 1.7	Sự chuyển hóa của Vitamin A trong cơ thể	15
Hình 1.8	Quá trình hoạt động của tín hiệu RA	16
Hình 1.9	Con đường tín hiệu của họ thụ thể EGFR	21
Hình 1.10	Con đường tín hiệu JAK/STAT	23
Hình 1.11	Một con đường JAK/STAT trong ung thư	24
Hình 3.1	Hình ảnh nuôi cấy tăng sinh tế bào sau 3 ngày nuôi cấy	31
Hình 3.2	Nuôi cấy tạo tumorsphere và xử lý với ATRA	32
Hình 3.3	Kết quả xác định hàm lượng RNA tổng số	34
Hình 3.4A	Mức độ biểu hiện các gen GAB2, NUP62, RPS6KA5, EGFR	35
Hình 3.4B	Mức độ biểu hiện các gen EPS8, BCAR1, CBL, NCK2, SHC1	38
Hình 3.5A	Mức độ biểu hiện các gen STAT3, STAT1	40
Hình 3.5B	Mức độ biểu hiện các gen GAB1, SRC, GAB2, PPP2CA	42
Hình 3.6A	Mức độ biểu hiện các gen ức chế apoptosis	44
Hình 3.6B	Mức độ biểu hiện các gen thúc đẩy apoptosis	46

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Ung thư dạ dày là một trong những dạng ung thư phổ biến nhất. Theo ước tính của Tổ chức Y tế Thế giới (<http://gco.iarc.fr/>), trong năm 2018 có 1.033.701 bệnh nhân ung thư dạ dày mới (chiếm 5,7%, trong tổng số các ca ung thư mới), 782.685 ca tử vong do ung thư dạ dày (chiếm 8,2%, trong tổng số các ca tử vong do ung thư). Ung thư dạ dày được thống kê là dạng ung thư phổ biến thứ 5 và là nguyên nhân gây tử vong thứ 3 trong nhóm ung thư. Có 769.728 (74,5%) các ca ung thư dạ dày mới được phát hiện ở các nước châu Á. Tỷ lệ ung thư dạ dày cao nhất được thống kê là Hàn Quốc, Mông Cổ, Nhật Bản và Trung Quốc. Việt Nam xếp thứ 10 trong thống kê các nước có tỷ lệ ung thư dạ dày nhiều nhất thế giới với tỷ lệ 15,9 ca mắc ung thư dạ dày trong 100.000 dân số.

Các tế bào gốc ung thư dạ dày là nguyên nhân gây ra các khối u dạ dày. Các tế bào gốc ung thư dạ dày, còn được gọi là các “tế bào khởi nguồn” của ung thư dạ dày, có nguồn gốc chủ yếu từ các tế bào gốc dạ dày hoặc các tế bào gốc định hướng dạ dày [4], [27]. Các tế bào gốc ung thư dạ dày cũng có thể có nguồn gốc từ các tế bào sinh dưỡng bị biến đổi [6]. Giống với các tế bào gốc thông thường, các tế bào gốc ung thư dạ dày cũng có chứa các marker sinh học đặc trưng như CD44, ALDH,... [4]. Đây là những chỉ thị phân tử quan trọng để xác định tế bào gốc ung thư dạ dày trong nghiên cứu và điều trị.

All trans retinoic acid (ATRA) là một chất chuyển hóa từ vitamin A, thuộc nhóm retinoid, có tác dụng điều hoà sự tăng trưởng, biệt hóa và quá trình apoptosis của tế bào. ATRA được biết đến như một chất có khả năng ức chế tế bào gốc của nhiều dạng ung thư khác nhau [53]. Hiện nay, ATRA đã được sử dụng trong điều trị bệnh Lơ-xê-mi cấp dòng tủy (AML), cũng như sử dụng trong nhiều thử nghiệm lâm sàng để điều trị ung thư. Tuy nhiên, ảnh hưởng

của ATRA lên tế bào gốc ung thư ở cấp độ phân tử vẫn chưa được hiểu rõ. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài: "***Nghiên cứu tác động của all trans retinoic acid lên sự biểu hiện các gen trong con đường tín hiệu EGF và JAK/STAT của tế bào gốc ung thư dạ dày***".

2. Mục tiêu nghiên cứu

Đánh giá tác động của ATRA lên sự phiên mã của các gen chính trong con đường tín hiệu phân tử EGF và JAK/STAT của tế bào gốc ung thư dạ dày, cũng như ảnh hưởng của ATRA lên sự biểu hiện của các gen apoptosis.

3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nuôi cấy tế bào trong điều kiện 3D để hình thành nên các tumorsphere từ các tế bào gốc ung thư dạ dày.

Nội dung 2: Phân tích tác động của ATRA lên sự hình thành và tăng trưởng của các tumorsphere.

Nội dung 3: Phân tích sự biểu hiện của các gen trong con đường tín hiệu EGF bằng phương pháp Realtime PCR đối với các tế bào được xử lý hoặc không xử lý với ATRA.

Nội dung 4: Phân tích ảnh hưởng của ATRA lên sự biểu hiện của các gen của con đường tín hiệu JAK/STAT bằng phương pháp Realtime PCR.

Nội dung 5: Phân tích sự tác động của ATRA lên sự biểu hiện các gen apoptosis bằng phương pháp Realtime PCR.