

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

NGUYỄN THỊ HẢI HỒNG

**NGHIÊN CỨU TÁC ĐỘNG CỦA DỊCH CHIẾT LÁ KHÔ
(*ARDISIA GIGANTIFOLIA* STAPF.) LÊN SỰ BIỂU HIỆN CỦA
CÁC GEN KIỂM SOÁT CHU KỲ TẾ BÀO 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. Lê Thị Thanh Hương

THÁI NGUYÊN - 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của TS. Lê Thị Thanh Hương. 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

Nguyễn Thị Hải Hồng

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và thực hiện đề tài luận văn tại Khoa Công nghệ Sinh học, trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên. Em đã nhận được sự giúp đỡ nhiệt tình của các Thầy, Cô giáo, các anh chị kỹ thuật viên và cán bộ trong khoa và nhà trường.

Đầu tiên em xin tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Cô giáo - TS. Lê Thị Thanh Hương đã định hướng khoa học, tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất trong suốt quá trình em tiến hành nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.

Em 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 em niềm đam mê nghiên cứu khoa học. Xin chân thành cảm ơn bộ phận sau đại học của nhà trường đã tạo điều kiện thuận lợi trong quá trình em học tại trường.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (Nafosted) trong mã số đề tài 108.05-2017.331.

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

Thái Nguyên, tháng 11 năm 2019

Tác giả

Nguyễn Thị Hải Hồng

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Ung thư dạ dày và tế bào gốc ung thư dạ dày.....	3
1.1.1. Ung thư dạ dày	3
1.1.2. Tế bào gốc và tế bào gốc ung thư dạ dày.....	9
1.2. Chu kỳ tế bào và ung thư	12
1.2.1. Khái quát chung về chu kỳ tế bào.....	12
1.2.2. Rối loạn chu kỳ tế bào và ung thư	14
1.2.3. Các gen kiểm soát chu kỳ tế bào.....	16
1.3. Giới thiệu chung về cây Lá khôi	19
1.3.1. Phân loại và đặc điểm	19
1.3.2. Thành phần hóa học của cây Lá khôi.....	20
1.3.3. Các nghiên cứu về tác dụng của cây Lá khôi trong điều trị ung thư	22
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25
2.1. Vật liệu nghiên cứu	25
2.2. Hóa chất và thiết bị nghiên cứu.....	25
2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	25
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.4.1. Phương pháp thu thập và xác định tên khoa học của cây Lá khôi.....	25
2.4.2. Phương pháp thu dịch chiết cây Lá khôi.....	26

2.4.3. Phương pháp nuôi cấy tế bào 2D	26
2.4.4. Phương pháp nuôi cấy tế bào 3D	26
2.4.5. Phương pháp phân tích chu kỳ tế bào bằng Flow cytometry	27
2.4.6. Phương pháp phân tích miễn dịch huỳnh quang	27
2.4.7. Phương pháp tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA	28
2.4.8. Phương pháp phân tích biểu hiện gen bằng Realtime PCR	28
2.4.9. Phương pháp phân tích thống kê	29
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	30
3.1. Kết quả thu thập và xác định tên khoa học và thu dịch chiết ethanol cây Lá khô.....	30
3.2. Nuôi cấy tăng sinh tế bào trong điều kiện nuôi cấy 2D	30
3.3. Nuôi cấy tumorsphere của các tế bào ung thư dạ dày trong điều kiện nuôi cấy 3D	31
3.4. Ảnh hưởng của dịch chiết Lá khô lên số lượng và kích thước các tumorsphere	33
3.5. Ảnh hưởng của dịch chiết Lá khô lên chu kỳ tế bào	32
3.6. Tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA	34
3.7. Ảnh hưởng của dịch chiết Lá khô lên các gen của tế bào gốc ung thư ..	35
3.8. Ảnh hưởng của dịch chiết Lá khô lên các gen kiểm soát chu kỳ tế bào...	38
3.9. Ảnh hưởng của dịch chiết Lá khô lên sự biểu hiện của protein P21	41
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	43
1. KẾT LUẬN	43
2. KIẾN NGHỊ	43
TÀI LIỆU THAM KHẢO	44

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

ALDH	: Aldehyde dehydrogenase
CDK	: Cyclin-dependent kinases
CCNE1	: Cyclin E1
CT	: Cryptotanshinone
cDNA	: Complementary DNA
DNA	: Deoxyribonucleic acid
FACS	: Fluorescence-activated cell sorting
GC	: Ung thư biểu mô dạ dày
mRNA	: RNA thông tin
NST	: Nhiễm sắc thể
PCNA	: Proliferating cell nuclear antigen
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribonucleic acid
SAGA	: Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase
SSE	: Samsøeum
TBGUT	: Tế bào gốc ung thư
TBGUTDD	: Tế bào gốc ung thư dạ dày
USP22	: Ubiquitin specific peptidase 22

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Các pha trong chu kỳ tế bào	13
Bảng 2.1. Mã số cặp môi của các gen.....	28
Bảng 3.1. Nồng độ RNA từ mẫu đối chứng và mẫu xử lý.....	35

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Số ca ung thư mắc mới năm 2018 ở nam của Việt Nam	4
Hình 1.2. Cơ chế phân chia của tế bào ung thư	16
Hình 3.1. Mẫu cây Lá khô	30
Hình 3.2. Nuôi cấy tăng sinh tế bào MKN45 trong điều kiện nuôi cấy 2D	30
Hình 3.3. Nuôi cấy tumorsphere hình thành từ các tế bào gốc.....	31
Hình 3.4. Dịch chiết Lá khô tác động lên khả năng hình thành tumorsphere ...	32
Hình 3.5. Dịch chiết Lá khô tác động lên chu kỳ tế bào	33
Hình 3.6. Phổ hấp thụ của RNA tổng số tách chiết từ các tumorsphere.....	35
Hình 3.7. Dịch chiết Lá khô tác động lên sự biểu hiện các gen	36
Hình 3.8. Dịch chiết Lá khô tác động lên các gen	39
Hình 3.9. Dịch chiết Lá khô tác động lên sự biểu hiện của protein	42

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Việt Nam là một nước có sự đa dạng về các loài thực vật, trong đó có các loài thực vật làm thuốc. Họ Đơn nem (Myrsinaceae) gồm 50 chi và khoảng 1.400 loài được phân bố rộng rãi trên khắp thế giới. Trong đó, chi com ngội (*Ardisia*) có khoảng 400 – 500 loài trên thế giới và ở Việt Nam có khoảng 101 loài [2]. Các loài trong chi này có nhiều tác dụng trong điều trị bệnh, bảo vệ sức khỏe cho con người, điển hình là cây Lá khôì (*Ardisia gigantifolia* Stapf).

Ung thư dạ dày là một trong những dạng ung thư phổ biến nhất, được thống kê là dạng ung thư phổ biến thứ 5 và là nguyên nhân gây tử vong thứ 3 trong nhóm các bệnh ung thư. Các tế bào gốc ung thư dạ dày là nguyên nhân gây ra các khối u dạ dày. Tế bào gốc ung thư dạ dày còn gọi là "tế bào nguồn" của ung thư dạ dày, có nguồn gốc chủ yếu từ các tế bào gốc hoặc các tế bào gốc định hướng dạ dày. Trong những năm gần đây, rất nhiều các nghiên cứu cho thấy ung thư dạ dày có thể bắt nguồn từ các tế bào gốc bình thường hoặc các tế bào trung mô có nguồn gốc từ tủy xương và các khối u dạ dày có chứa các tế bào gốc ung thư [71]. Các khối u có thể bắt nguồn từ một tiểu quần thể tế bào gốc ung thư có khả năng duy trì sự phát triển khối u lâu dài, tái phát khối u, kháng apoptosis và hóa trị.

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, có nhiều hợp chất chiết xuất từ dịch chiết của các bộ phận cây Lá khôì ảnh hưởng đến sự tăng sinh biểu mô tuyến vú, gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư như: ung thư bàng quang, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư cổ tử cung,... [14], [57]. Đặc biệt đối với ung thư dạ dày, dịch chiết Lá khôì có khả năng biệt hoá tế bào gốc ung thư dạ dày và ít độc cho các tế bào và khả năng ức chế cao sự phân chia nhưng ít gây ra apoptosis [7]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về ảnh hưởng

của Lá khô lên sự biểu hiện của các gen kiểm soát chu kỳ tế bào của các tế bào gốc ung thư dạ dày còn hạn chế. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài *“Nghiên cứu tác động của dịch chiết Lá khô (Ardisia gigantifolia Stapf.) lên sự biểu hiện của các gen kiểm soát chu kỳ tế bào của tế bào gốc ung thư dạ dày”*.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Đánh giá tác động của dịch chiết Lá khô lên mức độ biểu hiện của các gen điều khiển chu kỳ tế bào của tế bào gốc ung thư dạ dày.

3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Thu thập mẫu Lá khô và tách chiết dịch chiết Lá khô.

Nội dung 2: Nuôi cấy các spheroid hình thành từ tế bào gốc ung thư dạ dày.

Nội dung 3: Phân tích ảnh hưởng của dịch chiết Lá khô lên sự biểu hiện của các gen kiểm soát chu kỳ tế bào bằng phương pháp Realtime PCR.