

Ảnh hưởng của all-trans retinoic acid lên sự biểu hiện các gen của con đường apoptosis của tế bào ung thư dạ dày

Ngô Thu Hà^{1,*}, Lưu Thị Bình², Lê Thị Thanh Hương¹,
Mai Văn Linh¹, Nguyễn Đắc Trung², Nguyễn Phú Hùng^{1,3}

¹Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

²Trường Đại học Y - Dược, Đại học Thái Nguyên

³Phòng thí nghiệm Inserm U1235, Nantes, Cộng hòa Pháp

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 18 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Apoptosis là quá trình diễn ra ở nhiều cơ thể sinh vật đa bào nhằm kiểm soát số lượng tế bào. Apoptosis được kiểm soát chặt chẽ bởi nhiều nhân tố và sự rối loạn điều hòa apoptosis thúc đẩy hình thành nên các khối u. All-trans retinoic acid (ATRA) được coi là một chất tiềm năng trong điều trị ung thư dạng rắn trong đó có ung thư dạ dày vì khả năng hoạt hóa con đường apoptosis của chúng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích ảnh hưởng của ATRA lên sự biểu hiện của một số gen mã hóa cho các protein tham gia vào quá trình ức chế hoặc thúc đẩy apoptosis bằng kỹ thuật Real-time RT-PCR (RT-qPCR) đồng thời chứng minh ATRA làm tăng cường sự biểu hiện ở mức độ protein đối với p53 bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang. Kết quả cho thấy ATRA không chỉ làm giảm mức độ biểu hiện RNA ở các gen ức chế apoptosis gồm *AKT1*, *BAD*, *NUP62*, *BCL2*, *PIK3R2* và *MAPK1* mà đồng thời làm tăng mức độ biểu hiện RNA ở các gen *CASP9*, *FOXO3*, *IL2*, *TP53* có vai trò thúc đẩy quá trình này.

Từ khóa: ATRA, apoptosis, ung thư dạ dày, RT-qPCR.

1. Mở đầu

Apoptosis là một sự kiện quan trọng xảy ra ở nhiều quá trình sinh học làm giảm số lượng tế bào giúp cân bằng với sự phân chia tế bào. Sự chết tế bào theo chu trình - apoptosis xuất hiện ở nhiều dạng cơ thể đa bào nhưng đều có sự tương đồng về các gen tham gia quá trình này [1]. Ở động vật có vú, đây là một quá trình phức tạp được điều hòa và kiểm soát nghiêm ngặt bởi một chuỗi các gen gây ức chế apoptosis như *AKT1*, *BCL2*,... và các gen thúc đẩy apoptosis như *TP53*, *CASP9*,... Điều quan

trọng là sự rối loạn quá trình điều hòa con đường apoptosis không chỉ thúc đẩy hình thành khối u mà còn làm các tế bào ung thư có khả năng chống lại các liệu pháp kháng ung thư [2]. Các hướng nghiên cứu ung thư hiện nay tập trung chủ yếu vào phát triển các loại thuốc có khả năng can thiệp vào apoptosis ở các tế bào ung thư với mục tiêu chính là cảm ứng chết tế bào theo chu trình này.

ATRA là một dẫn xuất của vitamin A có khả năng gắn kết với thụ thể retinoic acid (RARs) của nó trong tế bào. ATRA hoạt hóa các RARs dẫn tới điều hòa sự biểu hiện của hàng loạt gen đích trong tế bào liên quan đến sự sinh trưởng và biệt hóa của nhiều loại tế bào khác nhau ở nhiều giai đoạn phát triển khác

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-1692022092.

Email: thuha.ngo2510@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4540>

nhau trong đó có apoptosis [3, 4]. Các nghiên cứu về ung thư máu và các khối u rắn đã chỉ ra rằng retinoic acid nói chung và ATRA nói riêng có khả năng ức chế sự hình thành và sinh trưởng của khối u thông qua hoạt hóa apoptosis, mở ra nhiều hứa hẹn trong việc điều trị ung thư ngày nay. Nghiên cứu gần đây nhất của chúng tôi cũng đã chỉ ra rằng ATRA cảm ứng quá trình apoptosis trong ung thư dạ dày [5], tuy nhiên ảnh hưởng của ATRA lên các gen trong con đường tín hiệu của apoptosis vẫn chưa được chỉ ra.

Ung thư dạ dày đứng thứ tư trên toàn thế giới về tỉ lệ tử vong với 754.000 trường hợp năm 2015 sau ung thư phổi, ung thư gan và ung thư đại trực tràng (WHO, 2015). Ung thư dạ dày thường được phát hiện muộn khi bệnh nhân đã có các triệu chứng lâm sàng rõ ràng và ung thư đã ở giai đoạn di căn. Năm 1991, Fujii và Yokomori đã lần đầu tiên sử dụng vitamin A phối hợp với các liệu pháp hóa học trong điều trị ung thư dạ dày nhằm cải thiện tỉ lệ sống sót và làm giảm tỉ lệ tái phát sau điều trị [6]. Trong điều kiện nuôi cấy một lớp ở các dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45 và MKN28, ATRA đã được chỉ ra là có vai trò trong việc hoạt hóa apoptosis [7]. Việc sử dụng ATRA nhằm ức chế sự sinh trưởng của các tế bào ung thư dạ dày được coi là một hướng tiếp cận triển vọng trong tương lai. Trong công bố gần đây nhất trên tạp chí Oncogene, chúng tôi đã chỉ ra ATRA là một chất tiềm năng trong việc điều trị nhắm đích tế bào gốc ung thư, nghiên cứu này đã chỉ ra ATRA gây biệt hóa tế bào ung thư và cảm ứng apoptosis về mặt kiểu hình [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích sự ảnh hưởng của ATRA lên sự biểu hiện của các gen tham gia vào con đường tín hiệu apoptosis bao gồm các gen ức chế và các gen thúc đẩy quá trình này.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nuôi cấy tế bào và xử lý ATRA

Các tumorsphere được hình thành trong điều kiện nuôi cấy 3D như mô tả trong công bố

trước đây [5] được xử lý với ATRA 5 μ M trong 48 giờ. ATRA được cung cấp bởi Sigma Aldrich với mã số sản phẩm R2625. Tế bào đối chứng được xử lý với DMSO. Thu nhận tumorsphere và phân tách thành các tế bào đơn bằng enzyme trypsin trước khi tiến hành thí nghiệm tách chiết RNA tổng số.

2.2. Tách chiết RNA và RT-qPCR

RNA tổng số được tách chiết bằng phương pháp Trizol theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen). Nồng độ và chất lượng RNA được đánh giá bằng máy đo quang phổ NanoDrop ở bước sóng hấp thụ 260 nm.

RNA được sử dụng để thực hiện phản ứng tạo cDNA bằng Quantitect Reverse Transcriptase (RT) kit (cung cấp bởi Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phân tích real-time PCR sử dụng 20 ng cDNA cho mỗi phản ứng PCR với tổng thể tích là 20 μ l với chất phát huỳnh quang SYBR Green qPCR do Invitrogen cung cấp. Các cặp mồi đặc hiệu cho các gen sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Qiagen với các mã số được trình bày trong Bảng 1. Dữ liệu được thống kê và phân tích bằng phần mềm SPSS16.0F, sử dụng kiểm định Mann-Whitney.

Bảng 1. Tên gen và mã số cặp mồi tương ứng (Qiagen)

	Gen	Mã số cặp mồi
	<i>AKT1</i>	PPH00088B-200
	<i>BAD</i>	PPH00075C
Gen ức chế apoptosis	<i>NUP62</i>	PPH23942A
	<i>BCL2</i>	PPH00079B
	<i>PIK3R2</i>	PPH00709A
	<i>MAPK1</i>	PPH00715B
	<i>CASP9</i>	PPH00353B
Gen thúc đẩy apoptosis	<i>FOXO3</i>	PPH00807A
	<i>IL2</i>	PPH00172C
	<i>TP53</i>	PPH00213F

2.3. Phân tích miễn dịch huỳnh quang

Các tumorsphere sau 7 ngày nuôi cấy được thu nhận bằng ly tâm 1300 vòng trong 3 phút và rửa 2 lần với đệm PBS 1X. Nhuộm tế bào lần lượt với kháng thể 1 là kháng thể đơn dòng

chuột kháng protein p53 của người được cung cấp bởi Santa Cruz ở 37°C trong 45 phút và kháng thể 2 kháng IgG của chuột gắn chất phát quang Alexa Fluor 488 do Thermo Scientific cung cấp, nồng độ 1:2000 ở 37°C trong 20 phút. Rửa tế bào 2 lần với PBS 1X bằng phương pháp li tâm, ở lần rửa thứ 2 tế bào được rửa trong đệm PBS chứa chất nhuộm nhân tế bào DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole do Sigma cung cấp) nồng độ 10µg/ml. Các tế bào sau khi được ủ với kháng thể sẽ được đặt trên lamén và được quan sát, chụp ảnh dưới kính hiển vi huỳnh quang NIKON ở độ phóng đại 200 lần và 400 lần với phần mềm chuyên dụng.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. ATRA làm giảm sự biểu hiện của các gen ức chế apoptosis

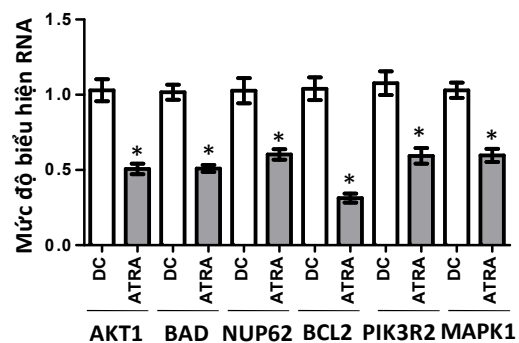
Để đánh giá mức độ biểu hiện của một số gen ức chế apoptosis, phản ứng RT-qPCR được thực hiện với các cặp mồi đặc hiệu cho 6 gen được lựa chọn. Kết quả so sánh giữa các mẫu xử lý ATRA với mẫu đối chứng được xử lý với DMSO được chỉ ra trong Hình 2.

Kết quả cho thấy ATRA làm giảm sự biểu hiện mRNA của các gen nghiên cứu bao gồm *AKT1*, *BAD*, *NUP62*, *BCL2*, *PIK3R2* và *MAPK1* một cách rõ rệt khi so sánh với mẫu đối chứng.

Các tế bào ung thư tồn tại và sinh trưởng mạnh so với các tế bào thông thường vì chúng có khả năng kháng lại apoptosis thông qua sự hoạt hóa các oncogene. *BCL2* là một trong số đó, chúng ảnh hưởng tới con đường p53, *BCL2* mã hóa cho protein Bcl-2, một chất ức chế apoptosis. Mặc dù Bcl-2 và Bad cùng thuộc họ protein Bcl-2 nhưng Bad (được mã hóa bởi gen *BAD*) lại được coi là một yếu tố thúc đẩy apoptosis hay protein pro-apoptotic, nó tham gia vào con đường PI3K/Akt [8]. Các nghiên cứu gần đây nhất cũng cho thấy ATRA đã cảm ứng apoptosis ở tế bào ung thư thông qua việc điều hòa giảm mạnh marker kháng apoptosis Bcl-2 [9]. *PIK3R2* cũng là một yếu tố tham gia vào quá trình điều hòa con đường tín hiệu PI3K/Akt trong việc ức chế apoptosis. Mức độ

biểu hiện giảm của gen *PIK3R2* đã được chứng minh là làm tăng cường hoạt hóa con đường PI3K/Akt [10].

MAPK1 được biết đến là một enzyme thuộc họ MAP kinase có vai trò trong nhiều quá trình của tế bào đặc biệt là điều hòa phiên mã, việc bất hoạt MAPK dẫn đến tế bào trải qua apoptosis [11]. *NUP62* là một trong số các protein cấu thành nên phức hệ lỗ màng nhân (NPCs). NPCs tham gia điều hòa sự vận chuyển các protein và các loại RNA tham gia vào quá trình phiên mã và dịch mã. Chức năng của *NUP62* trong tế bào còn nhiều điều chưa rõ ràng nhưng vai trò của *NUP62* trong việc bảo vệ tế bào khỏi tác động của liệu pháp kháng ung thư đã được chỉ ra thông qua cơ chế kháng apoptosis [12]. Thêm vào đó, sai sót trong vận chuyển các chất qua nhân có thể dẫn tới apoptosis [13].

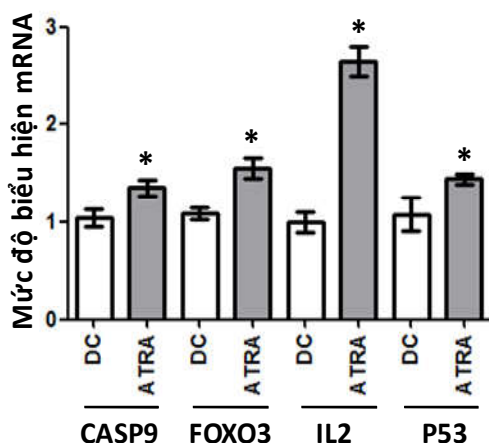


Hình 2. Mức độ biểu hiện mRNA của các gen ức chế apoptosis được xử lý với ATRA bao gồm *AKT1*, *BAD*, *NUP62*, *BCL2*, *PIK3R2*, *MAPK1* khi so sánh với mẫu đối chứng (DC) (n = 3, *p < 0.05).

3.2. ATRA làm tăng sự biểu hiện của các gen thúc đẩy apoptosis

Retinoic acid đã được chỉ ra là có khả năng hoạt hóa apoptosis ở các tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá ảnh hưởng của ATRA lên sự biểu hiện của một số gen thúc đẩy apoptosis bao gồm *CASP9*, *FOXO3*, *IL2*, *P53*. Kết quả được chỉ ra ở Hình 3 cho thấy ở các gen nghiên cứu đều có mức độ biểu hiện tăng cường mRNA so với mẫu đối chứng.

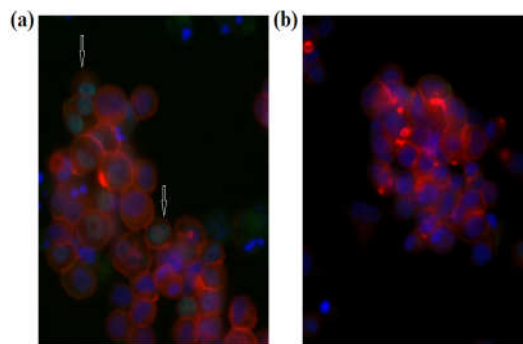
FOXO3, caspase-9 (được mã hóa bởi gen *CASP9*) và p53 (hay tp53) là các protein tham gia hoạt hóa apoptosis thông qua con đường nội tại ở ti thể nhờ các yếu tố tồn tại (survival factors) [14, 15]. FOXO3A được coi là phân tử đóng vai trò quyết định trong apoptosis ở các tế bào ung thư máu dòng tủy cấp tính khi các tế bào này được xử lý với ATRA [16]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng ATRA làm tăng cường sự biểu hiện của gen *p53* ở các tế bào thuộc ung thư tủy, ung thư máu và ung thư hắc sắc tố [17-19]. Ở ung thư da, các tế bào ung thư trong điều kiện nuôi cấy một lớp được xử lý với ATRA cho thấy chúng nhạy cảm với apoptosis khi tiếp xúc với tia UVB, báo cáo này cũng chỉ ra các tế bào này có sự biểu hiện tăng cường của cả p53 và các protein pro-apoptotic thuộc họ caspase trong đó có caspase-9 [20]. IL2 được biết đến như một protein đóng vai trò quan trọng trong điều hòa tăng sự biểu hiện của các phân tử tiền apoptotic trong tế bào T [21]. Tuy nhiên, vai trò của IL2 nội tại trong tế bào ung thư thuộc khối u rắn còn ít được nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, có thể sự tăng cường biểu hiện của IL2 cảm ứng bởi ATRA đã góp phần thúc đẩy quá trình apoptosis của tế bào.



Hình 3. Mức độ biểu hiện mRNA của các gen thúc đẩy apoptosis được xử lý với ATRA bao gồm *CASP9*, *FOXO3*, *IL2*, *P53* khi so sánh với mẫu đối chứng (DC) (n = 3, *p < 0.05).

Để khẳng định ATRA làm tăng cường sự biểu hiện của gen *P53*, chúng tôi tiến hành phân

tích mức độ biểu hiện protein p53 ở các tế bào được xử lý với ATRA và so sánh với các mẫu không được xử lý với ATRA bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang. Kết quả được chỉ ra ở Hình 4a cho thấy các tế bào biểu hiện p53 với nhân tế bào có màu lục chiếm khoảng 33% ± 3% khi so sánh với mẫu đối chứng. Điều này chứng minh ATRA làm tăng cường sự biểu hiện của p53 ở mức độ protein. Đây là một protein đóng vai trò quan trọng trong quá trình thúc đẩy apoptosis thông qua các cơ chế độc lập hoặc phụ thuộc phiên mã từ đó đảm bảo chương trình chết tế bào được diễn ra một cách hiệu quả.



Hình 4. Kết quả phân tích miễn dịch huỳnh quang đối với protein p53 trên các tumorsphere: (a) Mẫu tế bào được xử lý với ATRA; (b) Mẫu đối chứng.

4. Kết luận

Trong lĩnh vực nghiên cứu ung thư ngày nay, mục tiêu chính của các nhà khoa học là tìm ra các liệu pháp nhắm đích tiêu diệt một cách chọn lọc tới các tế bào thuộc khối u trong đó việc can thiệp vào các gen tham gia vào quá trình apoptosis là một hướng tiếp cận triển vọng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chỉ ra rằng ATRA là một chất tiềm năng trong việc phối hợp với các liệu pháp chữa trị ung thư bởi nó không chỉ có khả năng làm giảm sự biểu hiện của các gen ức chế apoptosis mà đồng thời làm tăng cường sự biểu hiện của các gen thúc đẩy apoptosis, từ đó có thể tiêu diệt các tế bào ung thư bằng cách cảm ứng con đường apoptosis ở tế bào được xử lý.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí bởi đề tài cấp Bộ Khoa học và Công nghệ mã số 55/B2017-TNA-55.

Tài liệu tham khảo

- [1] Vaux D., Strasser A., The molecular biology of apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(6) (1996) 2239.
- [2] Giménez-Bonafé P., Tortosa A., Pérez-Tomás R., Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells, *Current cancer drug targets* 9(3) (2009) 320.
- [3] Apfel C.F.M.L.M.F.P.W.M., Bauer F., Crettaz M., Forni L., Kamber M., Kaufmann F., ... & Klaus M., A retinoic acid receptor alpha antagonist selectively counteracts retinoic acid effects, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(15) (1992) 7129.
- [4] Balmer J.E., Blomhoff R., Gene expression regulation by retinoic acid, *J. Lipid Research*, 43 (2002) 1773.
- [5] Nguyen P.H., Giraud J., Staedel C., Chambonnier L., Dubus P., Chevret E., ... & Soubeyran I., All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth, *Oncogene* 35(43) (2016) 5619.
- [6] Fujii T., Yokomori T., A clinical study of vitamin A concerning auxiliary chemotherapies after operation of gastric cancer, *Gan to Kagaku Ryoho* 18 (1991) 265.
- [7] Fang J.Y., Xiao S.D., Effect of trans-retinoic acid and folic acid on apoptosis in human gastric cell line MKN-45 and MKN-28, *Gastroenterol* 33 (1998) 656.
- [8] Adachi M., & Imai K., The proapoptotic BH3-only protein BAD transduces cell death signals independently of its interaction with Bcl-2, *Cell death and differentiation* 9(11) (2002) 1240.
- [9] Kinoshita Y., Kalir T., Rahaman J., Dottino P. & Kohtz D.S., Alterations in nuclear pore architecture allow cancer cell entry into or exit from drug-resistant dormancy, *Am. J. Pathol*, 180 (2012) 375.
- [10] Zhang J., Zhang Z., Zhang D. Y., Zhu J., Zhang T., & Wang C., microRNA 126 inhibits the transition of endothelial progenitor cells to mesenchymal cells via the PI3K2-PI3K/Akt signalling pathway, *PLoS one* 8(12) (2013) e83294.
- [11] Hoshino R., Tanimura S., Watanabe K., Kataoka T., & Kohno M., Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated up-regulation of p27Kip1, *Journal of Biological Chemistry* 276(4) (2001) 2686.
- [12] Persaud S.D. et al., All trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating ERK1/2 phosphorylation, *Sci. Rep.* 6 (2016) 22396.
- [13] Fahrenkrog B., The nuclear pore complex, nuclear transport, and apoptosis This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled *The Nucleus: A Cell Within A Cell*, *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84(3-4) (2006) 279.
- [14] Haupt S., Berger M., Goldberg Z., & Haupt Y., Apoptosis-the p53 network, *Journal of cell science* 116(20) (2003) 4077.
- [15] Zhang X., Tang N., Hadden T.J., & Rishi A.K., Akt, FoxO and regulation of apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1813(11) (2011) 1978.
- [16] Sakoe Y., Sakoe K., Kirito K., Ozawa K., & Komatsu N., FOXO3A as a key molecule for all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia, *Blood*, 115(18) (2010) 3787.
- [17] Li J., Orr B., White K., Belogortseva N., Niles R., et al., Chmp 1A is a mediator of the antiproliferative effects of all-trans retinoic acid in human pancreatic cancer cells, *Mol. Cancer* 8:7 (2009).
- [18] Zheng A, Mantymaa P, Saily M, Savolainen E, Vahakangas K, Koistinen P., p53 pathway in apoptosis induced by all-trans-retinoic acid in acute myeloblastic leukaemia cells, *Acta Haematol.* 103 (2000) 135.
- [19] Zhang H, Rosdahl I, Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells, *Int. J. Oncol.* 25 (2004) 303.
- [20] Mrass P., Rendl M., Mildner M., Gruber F., Lengauer B., Ballaun C., ... & Tschachler, E., Retinoic Acid Increases the Expression of p53 and Proapoptotic Caspases and Sensitizes Keratinocytes to Apoptosis, *Cancer research* 64(18) (2004) 6542.
- [21] Zambricki E. et al., Signaling T-cell survival and death by IL-2 and IL-15. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant, Am. Soc. Transpl. Surg.* 5 (2005) 2623.

All-trans Retinoic Acid Effect on the Apoptosis Gene Expression of Gastric Cancer Cell

Ngo Thu Ha¹, Luu Thi Binh², Le Thi Thanh Huong¹,
Mai Van Linh¹, Nguyen Dac Trung², Nguyen Phu Hung^{1,3}

¹Thai Nguyen University of Sciences

²Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy

³French National Institute of Health and Medical Research U1235, Nantes, France

Abstract: Apoptosis occurs in multicellular organisms to control the number of cells. Apoptosis is tightly controlled by a set of protein and aberrant regulation of apoptosis may promote the formation of cancer cells. All-trans retinoic acid (ATRA) is considered to be a potent agent in the treatment of solid tumors, including gastric cancer, because of its ability to activate apoptosis. In this study, we analysed the effect of ATRA to the expression of gene encoding apoptosis suppressing or apoptosis promoting proteins by Real-time RT-PCR (RT-qPCR) method and demonstrated that ATRA promotes p53 expression at protein level using immunofluorescence concurrently. The results showed ATRA not only down-regulated apoptosis suppressing genes including *AKT1*, *BAD*, *NUP62*, *BCL2*, *PIK3R2* and *MAPK1* but also up-regulated apoptosis promoting genes including *CASP9*, *FOXO3*, *IL2* and *TP53*.

Keywords: ATRA, apoptosis, gastric cancer, RT-qPCR.