



Original Article

# All Trans Retinoic Acid Regulates Expression of Genes Involved in Cell Senescence Pathway in Gastric Cancer Cell Line MKN45

Luu Thi Binh<sup>1</sup>, Le Thi Thanh Huong<sup>2</sup>, Nguyen Trung Thanh<sup>3</sup>, Nguyen Phu Hung<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>*Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy, Thai Nguyen University, Tan Thinh, Thai Nguyen, Vietnam*

<sup>2</sup>*Thai Nguyen University of Sciences, Thai Nguyen University, Tan Thinh, Thai Nguyen, Vietnam*

<sup>3</sup>*Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

Received 22 May 2019

Revised 22 September 2019; Accepted 23 October 2019

**Abstract:** Cellular senescence is a state in which cells can no longer divide. The dysregulation of the cell senescence signaling pathway could lead to uncontrolled cell proliferation and formation of malignant cells. Intervening in cell senescence signaling pathway to bring cancer cells back to cell senescence state is a potential way in cancer treatment. Recent studies show that tumor cells can undergo cellular senescence by using special chemotherapy. In this study, we indicated that All trans retinoic acid (ATRA) is able to influence the expression of genes involved in cell senescence signaling pathway in gastric cancer cells MKN45. ATRA down-regulates the expression of important genes controlling cell growth. On the other hand, ATRA up-regulates the expression of GADD45A, P21 and P53 genes that play an important role in the signaling pathway of cells. This finding suggests that ATRA could inhibit MKN45 cells through activating cell senescence signaling pathway.

**Keywords:** All trans retinoic acid, gastric cancer stem cell, cell senescence.

\* Corresponding author.

Email address: [hungnguyenphu@tnus.edu.vn](mailto:hungnguyenphu@tnus.edu.vn)

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4907>



# All trans retinoic acid điều hòa biểu hiện gene của con đường tín hiệu lão hoá tế bào ở dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45

Luu Thị Bình<sup>1</sup>, Lê Thị Thanh Hương<sup>2</sup>, Nguyễn Trung Thành<sup>3</sup>, Nguyễn Phú Hùng<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y-Dược, Đại học Thái Nguyên, Tân Thịnh, Thái Nguyên, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên, Tân Thịnh, Thái Nguyên, Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 22 tháng 5 năm 2019

Chỉnh sửa ngày 22 tháng 9 năm 2019; Chấp nhận đăng ngày 23 tháng 10 năm 2019

**Tóm tắt:** Lão hoá tế bào là trạng thái tế bào không còn khả năng tiếp tục phân chia. Sự rối loạn điều hòa của con đường tín hiệu lão hóa dẫn tới tế bào mất kiểm soát phân chia và hình thành lên các tế bào ác tính. Việc can thiệp vào con đường tín hiệu này nhằm đưa tế bào ung thư trở lại sự lão hóa là một hướng tiếp cận tiềm năng trong điều trị ung thư hiện nay. Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng, các tế bào khối u có thể trải qua con đường lão hoá nhờ sử dụng hoá chất thông qua các liệu pháp hoá trị. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã chỉ ra rằng, All trans retinoic acid (ATRA) có khả năng tác động lên sự biểu hiện của các gen liên quan tới sự lão hoá tế bào ở tế bào ung thư dạ dày MKN45. Đáng chú ý, ATRA điều hoà giảm mạnh các gene quan trọng kiểm soát sự tăng trưởng của tế bào. Mặt khác, ATRA điều hoà tăng sự biểu hiện của các gen GADD45A, P21 và P53 có vai trò rất quan trọng trong con đường tín hiệu lão hoá của tế bào. Kết quả này chỉ ra rằng ATRA có thể đã ức chế tế bào ung thư dạ dày thông qua việc hoạt hóa con đường tín hiệu lão hóa tế bào.

**Từ khóa:** All trans retinoic acid, tế bào gốc ung thư dạ dày, sự lão hoá tế bào.

## 1. Mở đầu

Sự lão hóa tế bào được mô tả lần đầu tiên vào năm 1961 khi nuôi cấy các nguyên bào sợi ở người bởi Hayflick và Moorhead (Hayflick and Moorhead, 1961). Theo đó, sự lão hóa tế bào được định nghĩa là trạng thái tế bào không còn khả năng tiếp tục phân chia do sự ngắn đi các đoạn telomere ở đầu mút nhiễm sắc thể sau mỗi

chu kỳ nhân đôi DNA. Bên cạnh đó, rối loạn chức năng ở ty thể, tổn thương DNA và các nhân tố ngoại sinh đều có thể gây ra sự lão hóa tế bào [2]. Đặc trưng của sự lão hóa tế bào là sự sinh trưởng ổn định đi kèm với các thay đổi về mặt kiểu hình như tái cấu trúc sợi nhiễm sắc, tái thiết lập chương trình trao đổi chất, tăng cường sự tự thực bào [3]. Ở các khối u, sự lão hóa tế bào được

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: [hungnguyenphu@tnus.edu.vn](mailto:hungnguyenphu@tnus.edu.vn)

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4907>

quan sát ở trạng thái tiền ác tính, tuy nhiên các tế bào ác tính lại không có hiện tượng bị lão hóa, đây là minh chứng mạnh mẽ cho thấy rối loạn sự lão hóa tế bào đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh khối u [4]. ATRA là một dẫn xuất của vitamin A thuộc họ retinoid, nó được sử dụng như một loại thuốc chống ung thư trong các liệu pháp hóa học. ATRA ức chế sự phát triển của khối u thông qua khả năng dừng chu kỳ tế bào, gây biệt hóa hoặc cảm ứng quá trình apoptosis ở các tế bào trong khối u [5]. Heo và cộng sự đã chỉ ra rằng, ATRA cảm ứng quá trình chết theo chương trình (apoptosis) ở các tế bào ung thư gan bằng cách hoạt hóa sự biểu hiện của p14 trong con đường tín hiệu p53 [6]. Bên cạnh đó, việc can thiệp vào con đường tín hiệu Rb để cải thiện hiệu quả xử lý các tế bào ung thư và phát triển các liệu pháp mới là một hướng đi được chú ý hiện nay [7].

Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã chỉ ra ATRA đã gây biệt hóa tế bào ung thư dạ dày trong cả mô hình nuôi cấy in vitro và mô hình chuột [8]. Đồng thời chúng tôi đã xác định được ATRA điều hòa sự biểu hiện của các gen tham gia vào quá trình apoptosis theo hướng tăng cường biểu hiện các gene thúc đẩy apoptosis và giảm biểu hiện các gene ức chế apoptosis [9]. Tuy nhiên, hiện chưa có một nghiên cứu nào đánh giá tác động của ATRA lên con đường tín hiệu phân tử của sự lão hóa tế bào ở ung thư dạ dày. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích ảnh hưởng của ATRA lên sự biểu hiện của các gen liên quan tới sự lão hóa tế bào, bao gồm các gen kiểm soát quá trình phân bào, các yếu tố phiên mã, các cyclin và một số proto-oncogene trên dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nuôi cấy tế bào 3D và xử lý tế bào với ATRA

Dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45 được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Inserm U1053 - Viện Sức khỏe và Nghiên cứu Y học Quốc gia

Pháp tại Bordeaux. Quy trình nuôi cấy được tiến hành theo nghiên cứu trước đó [8]. Nuôi cấy các tế bào ung thư dạ dày MKN45 với mật độ 2000 tế bào/giếng nuôi cấy diện tích 3,8cm<sup>2</sup> bề mặt không bám dính để hình thành nên tumorsphere (một khối các tế bào ung thư hình cầu) trong môi trường DMEMF12/Glutamax (từ Invitrogen) có bổ sung 1% ampicillin/streptomycin, yếu tố tăng trưởng biểu mô EGF 20ng/ml, yếu tố tăng trưởng thượng bì FGF 20ng/ml, glucose 0,3%, insulin 5µg/ml ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sau mỗi 2 ngày của quá trình nuôi cấy, loại bỏ 1 ml môi trường nuôi cấy cũ, đồng thời bổ sung 1 ml môi trường nuôi cấy mới.

Sau 5 ngày nuôi cấy, các tế bào được xử lý với ATRA ở nồng độ 5µM (đây là nồng độ ức chế sự tăng sinh tế bào được lựa chọn từ một sàng lọc trong dải nồng độ từ 0 - 10µM trước khi tiến hành nghiên cứu này) trong 48 giờ. Mẫu đối chứng được xử lý bằng DMSO nồng độ 0,01% trong thời gian tương ứng với mẫu xử lý với ATRA. Thu nhận và phân tách các tumorsphere thành các tế bào đơn bằng enzyme trypsin nồng độ 0,05% trước khi tách chiết RNA tổng số (tất cả hoá chất được cung cấp bởi Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

### 2.2. Tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA

RNA tổng số được tách chiết bằng phương pháp Trizol theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Nồng độ và chất lượng RNA được đánh giá bằng máy đo quang phổ NanoDrop ở bước sóng hấp thụ 260nm. 1µg RNA được sử dụng để thực hiện phản ứng tạo cDNA bằng Quantitect Reverse Transcriptase (RT) kit (cung cấp bởi Qiagen, Hilden, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### 2.3. Phân tích sự biểu hiện gene bằng Realtime PCR

Phân tích Real-time PCR sử dụng 20ng cDNA cho mỗi phản ứng với tổng thể tích là 20µl, chất phát huỳnh quang là SYBR Green qPCR do Invitrogen cung cấp như đã mô tả trong

nghiên cứu trước đó [8]. Danh sách các gen nghiên cứu với mã số cặp mỗi tương ứng được cung cấp bởi Qiagen và được trình bày trong bảng 1, trong đó HPRT1 là gene tham chiếu (reference gene). Sự thay đổi về mức độ biểu hiện gene được tính theo phương pháp Delta delta ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) [10]. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của 3 lần lặp lại thí nghiệm với độ lệch chuẩn SD, cỡ mẫu cho mỗi lần thí nghiệm  $n = 3$ . Dữ liệu được thống kê và phân tích bằng phần mềm SPSS16.0F, sử dụng kiểm định Mann-Whitney.

#### 2.4. Phân tích sự biểu hiện của P21 bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang

Phân tích sự biểu hiện P21 bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang được tóm tắt theo các bước sau: Các tumorsphere được cố định bằng paraformaldehyde sau đó rửa 2 lần bằng đệm PBS. Tiếp theo nhuộm tiêu bản với kháng thể thứ nhất là kháng thể đơn dòng (IgG) chống lại p21 ở người (Abcam cung cấp) tỷ lệ 1/100 trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, rửa tiêu bản bằng PBS 2 lần. Tiếp theo, nhuộm với kháng thể 2 gắn AlexaFluor®488 (Abcam cung cấp) kháng lại kháng thể thứ 1 trong 15 phút ở 4°C. Sau đó, tế bào được rửa 2 lần bằng đệm PBS, và nhuộm với Phalloidin 647, tỷ lệ 1/1000 trong thời gian 30 phút. Rửa tế bào 2 lần bằng PBS 1X, lần thứ 2 đệm rửa PBS chứa dung dịch nhuộm nhân tế bào DAPI (Sigma cung cấp). Tế bào được quan sát và chụp ảnh bằng hệ thống kính hiển vi huỳnh quang Nikon Eclipse Ti2.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. ATRA điều hòa giảm sự phiên mã các gene kiểm soát sự phân chia và tăng trưởng tế bào trong con đường tín hiệu lão hóa

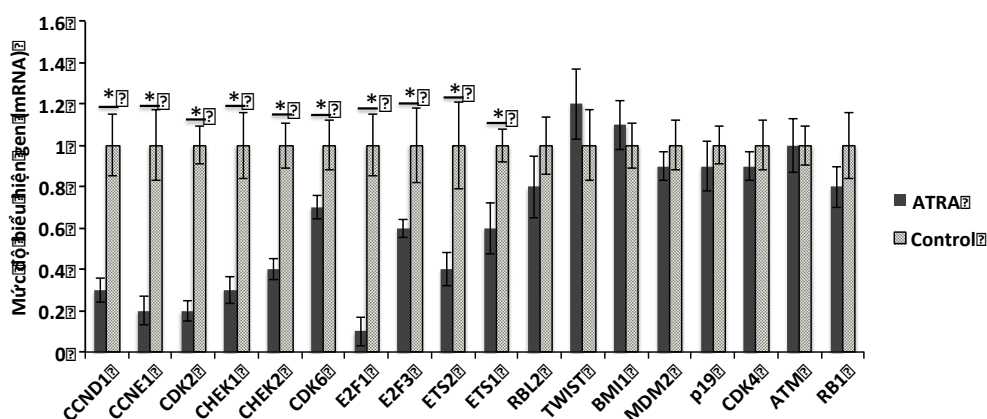
Lão hóa tế bào là quá trình phức tạp, có sự tham gia của nhiều gen khác nhau trong đó có nhóm gen liên quan tới sự dừng chu kỳ phân chia, làm ngừng sự gia tăng số lượng tế bào. Để đánh

giá ảnh hưởng của ATRA lên chu kỳ tế bào, trong nghiên cứu này, 18 gen khác nhau liên quan đến sự kiểm soát chu kỳ tế bào đã được phân tích. Kết quả ở hình 1 cho thấy, việc sử dụng ATRA đã làm giảm sự biểu hiện của các gen kiểm soát sự tăng trưởng của tế bào bao gồm các gene thuộc họ cyclin (CCND1, CCNE1), CDKs (CDK2, CDK4, CDK6), các protein kinase kiểm soát các vị trí chuyển pha trong chu kỳ tế bào (CHEK1, CHEK2) và các yếu tố phiên mã (E2F1, E2F3, ETS1, ETS2, RB1, RBL2, MDM2). Trong đó, các gen mã hóa cho cyclin được điều hòa giảm mức độ phiên mã từ 4 đến 5 lần so với mẫu đối chứng. Tương tự như vậy, mức độ biểu hiện của các gen mã hóa cho các protein ở điểm kiểm soát chu kỳ tế bào gồm CHEK1 và CHEK2 giảm từ 2,5 đến 3 lần so với mẫu đối chứng (Hình 1).

Các nghiên cứu trước đó đã chỉ ra rằng, ức chế sự biểu hiện của cyclin D1 bằng thuốc kháng ung thư đã làm tăng sự tự thực bào trong các tế bào biểu mô tuyến vú ở người và thúc đẩy trạng thái lão hóa của tế bào [11]. Bên cạnh đó, nó cũng được chỉ ra rằng sự điều hòa giảm sự biểu hiện của các kinase phụ thuộc cyclin điển hình như CDK2, CDK4 và CDK6 sẽ dẫn tới ức chế quá trình phosphoryl hóa RB. RB không được phosphoryl hóa sẽ tương tác chặt chẽ với yếu tố phiên mã E2F dẫn tới ức chế quá trình phiên mã của các gene cần thiết cho tế bào bước vào pha S, kết quả là thúc đẩy quá trình lão hóa tế bào [12, 13]. Tuy nhiên, kết quả ở hình 1 cho thấy ATRA không làm thay đổi đáng kể mức độ biểu hiện của các gene TWIST, BMI1, MDM2, p19, CDK4 và ATM. TWIST được biết đến là protein tham gia trực tiếp vào sự biểu hiện của BMI1 trong quá trình chuyển dịch biểu mô – trung mô (EMT), cơ chế chính của sự di căn ung thư đồng thời sự liên kết giữa TWIST và BMI1 còn liên quan đến đặc tính gốc của các tế bào ung thư [14]. TWIST và BMI1 cũng được biết đến như là hai yếu tố điều hòa âm của p19 hay Cdkn2a [15, 16].

Bảng 1. Mã số các cặp mồi sử dụng cho Realtime - PCR (Qiagen)

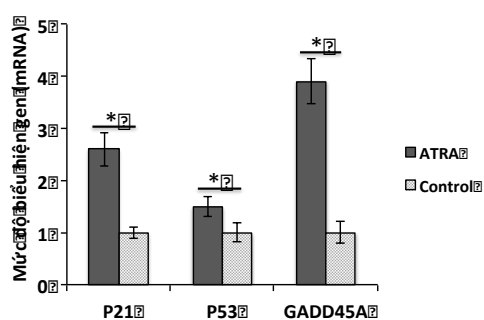
Tên gene	Mã số cặp mồi	Tên gene	Mã số cặp mồi	Tên gene	Mã số cặp mồi
ATM	PPH00325C	CHEK1	PPH00940C	MDM2	PPH00193E
BMI1	PPH57778A	CHEK2	PPH00921B	p19	PPH00210C
CCND1	PPH00128F	E2F1	PPH00136G	P21	PPH00211E
CCNE1	PPH00131A	E2F3	PPH00917F	P53	PPH00213F
CDK2	PPH00117F	ETS1	PPH01781C	RB	PPH00228F
CDK4	PPH00118F	ETS2	PPH00091C	RBL2	PPH00364C
CDK6	PPH00119C	GADD45A	PPH00148B	TWIST	PPH02132A
HPRT1	PPH01018C				



Hình 1. ATRA điều hoà sự biểu hiện của các gene kiểm soát sự tăng trưởng tế bào so sánh với mẫu đối chứng (control), n = 3, \*p &lt; 0,05.

### 3.2. ATRA làm tăng cường sự phiên mã các gene chủ chốt P53, P21 và GADD45A trong con đường tín hiệu lão hóa tế bào

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chỉ ra ATRA ảnh hưởng lên sự biểu hiện ở các gen P53, P21 và GADD45A (Hình 2). Kết quả ở hình 2 cho thấy, P53 được biểu hiện tăng 1,5 lần trong khi mức độ biểu hiện của P21 và GADD45A tăng mạnh khoảng 2,5 và 4 lần so sánh với mẫu đối chứng. Quá trình lão hóa tế bào xảy ra không chỉ do sự ngắn dần các đoạn telomere sau mỗi chu kỳ tái bản DNA mà còn gây ra bởi các bất thường trong sự biểu hiện của các oncogene. P53 tham gia vào nhiều quá trình khác nhau của tế bào bao gồm kiểm soát chu kỳ tế bào, sửa chữa DNA, khiến tế bào trải qua apoptosis đồng thời có thể gây nên lão hoá tế bào theo cả hai cách trên [17].



Hình 2. ATRA điều hoà tăng sự biểu hiện của các gen cảm ứng sự lão hoá tế bào so với mẫu đối chứng (control), n = 3, \*p &lt; 0,05.

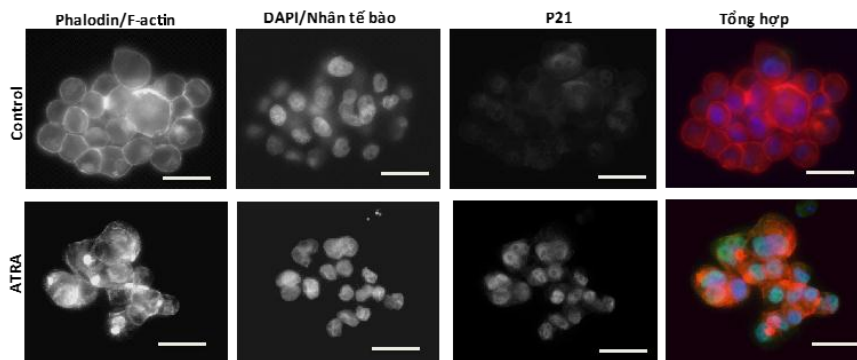
P21 là một trong các yếu tố phiên mã được điều hoà trực tiếp bởi P53 và sự biểu hiện mạnh của P53 dẫn tới điều hoà tăng sự biểu hiện của P21 trong quá trình đáp ứng với các stress từ môi

trường [18]. P21 là chất ức chế quá trình tái bản DNA và ức chế các protein cycline phụ thuộc kinase(CDK) từ đó khiến tế bào đi vào trạng thái dừng chu kì tế bào [19]. Đáng chú ý, ở nhiều dòng tế bào ung thư, sự biểu hiện tăng cường của P21 đã thúc đẩy tế bào đi vào trạng thái nghỉ vĩnh viễn với các đặc điểm của một tế bào đang trải qua quá trình lão hoá [20].

GADD45 là một protein giữ vai trò đặc biệt quan trọng trong việc dừng sự sinh trưởng tế bào và đưa tế bào vào trạng thái lão hoá, điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc ngăn ngừa sinh sôi

của các tế bào chứa những sai hỏng về mặt di truyền. Jackson và cộng sự đã chỉ ra rằng, P53 gắn kết vào vùng promoter của gene GADD45 ở cả các tế bào đang được xử lý bằng thuốc điều trị ung thư và các tế bào lão hoá. Đồng thời, nhóm nghiên cứu đã chứng minh rằng ở các tế bào lão hoá, khi liên kết của P53 vào promoter của các gene đích được tăng cường chỉ có P21 và GADD45 được tăng cường biểu hiện [21].

### 3.3. ATRA cảm ứng sự biểu hiện tăng của protein P21



Hình 3. Ảnh hưởng của ATRA lên sự biểu hiện của protein P21: Phalodin phát hiện F-actin màu đỏ; DAPI nhuộm nhân tế bào màu lam; Kháng thể kháng P21 màu lục; thang tỷ lệ (Scale bar) 20µm.

Các phân tích bằng Realtime PCR trình bày ở trên đã chỉ ra, ATRA điều hoà tăng sự phiên mã của P21 lên 2,5 lần so với đối chứng. Để khẳng định ATRA làm tăng cường sự biểu hiện của P21 ở mức độ protein, phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể đơn dòng kháng P21 đã được thực hiện. Kết quả ở hình 3 chỉ ra rằng P21 được biểu hiện mạnh trong nhân tế bào MKN45 được xử lý với ATRA so với các tế bào đối chứng. Kết quả này một lần nữa khẳng định ATRA đã điều hoà tăng sự biểu hiện của gen P21, một gen chủ chốt liên quan đến sự lão hóa tế bào. Đáng chú ý, một nghiên cứu trước đó của Park và cộng sự khi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của ATRA lên các dòng tế bào gan HepG2, Huh7 và dòng tế bào ung thư ruột kết HCT116 trong điều kiện nuôi cấy 2D đã chỉ ra

rằng, ATRA đã cảm ứng sự lão hoá của tế bào gan HepG2 thông qua điều hoà tăng sự biểu hiện của các gene P16, P21 và P27. Tuy nhiên, các dòng tế bào Huh7 và HTCT16 không bị cảm ứng sự lão hoá bởi ATRA đã không có sự điều hoà biểu hiện tăng của nhóm gen này, qua đó chỉ ra vai trò đặc biệt quan trọng của các gen P21, P27 và P16 trong sự lão hoá của tế bào [22]. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng tôi chỉ ra rằng ATRA đã điều hoà tăng hoạt động các gene chủ chốt trong con đường tín hiệu của sự lão hoá dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45.

## 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chỉ ra rằng ATRA là một hoạt chất tiềm năng trong

việc can thiệp vào sự biểu hiện các gen liên quan đến sự lão hóa tế bào bao gồm sự tăng cường biểu hiện các gen cảm ứng sự lão hóa tế bào và sự ức chế biểu hiện các gen kiểm soát sự lão hóa tế bào. Đặc biệt, ATRA đã tăng cường sự biểu hiện của P21, một protein được điều hoà bởi P53 và giữ vai trò đặc biệt quan trọng trong quá trình lão hóa tế bào trong điều kiện nuôi cấy 3D. Nghiên cứu này chỉ ra rằng, ATRA có thể đã áp chế sự phát triển của tế bào ung thư dạ dày MKN45 thông qua điều hoà sự biểu hiện của các gene tham gia vào con đường tín hiệu lão hóa tế bào.

### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Đề tài cấp Bộ mã số B2017-TNA-48.

### Tài liệu tham khảo

- [1] L. Hayflick, P.S. Moorhead, The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.* 25 (1961) 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6).
- [2] V. Dupé, N.B.Ghyselinck, V. Thomazy, L. Nagy, P.J. Davies, P. Chambon and M. Mark, Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods, *Development Biology* 208 (1999) 30-34. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9176>.
- [3] López-Otín Carlos, et al, The hallmarks of aging, *Cell.* 153 (2013) 1194-1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- [4] Kuilman Thomas, et al, The essence of senescence, *Genes & development.* 24 (2010) 2463-2479. <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>.
- [5] Collado Manuel and Manuel Serrano, Senescence in tumours: evidence from mice and humans, *Nature Reviews Cancer.* 10 (2010) 51-57. <https://doi.org/10.1038/nrc2772>.
- [6] Hofmann, L. Sandra, Retinoids: "differentiation" agents for cancer treatment and prevention, *Am J Med Sci.* 304 (1992) 202-213. <https://doi.org/10.1097/00000441-199209000-00010>.
- [7] Heo Shin-Hee, Juri Kwak and Kyung Lib Jang, All-trans retinoic acid induces p53-dependent apoptosis in human hepatocytes by activating p14 expression via promoter hypomethylation, *Cancer letters* 362 (2015) 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.03.036>.
- [8] P.H. Nguyen, J. Giraud, C. Staedel, L. Chambonnier, P. Dubus, E. Chevret, H. Bœuf, X. Gauthereau X, Rousseau B, Fevre M, Soubeyran I, Belleannée, S. Evrard, D. Collet, F. Mégraud, C. Varon, Knudsen, S. Erik, All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth, *Oncogene* 35 (2016) 5619-5628. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.87>.
- [9] Sherr Charles, Frank McCormick, The RB and p53 pathways in cancer, *Cancer cell.* 2(2002) 103-112. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00102-2).
- [10] Ngo Thu Ha, Luu Thi Binh, Le Thi Thanh Huong, Mai Van Linh, Nguyen Đac Trung, Nguyen Phu Hung, All-trans Retinoic Acid Effect on the Apoptosis Gene Expression of Gastric Cancer Cell (in Vietnamese), *Journal of Sciences.* 33 (2017) 138-143. <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4540>.
- [11] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method, *Method* 25 (2001) 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [12] E.Nelson Brown., Rinath Jeselsohn., Teeru Bihani., Miaofen G. Hu., Parthena Foltopoulou., Charlotte Kuperwasser and Philip W. Hinds, Cyclin D1 activity regulates autophagy and senescence in the mammary epithelium, *Cancer Res.* 72 (2012) 6477-6489. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4139>.
- [13] M. Trimarchi Jeffrey, Jacqueline A. Lees, Sibling rivalry in the E2F family, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3 (2002) 11-12. <https://doi.org/10.1038/nrm714>.
- [14] Stevaux Olivier, Nicholas J. Dyson, A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function, *Current opinion in cell biology.* 14 (2002) 684-691. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00388-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00388-5).
- [15] Wu Kou-Juey, Muh-Hwa Yang, Epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness: the Twist1-Bmi1 connection, *Bioscience reports.* 31 (2011) 449-455. <https://doi.org/10.1042/BSR20100114>.
- [16] J.J.L. Jacobs, K. Kieboom, S. Marino, R.A. DePinho, M. van Lohuizen, The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell

- proliferation and senescence through the ink4a locus, *Nature* 397(1999) 164-168. <https://doi.org/10.1038/16476>.
- [17] R. Maestro, A.P. Dei Tos, Y. Hamamori, S. Krasnokutsky, V. Sartorelli, L. Kedes, D.H. Beach, G.J. Hannon, Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis, *Genes Dev.* 13 (1999) 2207-2217. <https://doi.org/10.1101/gad.13.17.2207>.
- [18] Qian Yingjuan, Xinbin Chen, Senescence regulation by the p53 protein family, *Methods Mol Biol.* 965 (2013) 37-61. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_3).
- [19] A. Karimian, Y. Ahmadi, B. Yousefi, Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage, *DNA Repair (Amst)*. 42 (2016) 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008>.
- [20] Y. Xiong, G.J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, D. Beach, P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases, *Nature* 366 (1993) 701-704. <https://doi.org/10.1038/366701a0>.
- [21] L. Fang, M. Igarashi, J. Leung, M.M. Sugrue, S.W. Lee, S.A. Aaronson, p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup> induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53, *Oncogene*. 18 (1999) 2789-2797. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202615>.
- [22] G. Jackson James, M. Olivia Pereira-Smith, p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts, *Cancer Research*. 66 (2006) 8356-8360. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-1752>.