

## NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA HOẠT CHẤT SBVN ĐẾN HOẠT ĐỘNG CỦA GEN OCT4 BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

Đỗ Thị Thảo, Đỗ Thị Phương, Nguyễn Thị Cúc, Đỗ Khắc Hiếu, Đinh Duy Kháng

Viện Công nghệ sinh học

### TÓM TẮT

Gen Oct4 đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển và biệt hóa của tế bào gốc. Các nghiên cứu khoa học gần đây cũng đã ghi nhận sự hoạt động của Oct4 ở các tế bào ung thư. Tuy nhiên, những hiểu biết về vai trò và hoạt động của gen Oct4 trong quá trình hình thành và phát triển ung thư còn rất sơ sài. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định tác động của một hoạt chất mới chống ung thư tiềm năng Scutebarbalactone VN (SBVN) tới hoạt động phiên mã của gen Oct4 trên mô hình tế bào ung thư P3X-Ag18 nuôi cấy *in vitro*. Hoạt chất SBVN được phân lập và tách chiết từ cây Bán chi liên Việt Nam (*Scutellaria barbata* D. Don) bằng các phương pháp hóa học nhờ vào sự dẫn đường của các phép thử sinh học phòng chống ung thư như phép thử độc tính tế bào, phép thử ức chế hoạt động enzyme aromatase, phép thử ức chế hoạt động của cyclooxygenase 2 (COX2)... Thông qua phương pháp định lượng tương đối trên phản ứng Real-Time PCR (RT-PCR), chúng tôi nhận thấy hoạt chất SBVN đã ức chế hoạt động phiên mã của gen Oct4 trong khi không ảnh hưởng tới hoạt động này ở gen đối chứng là  $\beta$ -tubulin (Housekeeping gene).

**Từ khóa:** Biệt hóa, phiên mã ngược, P3X-Ag18, Oct4, Real-Time PCR, Scutebarbalactone VN, yếu tố điều hòa phiên mã

### MỞ ĐẦU

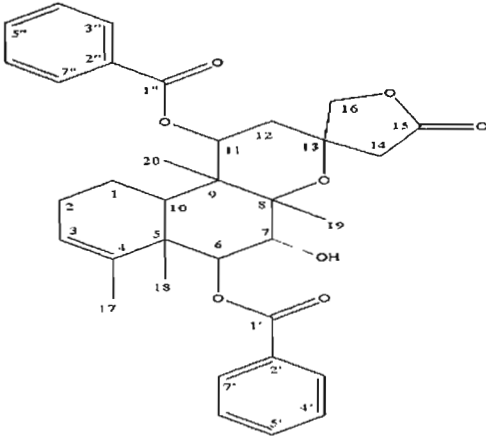
Oct4 là gen mã hóa cho một yếu tố điều hòa phiên mã (transcription factor) (Pesce, Scholer, 2001). Các yếu tố điều hòa phiên mã là các protein gắn kết với DNA và hoạt hóa hoặc ức chế quá trình phiên mã của một số gen nào đó. Oct4 được xem là có tác động tới sự biểu hiện của một số gen nhất định trong quá trình phát triển phôi sớm. Như vậy, Oct4 có thể đóng một vai trò quan trọng trong quá trình phát triển và biệt hóa của tế bào gốc (Byrne *et al.*, 2003; Kirchoff *et al.*, 2000).

Oct4 là yếu tố luôn gắn liền với các tế bào gốc, nó biểu hiện mạnh trong tế bào gốc ở giai đoạn phôi thai sớm (Goto *et al.*, 1999; Hansis *et al.*, 2000). Thậm chí, Oct4 còn được xem là một chỉ thị phân tử để nhận biết tế bào gốc khi kiểm tra phân biệt với các loại tế bào đã biệt hóa khác. Do vai trò quan trọng nhưng còn chưa được hiểu biết nhiều, gần đây, các nghiên cứu về Oct4 đã được thực hiện và thật ngạc nhiên, các nhà khoa học đã phát hiện sự hoạt động của Oct4 trong các tế bào ung thư (Monk, Holding, 2001; Shushan *et al.*, 1993; Tai *et al.*, 2005). Tế bào gốc và tế bào ung thư có một đặc điểm chung rất quan trọng là chúng đều có khả năng sinh sản liên tục, mà các tế bào bình thường khác không có (Trounson, 2004).

Từ phát hiện này, một số nhà khoa học cho rằng Oct4 có thể liên quan và là câu trả lời cho sự hình thành và phát triển bệnh ung thư (Suo *et al.*, 2005). Nếu chúng ta tìm được cách ngăn chặn sự sao mã và dịch mã của gen Oct4 ở tế bào ung thư hoặc tế bào tiền ung thư thì sẽ có thể là một bước tiến quan trọng trong việc phòng chống và chữa trị ung thư. Ngoài ra, việc sử dụng Oct4 như là một marker cho việc nhận dạng các thuốc, các hoạt chất có khả năng phòng chống hay chữa trị ung thư cũng sẽ là rất hữu ích (Tai *et al.*, 2005).

Hoạt chất SBVN tách chiết và phân lập từ cây Bán chi liên Việt Nam (*Scutellaria barbata* D. Don) là một hoạt chất tiềm năng, đã được chứng minh có hoạt tính phòng chống ung thư *in vitro* trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Đỗ Thị Thảo *et al.*, 2005; Thao *et al.*, 2005). Hoạt chất SBVN có danh pháp hóa học là **6,11-dibenzoyloxy-8,13-epoxy-7-hydroxy-3(4)-cleroden-15,16-olide** và có cấu trúc hóa học như sau:

Căn cứ vào mối liên quan của gen Oct4 với căn bệnh ung thư, chúng tôi bước đầu nghiên cứu tác động của hoạt chất SBVN đối với hoạt động phiên mã của gen Oct4 thông qua sự có mặt của sản phẩm mRNA của gen này trên dòng tế bào ung thư P3X-Ag18 nuôi cấy *in vitro*. Dưới đây là kết quả nghiên cứu của chúng tôi.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của hoạt chất SBVN.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Tế bào

Dòng tế bào myeloma chuột P3X-Ag18 (do GS. JM Pezzuto, Trường Đại học Tổng hợp Purdue, Hoa Kỳ cung cấp) được sử dụng cho nghiên cứu.

Hoạt chất nghiên cứu

Hoạt chất SBVN tinh sạch được pha trong Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% ở 5 nồng độ thử khác nhau là 40 µg/ml; 20 µg/ml; 10 µg/ml; 5 µg/ml; 2,5 µg/ml và được thêm vào môi trường nuôi cấy tế bào (10 µl/giếng).

Phương pháp nuôi cấy tế bào P3X-Ag18 *in vitro*

Tế bào P3X-Ag18 được nuôi cấy dưới dạng hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy RPMI-1640 có bổ sung 10% FBS, 1% PSF, 10% Sodium pyruvat (GIBCO). Tế bào được cấy chuyển sau 3 - 5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ẩm CO<sub>2</sub> ở điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Phương pháp tách chiết RNA tổng số có sử dụng Trizol kit của Qiagen

Thu hoạch tế bào bằng ly tâm (nếu ở dạng hỗn dịch) hoặc loại bỏ môi trường nuôi cấy đối với các dòng tế bào ở dạng đơn lớp; Phá màng tế bào, dung giải (lysation) bằng Trizol trong 5 phút; Thêm 0,2 ml chloroform/1 ml Trizol đã dùng; Lắc mạnh trong 15 giây và để ở nhiệt độ phòng trong 2 - 3 phút; Ly tâm mẫu 5 phút ở 12.000 x g, 4°C; Chuyển dịch chứa RNA ở pha trong sang một eppendorf mới; Thêm một lượng tương ứng Isopropanol lạnh với lượng dịch chứa RNA; Kết tủa RNA từ hỗn dịch ở trên trong 1 h hoặc lâu hơn ở -20°C; Ly tâm thu RNA ở tốc độ tối đa trong 15 phút ở nhiệt độ phòng; Loại bỏ triệt để dịch nổi và thu cặn RNA; Rửa cặn bằng 500 µl ethanol 70%, ly tâm ở tốc độ tối đa trong 10 phút; Loại bỏ triệt để ethanol và thu cặn RNA mong muốn; Làm khô nhanh cặn RNA rồi hòa tan bằng 30 - 50 µl nước khử ion RNase free hoặc nước có xử lý Diethyl Pyrocarbonate (DEPC); cất mẫu ở < -70°C cho tới khi cần dùng.

Phản ứng Reverse Transcriptase PCR

Phản ứng RT-PCR dựa trên nguyên tắc của chuỗi phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction), trong đó có sử dụng enzyme phiên mã ngược (Reverse Transcriptase) có khả năng sử dụng RNA làm khuôn tổng hợp DNA. Phản ứng RT-PCR gồm hai giai đoạn chính là giai đoạn tổng hợp cDNA từ mRNA nhờ tác dụng của enzyme phiên mã ngược và giai đoạn tổng hợp DNA dưới tác dụng của DNA polymerase.

Thành phần phản ứng RT-PCR: Mix reaction (25 µl); Template (20 µl); Primer F (1,5 µl); Primer R (1,5 µl); Mix enzyme (1 µl); H<sub>2</sub>O (16 µl). Tổng thể tích là: 50 µl.

Chu trình nhiệt (30 chu kì): 45°C (30 phút); 94°C (2 phút); 94°C (20 giây); 45°C (30 giây); 72°C (1 phút); 72°C (8 phút); 4°C (∞).

Bảng 1. Danh sách các cặp mồi.

Môi nhân bản gen Oct4 chuột	Mou OCT4F:	5'- CTCGAACCACATCCTTCTCT -3'
	Mou OCT4R:	5'- GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTTC -3'
Môi nhân bản gen β-tubulin chuột	TubF:	5'- GGAACATAGCCGTAAGACTGC -3'
	TubR:	5'- TCACTGTGCCTGAACTTACC -3'

### Phản ứng Real-Time PCR (RT-PCR)

Phản ứng Real-Time PCR được thực hiện với 3 mẫu: mẫu đối chứng âm M10 (DMSO10%), mẫu M8 (sử dụng SBVN tác động ở nồng độ 20  $\mu\text{g/ml}$ ), mẫu M5 (sử dụng SBVN tác động ở nồng độ 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Mỗi phản ứng tiến hành trong tổng thể tích 20  $\mu\text{l}$ , bao gồm 2  $\mu\text{l}$  DNA khuôn, 1  $\mu\text{l}$  mỗi mỗi, 0,4  $\mu\text{l}$  Taq, 2  $\mu\text{l}$  buffer, 2  $\mu\text{l}$  dNTP, 2  $\mu\text{l}$  LC FastStart DNAMaster<sup>plus</sup> SYBR Green I (10X) và 9,6  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O vô trùng. Chương trình phản ứng Real-Time PCR gồm 1 bước biến tính ở 95°C trong 5 phút, sau đó là 45 chu kỳ 95°C trong 5 giây, 58°C trong 5 giây và 72°C trong 10 giây với tốc độ gia nhiệt (temperature ramp) là 20°C/s. Trong quá trình khuếch đại này, cường độ tín hiệu huỳnh quang phát ra được đo tại điểm cuối pha gắn mỗi của mỗi chu kỳ. Tiếp theo là giai đoạn phân tích đường cong nhiệt độ nóng chảy (melting curves analysis) bao gồm hai bước: Hạ nhiệt độ xuống 65°C trong 30 giây để các mạch đơn DNA gắn lại với nhau, sau đó nâng dần nhiệt độ lên đến 95°C với tốc độ gia nhiệt là 0,2°C/s. Tín hiệu huỳnh quang phát ra được đo liên tục ở bước sóng 530 nm. Cuối cùng là giai đoạn làm mát hệ thống (cooling) tại 40°C trong 30 giây.

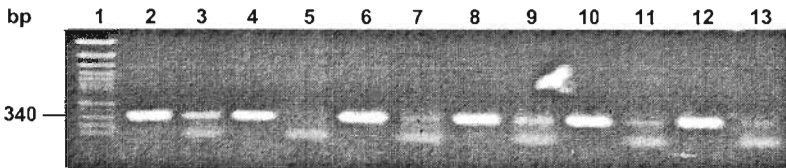
Ngoài ra, các phương pháp nghiên cứu dùng trong sinh học phân tử như phản ứng chuỗi

Polymerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), Phương pháp điện di DNA trên gel agarose cũng được sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi (Sambrook, Russel, 2001).

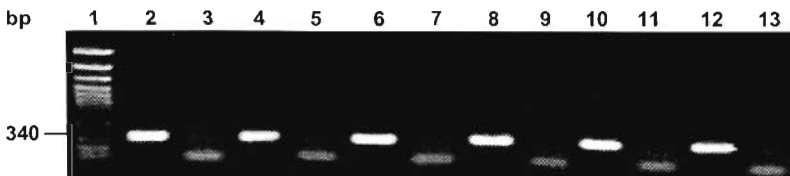
### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Tác động của hoạt chất SBVN đến hoạt động của gen Oct4 thông qua phản ứng Reverse Transcriptase PCR

Tế bào ung thư thử nghiệm được đưa vào các giếng với mật độ  $3.10^4$  tb/giếng và đưa vào tủ ấm CO<sub>2</sub> để ổn định trạng thái trong vòng 1 h. Tiếp theo, hoạt chất SBVN được đưa vào các giếng tế bào ở các nồng độ thử khác nhau và lặp lại 3 lần. Lượng RNA tổng số được thu nhận, tách chiết, tinh sạch sau 24 h, 48 h thí nghiệm và điều chỉnh nồng độ cho xấp xỉ bằng nhau ở các mẫu thí nghiệm. Tiếp đó, đoạn gen Oct4 và gen  $\beta$ -tubulin (gen đối chứng vì là gen housekeeping) được tổng hợp nhờ phản ứng PCR và phản ứng RT-PCR với khuôn mẫu là phân tử mRNA thu được và được kiểm tra kết quả bằng phương pháp điện di trên gel agarose. Kết quả thí nghiệm tìm hiểu tác động của SBVN đối với hoạt động phiên mã của gen Oct4 trên tế bào myeloma P3X-Ag18 và được thể hiện trên hình 2 và hình 3.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm RT-PCR thể hiện ảnh hưởng của SBVN đối với hoạt động của gen Oct4 trên dòng tế bào P3X-Ag18 sau 24 h thử chất.



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm RT-PCR thể hiện ảnh hưởng của SBVN đối với hoạt động của gen Oct4 trên dòng tế bào P3X-Ag18 sau 48 h thử chất. 1: Marker DNA 100 bp của hãng Fermentas; 2, 4, 6, 8, 10, 12: Sản phẩm RT-PCR của gen đối chứng  $\beta$ -tubulin nhận từ các mẫu RNA tương ứng là: đối chứng (DMSO10%), các nồng độ thử chất khác nhau 40  $\mu\text{g/ml}$ ; 20  $\mu\text{g/ml}$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 5  $\mu\text{g/ml}$  và 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 3, 5, 7, 9, 11, 13: Sản phẩm RT-PCR của đoạn gen Oct4 nhận từ các mẫu RNA tương ứng là: đối chứng (DMSO10%), các nồng độ thử chất khác nhau 40  $\mu\text{g/ml}$ ; 20  $\mu\text{g/ml}$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 5  $\mu\text{g/ml}$  và 2,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Kết quả trên cho thấy: gen đối chứng  $\beta$ -tubulin đã hoạt động ổn định trong suốt quá trình nghiên cứu và có hoạt động phiên mã để cho sản phẩm RNA ở tất cả các mẫu nghiên cứu. Gen Oct4 ở mẫu đối chứng (DMSO10%) cũng hoạt động bình thường sau 24 h thí nghiệm, sau 48 h hoạt động của gen này giảm đi nên chỉ cho một băng điện di mờ.

Sau 24 h, hoạt chất nghiên cứu SBVN đã phần nào tác động đến hoạt động của gen Oct4. Tại nồng độ thử chất cao nhất 40  $\mu\text{g/ml}$ , gen Oct4 đã bị tác động và không thấy có sản phẩm phiên mã RNA tương ứng do vậy không thấy có băng điện di. Tại các nồng độ thử chất giảm dần, độ đậm tăng dần của băng điện di cho thấy tác động của hoạt chất đến hoạt động của gen Oct4 cũng giảm dần. Tuy nhiên, ở nồng độ 10  $\mu\text{g/ml}$  (giếng 9) lại thấy xuất hiện một băng điện di đậm hơn khi so với các nồng độ thấp hơn. Đây là hiện tượng cần có thí nghiệm tiếp tục để có lời giải thích hợp lý.

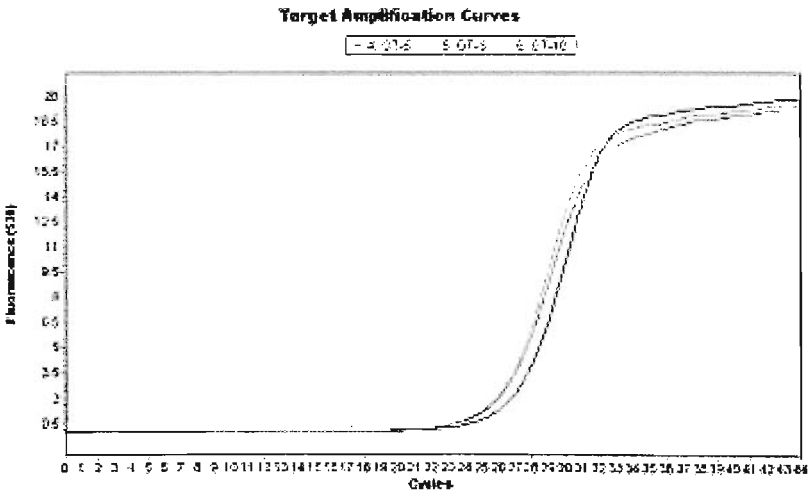
Sau 48 h, tác động của hoạt chất nghiên cứu SBVN lên hoạt động của gen Oct4 đã thể hiện: Tại các nồng độ thử chất 40  $\mu\text{g/ml}$ ; 20  $\mu\text{g/ml}$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 5  $\mu\text{g/ml}$ , sản phẩm RNA của gen Oct4 đã không được phát hiện, có thể là dưới tác động của hoạt chất SBVN, hoạt động phiên mã của gen Oct4 đã bị ức chế. Trong khi đó, tại nồng độ thử thấp nhất 2,5

$\mu\text{g/ml}$ , sản phẩm RT-PCR kiểm tra bằng điện di đã cho một băng mờ cho thấy gen Oct4 đã có hoạt động phiên mã tuy yếu hơn so với đối chứng.

Như vậy, thông qua kỹ thuật Reverse Transcriptase PCR, chúng tôi đã nhận thấy hoạt chất SBVN có ảnh hưởng đến hoạt động phiên mã của gen Oct4. Để tìm hiểu kỹ hơn, chúng tôi đã tiến hành khẳng định ảnh hưởng này nhờ vào phương pháp định lượng tương đối bằng kỹ thuật Real-Time PCR (RT-PCR).

**Tác động của hoạt chất SBVN đến hoạt động của gen Oct4 thông qua phương pháp định lượng tương đối bằng kỹ thuật Real-Time PCR (RT-PCR)**

Do điều kiện nghiên cứu có hạn và dựa vào kết quả nghiên cứu của phản ứng Reverse Transcriptase, chỉ có 2 nồng độ SBVN được lựa chọn cho kỹ thuật này là 20 và 2,5  $\mu\text{g/ml}$ . Ngoài ra, 1 mẫu đối chứng được sử dụng là DMSO 10%. RNA tổng số được thu nhận sau 48 h xử lý chất. Các sản phẩm cDNA được tạo ra từ phản ứng Reverse Transcriptase PCR được sử dụng làm khuôn cho các phản ứng RT-PCR. Thông qua phương pháp định lượng tương đối của kỹ thuật RT-PCR, chúng tôi tìm hiểu tác động của SBVN đến gen đích là Oct4 và lên gen đối chứng là  $\beta$ -tubulin (housekeeping gene).



Hình 4. Khuếch đại gen  $\beta$ -tubulin của 3 mẫu nghiên cứu M5, M8, M10 bằng phản ứng RT-PCR.

Kết quả trên cho thấy, 3 mẫu gen  $\beta$ -tubulin (ki hiệu là OT5, OT8, OT10) tương ứng với 3 mẫu nghiên cứu M5, M8, M10 đều cho hiệu quả khuếch

đại tốt, có ngưỡng chu kỳ (crossing point) xấp xỉ bằng nhau là 26,82; 25,80 và 25,89. Như vậy, gen  $\beta$ -tubulin không chịu tác động của hoạt chất nghiên

cứ và không thay đổi khả năng phiên mã ở tất cả các mẫu nghiên cứu. Kết quả này là hợp lý và phù hợp với kết quả chúng tôi thu được từ thí nghiệm Reverse Transcriptase PCR. Do đó, có thể sử dụng gen này như là một gen đối chứng để so sánh tác động của SBVN đến gen Oct4.

Với kết quả trên, chúng tôi đã sử dụng gen  $\beta$ -tubulin của từng mẫu nghiên cứu làm gen đối chứng nhằm tìm hiểu hoạt động phiên mã của gen đích Oct4 thông qua kết quả định lượng tương đối trên nền kỹ thuật RT-PCT. Kết quả định lượng tương đối đối với gen Oct4 (ký hiệu là ATC5, ATC8 và ATC10) tương ứng với 3 mẫu nghiên cứu M5, M8, M10 được trình bày ở bảng 2.

Từ các kết quả của bảng 2 có thể thấy rằng M5 (được xử lý chất SBVN ở nồng độ 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ), gen Oct4 (ký hiệu ATC5) khi so sánh với gen  $\beta$ -tubulin (ký hiệu là OT5) đã có sự sai khác nhất định về hoạt động phiên mã, cụ thể là gen Oct4 đã bị ức chế hoạt động dưới tác động của SBVN khi mức chênh lệch nồng độ là 1,46 lần. Ngưỡng chu kỳ của Oct4 là 27,35 trong khi của  $\beta$ -tubulin chỉ là 26,81. Tuy nhiên, có thể thấy sự ức chế hoạt động này là không

hiều. Kết quả này là hợp lý và cũng rất phù hợp với kết quả chúng tôi thu được từ kỹ thuật Reverse Transcriptase PCR ở trên khi SBVN chỉ ức chế được phần nào hoạt động của Oct4 ở nồng độ 2,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Đối với mẫu M8 (được xử chất SBVN ở nồng độ 20  $\mu\text{g/ml}$ ), gen Oct4 (ký hiệu ATC8) khi so sánh với gen  $\beta$ -tubulin (ký hiệu là OT8) đã cho thấy hoạt động phiên mã bị giảm đáng kể và bị ức chế mạnh. Kết quả RT-PCR cho thấy ở ngưỡng chu kỳ 40, gen Oct4 mới thấy có hoạt động trong khi chỉ số này ở gen  $\beta$ -tubulin là 27,35 và mức độ sai khác về số phiên bản nhân gen là  $1,88.10^4$  (1,88E4). Như vậy, dưới tác động của SBVN ở nồng độ cao 20  $\mu\text{g/ml}$ , hoạt động của gen Oct4 bị ức chế mạnh trong khi  $\beta$ -tubulin vẫn hoạt động bình thường.

Ở mẫu M10 (chỉ sử dụng DMSO 10% làm đối chứng và không xử lý SBVN) có thể nhận thấy, ngưỡng chu kỳ của Oct4 là 22,72 trong khi của  $\beta$ -tubulin là 25,80 đồng nghĩa với việc Oct4 đã có hoạt động phiên mã sớm. Như vậy, DMSO đã kích thích hoạt động của Oct4. Đây là một kết quả mới, cần được nghiên cứu sâu hơn nữa để có thể khẳng định vấn đề này.

**Bảng 2.** Kết quả định lượng tương đối đối với gen Oct4 (ký hiệu là ATC5, ATC8 và ATC10) thông qua phản ứng RT-PCT khi so sánh với gen đối chứng  $\beta$ -tubulin.

Cặp đối so sánh	Tên mẫu	Ngưỡng chu kỳ	Tỷ lệ khác biệt
Cặp số 1	OCT-5	26,81	1,46
	ATC-5	27,35	
Cặp số 2	OCT-8	25,80	$1,88 \times 10^4$
	ATC-8	40	
Cặp số 3	OCT-10	25,89	0,11
	ATC-10	22,72	

## KẾT LUẬN

Hoạt động phiên mã của gen sử dụng làm gen đối chứng  $\beta$ -tubulin (housekeeping gene) không bị ảnh hưởng bởi SBVN khi nghiên cứu bằng kỹ thuật Reverse Transcriptase PCR và bằng phương pháp định lượng tương đối trên nền kỹ thuật Real-Time PCR.

Hoạt động phiên mã của gen đích Oct4 có thay đổi và bị ức chế dưới tác động của hoạt chất SBVN khi nghiên cứu bằng kỹ thuật Reverse Transcriptase

PCR và bằng phương pháp định lượng tương đối trên nền kỹ thuật Real-Time PCR. Như vậy, hoạt tính chống ung thư của SBVN cũng như một phần cơ chế hoạt động của SBVN có liên quan đến việc ức chế hoạt động của gen Oct4 - gen quan trọng của quá trình phát triển liên tục của tế bào gốc cũng như tế bào ung thư.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS. J.M. Pezzuto, trường Đại học Hawaii, Hoa Kỳ đã giúp đỡ chúng tôi thực hiện công trình nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Byrne JA, Simonsson S, Western PS, Gurdon JB (2003) Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to Oct4 stem cell gene expression by amphibian oocytes. *Curr Biol* 13: 1206-1213.
- Chambers I, Smith A (2004) Self - renewal of tetarocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 23(43): 7150-7160.
- Đỗ Thị Thảo, Trịnh Thị Thanh Vân, Nguyễn Quyết Chiến, Nguyễn Văn Hùng, Đỗ Khắc Hiếu (2005) Nghiên cứu *in vitro* hoạt chất kháng ung thư của cây Bán chi liên *Scutellaria barbata*. *Tạp chí Dược học* 335(45): 10-13.
- Goto T, Adjaye J, Rodeck CH, Monk M (1999) Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. *Mol Hum Reprod* 9(5): 851-860.
- Hansis C, Grifo JA, Krey LC (2000) Oct4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 6: 999-1004.
- Hattori N, Nishino K, Ko YG, Hattori Nakao, Ohganet J, Tanaka S, Shiota K (2004) Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem* 17(279): 17603-17609.
- Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E (2000) Expression pattern of Oct4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* 63: 1698-1705.
- Monk M, Holding C (2001) Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene* 56(20): 8085-8091.
- Pesce M, Scholer HR (2001) Oct4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 4(19): 271-278.
- Sambrook J, Russell DW (2001), *Molecular cloning. A laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shushan EB, Pikarsky E, Klar A, Bergman Y (1993) Extinction of Oct-3/4 gene expression in embryonal carcinoma x fibroblast somatic cell hybrids is accompanied by changes in the methylation status, chromatin structure, and transcriptional activity of the Oct-3/4 upstream region. *Mol Cell Biol* 2(13): 891-901.
- Suo G, Han J, Wang X, Zhang J, Zhao Y, Zhao Y, Dai J (2005) Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 337(4): 1047-1051.
- Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE (2005) Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26(2): 495-502.
- Thao DT, Van TTT, Hang NTM, Chien NQ, Hieu DK, Hung NV (2005) Chemical constituents of the Vietnamese medicinal plant *Scutellaria barbata* D. Don (Lamiaceae). *Adv Nat Sci* 3(6): 313-317.
- Trounson A (2004) Stem cells, plasticity and cancer - uncomfortable bed fellows. *Development* 131: 2763-2768.

## STUDY ON THE EFFECT OF THE COMPOUND SBVN TOWARD THE EXPRESSION LEVEL OF THE OCT4 GENE BY REAL-TIME PCR TECHNIQUE

Do Thi Thao\*, Do Thi Phuong, Nguyen Thi Cuc, Do Khac Hieu, Dinh Duy Khang

*Institute of Biotechnology*

### SUMMARY

The Oct4 gene plays an important role in the developmental and differentiated process of stem cells. Recently, several scientific studies noted that the Oct4 gene expressed not only in embryonic stem cells but also in the carcinogenic cells. However, knowledge about the real role and action mode of the Oct4 toward carcinogenesis remains poorly. In this study, we evaluated the effect of the novel anticancer promising compound - Scutebarbalactone VN (SBVN) on the expression of the Oct4 gene using *in vitro* cultured P3X-Ag18 cancer cells. SBVN were obtained by bioassay-guided fractionation and isolation from the methanol extract of the Vietnamese medicinal plant Ban-chi-lien (*Scutellaria barbata* D. Don). The bioassays were used such as cytotoxic assay, aromatase inhibition assay, COX2 inhibition assay *etc.* By using Real-Time PCT techniques for relatively quantification, we studied the effect of SBVN toward the action of Oct4. The results showed that SBVN inhibited the expression of Oct4 while it did not effect to the action of  $\beta$ -tubulin - the house keeping gene.

**Keywords:** Differentiation, Oct4, Reverse transcription, Real-Time PCR, Scutebarbalactone VN, Transcription factor

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-38361774/84-4-38364343; E-mail: [thaodo@ibt.ac.vn](mailto:thaodo@ibt.ac.vn)