

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



TRẦN KHÁNH CHI

**XÁC ĐỊNH TÍNH ĐA HÌNH CỦA CÁC GEN *TP53* VÀ
GEN *MDM2* Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2019

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

BỘ Y TẾ



TRẦN KHÁNH CHI

**XÁC ĐỊNH TÍNH ĐA HÌNH CỦA CÁC GEN *TP53* VÀ
GEN *MDM2* Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI**

Chuyên ngành : Hóa sinh

Mã số : 62720112

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Trần Huy Thịnh

PGS.TS. Nguyễn Thị Hà

HÀ NỘI - 2019

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình thực hiện đề tài này tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ của Lãnh đạo cơ quan, các đơn vị, Thầy Cô, đồng nghiệp, các bệnh nhân, bạn bè và gia đình thân yêu của mình.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng tri ân sâu sắc tới PGS. TS. Nguyễn Thị Hà và PGS. TS. BS. Trần Huy Thịnh, là những người thầy, người hướng dẫn khoa học, đã tận tình giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập, trực tiếp hướng dẫn tôi thực hiện nghiên cứu, góp ý và sửa chữa luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS. TS. Tạ Thành Văn, Hiệu trưởng Trường Đại học Y Hà Nội, trưởng Bộ môn Hóa sinh là người thầy đã tận tình truyền đạt kiến thức và những kinh nghiệm quý báu đồng thời tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến những thầy cô, đồng nghiệp, những người đã tạo mọi điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án:

- Ban Giám Hiệu, Phòng Đào tạo Sau Đại Học - Trường Đại học Y Hà Nội.*
- PGS. TS. Phạm Thiện Ngọc - Nguyên trưởng Bộ môn Hóa Sinh cùng toàn thể các thầy cô, cán bộ trong Bộ môn Hóa Sinh - Trường Đại học Y Hà Nội.*
- PGS. TS. Trần Vân Khánh, Phó giám đốc Trung tâm Gen& Protein cùng toàn thể các cán bộ các nghiên cứu viên của Trung tâm.*
- GS. TS. Ngô Quý Châu, Giám đốc Trung tâm Hô hấp - Bệnh viện Bạch Mai cùng toàn thể các bác sỹ, điều dưỡng của Trung tâm.*
- GS. TS. Mai Trọng Khoa - Giám Đốc Trung Tâm Y học hạt nhân và Ung Bướu Bệnh Viện Bạch Mai cùng toàn thể các bác sỹ, điều dưỡng của Trung tâm.*
- Toàn thể bác sỹ và điều dưỡng của Khoa Khám bệnh - Bệnh viện Bạch Mai*

Xin được gửi lời cảm ơn đến các bệnh nhân cùng gia đình của họ đã giúp tôi có được các số liệu trong luận án này.

Xin cảm ơn các bạn bè, đồng nghiệp cùng các học trò thân yêu đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án.

Cuối cùng, tôi xin ghi nhớ công ơn sinh thành, nuôi dưỡng và tình yêu thương của bố mẹ tôi, bố mẹ chồng tôi cùng sự ủng hộ, động viên của chồng, hai con và các em trong gia đình, những người đã luôn ở bên tôi, là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

Hà Nội, tháng 02 năm 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Trần Khánh Chi, nghiên cứu sinh khóa 32 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa Sinh Y Học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Cô Nguyễn Thị Hà và Thầy Trần Huy Thịnh.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày 18 tháng 02 năm 2019

Người viết cam đoan

Trần Khánh Chi

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

bp	: Base pair Cặp base
CI	: Confidence Interval Độ tin cậy
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
Dup16	: Duplication 16bp Thêm đoạn 16 cặp base
GWAS	: Genome-Wide Association Studies Các nghiên cứu so sánh ở mức toàn bộ hệ gen
MDM2	: Murine Double Minute 2
NST	: Nhiễm sắc thể
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism Đa hình chiều dài các đoạn cắt giới hạn bằng enzym
RNA	: Ribonucleic Acid
SNPs	: Single Nucleotide Polymorphisms Đa hình nucleotid đơn
PAHs	: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Các hydrocarbon thơm đa vòng
PCR	: Polymerase Chain Reaction Phản ứng chuỗi khuếch đại gen
Oncogene	: Gen gây ung thư

OR	: Odds Ratio Tỷ suất chênh
Tumor suppressor gene	: Gen áp chế ung thư
<i>TP53</i>	: Tumor Protein 53 Protein khối u có trọng lượng 53 kDa
UTBM	: Ung thư biểu mô
UTPKTBN	: Ung thư phổi không tế bào nhỏ
Codon	: Bộ ba mã hoá
A, Ala	: Alanin (GCT, GCC, GCA, GCG)
D, Asp	: Aspartic acid (GAT, GAC)
G, Gly	: Glycin (GGT, GGC, GGA, GGG)
M, Met	: Methionin (ATG)
P, Pro	: Prolin (CCT, CCC, CCA, CCG)
R, Arg	: Arginin (CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG)
S, Ser	: Serin (TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC)
V, Val	: Valin (GTT, GTC, GTA, GTG)

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là loại ung thư thường gặp nhất và có tỷ lệ tử vong cao nhất trong các loại hình ung thư hiện nay. Theo số liệu thống kê cập nhật tình hình ung thư trên toàn thế giới Globocan 2012, ung thư phổi có tỷ lệ mới mắc và tử vong hàng đầu ở nam giới, tỷ lệ mới mắc đứng thứ 3 và tỷ lệ tử vong đứng thứ 2 ở nữ giới. Cũng theo thống kê này, Việt nam là quốc gia nằm trong nhóm những nước có tỷ lệ mới mắc ung thư phổi cao nhất ở nam giới và đứng thứ 4 ở nữ giới [1].

Cho đến nay, phẫu thuật vẫn được xem là phương pháp điều trị hiệu quả nhất đối với ung thư phổi. Tuy nhiên, khoảng 50% bệnh nhân ung thư phổi khi được phát hiện đã ở giai đoạn muộn, không còn khả năng phẫu thuật, khi đó các phương pháp hóa trị, xạ trị được chỉ định nhưng hiệu quả hạn chế và thường mang lại nhiều tác dụng không mong muốn, làm giảm chất lượng cuộc sống của bệnh nhân [2]. Chính vì vậy việc phát hiện sớm các yếu tố nguy cơ để có biện pháp theo dõi và chẩn đoán sớm, can thiệp kịp thời sẽ đóng vai trò đặc biệt quan trọng nhằm ngăn ngừa sự phát sinh, phát triển ung thư đồng thời nâng cao hiệu quả của công tác khám và điều trị bệnh.

Nghiên cứu cơ chế phân tử trong ung thư đã chứng minh rằng sự tích lũy đột biến gen theo thời gian dẫn tới sự phát sinh, phát triển mọi dạng tế bào ung thư trong cơ thể. Quá trình chuyển dạng tế bào sang ác tính thường được đánh dấu bằng sự kích hoạt các gen gây ung thư và đột biến gây bất hoạt các gen áp chế ung thư dẫn đến tế bào không ngừng tăng sinh, biệt hóa và kháng lại sự chết tế bào (apoptosis) [3]. Cơ chế điều hoà gen đóng vai trò quan trọng và sự rối loạn cơ chế điều hoà này khiến hệ thống các enzym sửa chữa gen của tế bào không thể khắc phục dẫn tới việc tích lũy một số lượng lớn các đột biến, khởi phát quá trình ung thư. Sự điều hoà gen thông qua mức độ biểu hiện gen, sự tương tác gen và hoạt động của các gen đó trong các con đường tín hiệu tế bào. Điều này có liên quan chặt chẽ đến kiểu gen thể hiện bằng các đa hình nucleotid

đơn (single nucleotide polymorphisms - SNPs) nằm rải rác trên toàn bộ chiều dài của gen. Chính sự khác biệt một vài nucleotid trong các SNPs của gen có thể làm thay đổi cấu trúc phân tử protein và từ đó làm thay đổi sự tương tác và hoạt động của protein được mã hoá bởi gen đó.

Các gen *TP53* và *MDM2* là nhóm gen nằm trong con đường tín hiệu p53-con đường đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì tính ổn định của bộ gen dưới tác động của các yếu tố có hại như sự thương tổn DNA, giảm oxy máu, rối loạn chuyển hóa hay tăng cường hoạt động của các gen sinh ung thư. Với mỗi biến đổi xảy ra trên gen *TP53* hay gen *MDM2* đều có thể làm thay đổi quá trình sinh lý tế bào và dẫn đến nguy cơ phát sinh, phát triển ung thư [4], [5], [6], [7]. Bên cạnh đó, gen *TP53* và gen *MDM2* đều là những gen đa hình, nhiều đa hình nucleotid đơn của 2 gen này đã được tìm thấy tạo ra những kiểu gen (genotype) khác nhau trong cộng đồng [8], [9], [10], [11]. Tuy nhiên, không phải tất cả các kiểu gen đó đều có khả năng thúc đẩy sự hình thành và tiến triển ung thư. Trên thực tế, người ta đã xác định được một số SNPs của gen *TP53* và gen *MDM2* có vai trò quan trọng trong bệnh sinh một số loại ung thư, trong đó có ung thư phổi [12]. Việc xác định các SNPs này có vai trò quan trọng trong việc đánh giá nguy cơ mắc bệnh và khả năng đáp ứng điều trị đối với từng cá thể.

Tại Việt Nam, trong những năm gần đây đã có một số công trình nghiên cứu về vai trò của gen *TP53* trong ung thư phổi, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào đánh giá tính đa hình của gen *TP53* cũng như vai trò của gen *MDM2* thông qua các SNPs liên quan đến ung thư phổi. Nghiên cứu: “**Xác định tính đa hình của các gen *TP53* và gen *MDM2* ở bệnh nhân ung thư phổi**” được thực hiện với 2 mục tiêu chính:

1. **Xác định tỷ lệ kiểu gen của một số đa hình gen *TP53* và gen *MDM2* ở bệnh nhân ung thư phổi và người bình thường.**
2. **Phân tích mối liên quan giữa một số đa hình gen *TP53* và gen *MDM2* với nguy cơ ung thư phổi.**

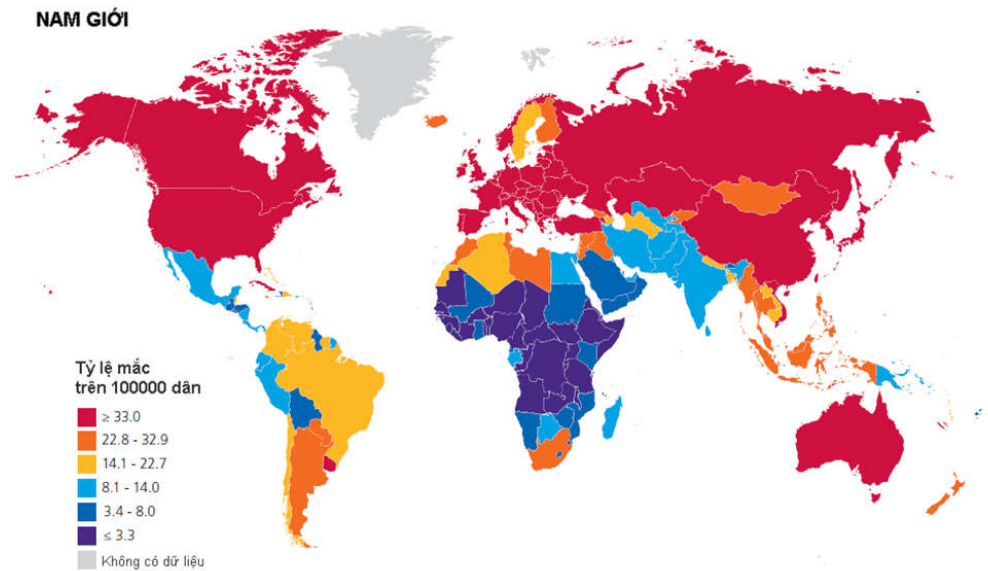
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Ung thư phổi

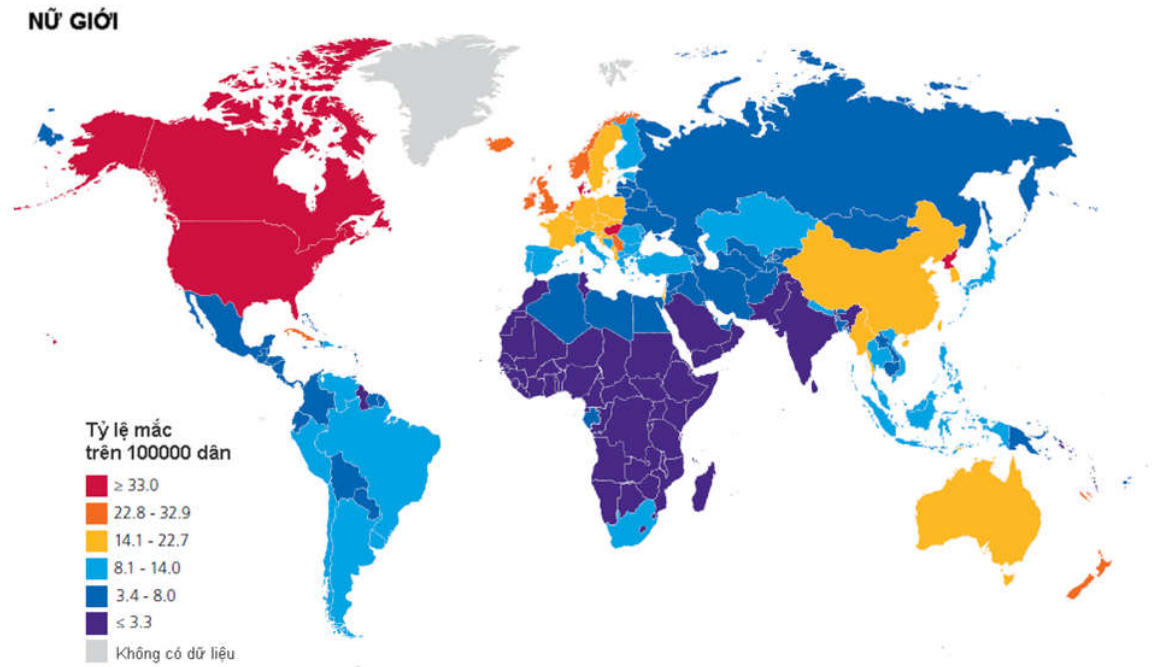
1.1.1. Dịch tễ học ung thư phổi

❖ Tình hình ung thư phổi trên thế giới

Những nghiên cứu dịch tễ học hiện nay ghi nhận, ung thư phổi là loại ung thư thường gặp nhất và có tỷ lệ tử vong cao nhất trong các loại hình ung thư. Theo số liệu thống kê tình hình ung thư trên toàn thế giới (Globocan 2012), ước tính thế giới có khoảng 1,82 triệu ca ung thư phổi mới mắc và khoảng 1,59 triệu ca tử vong do ung thư phổi [1]. Tại Hoa Kỳ, thống kê cập nhật năm 2016, ung thư phổi là loại ung thư có tỷ lệ tử vong cao nhất và tỷ lệ mới mắc đứng thứ hai ở cả hai giới. Ước tính năm 2016, Hoa Kỳ có khoảng 224.390 trường hợp ung thư phổi mới được phát hiện và khoảng 158.080 ca tử vong, chiếm đến 26,5% tổng số ca tử vong do ung thư [13].



Hình 1.1: Tỷ lệ mới mắc ung thư phổi ở nam giới chuẩn hóa theo tuổi (Global Cancer Facts & Figures 2012)



Hình 1.2: Tỷ lệ mới mắc ung thư phổi ở nữ giới chuẩn hóa theo tuổi
(*Global Cancer Facts & Figures 2012*)

Các thống kê cho thấy, ung thư phổi phổ biến hơn ở nam giới. Năm 2012, toàn thế giới ước tính có khoảng 1.241.600 ca ung thư phổi được phát hiện ở nam giới chiếm khoảng 68% tổng số ca ung thư phổi mới được phát hiện, tỷ lệ nam/nữ khoảng 2,1/1. Tại các nước đang phát triển, tỷ lệ nam/nữ là 2,4/1 trong khi tại các nước phát triển, tỷ lệ nam/nữ là 1,8/1. Số ca mới mắc ở nữ giới đứng thứ 3 trong các loại hình ung thư (sau ung thư vú và đại trực tràng) nhưng số ca tử vong chỉ đứng sau số ca tử vong do ung thư vú [1]. Theo thống kê của Hiệp hội ung thư Hoa Kỳ, năm 2007, ước tính có khoảng 114.760 ca ung thư phổi mới phát hiện ở nam giới và 98.620 ca ung thư phổi mới phát hiện ở nữ giới [14]. Thống kê gần đây nhất, năm 2016, số ca ung thư phổi mới phát hiện ở nam giới là 117.920 và ở nữ là 106.470 tại Hoa Kỳ [13]. Như vậy có thể thấy, trong khi ung thư phổi đang có chiều hướng giảm ở nam giới thì lại gia tăng nhanh chóng ở nữ giới tại các nước phát triển, đặc biệt là ở Hoa Kỳ tỷ lệ này đã xấp xỉ 1/1.

❖ *Tình hình ung thư phổi tại Việt Nam*

Hiện nay, chúng ta đã có những số liệu ghi nhận về ung thư tương đối chính xác và có thể đại diện cho tình hình ung thư của cả nước. Theo Globocan 2012, Việt Nam là quốc gia có số ca mới mắc ung thư phổi đứng hàng cao nhất trên thế giới ở nam giới với > 33 trường hợp/100.000 dân, đứng thứ 4 ở nữ giới với khoảng 8,1-14,0/100.000 dân [1].

Theo các ghi nhận ung thư mới nhất tại Việt Nam, sau 10 năm từ 2000 đến 2010, tỷ lệ mắc ung thư phổi ở nữ đã tăng hơn 200% (6,4/100.000 năm 2000 đến 13,9/100.000 dân năm 2010), ung thư phổi cũng là một trong 5 loại ung thư có tốc độ tăng nhanh nhất [15].

Tại Trung tâm Hô hấp- Bệnh viện Bạch Mai, số trường hợp ung thư phổi nhập viện tăng đều hàng năm: từ 1969 đến 1972 có 89 trường hợp ung thư phổi, từ 1974 đến 1978 có 186 trường hợp, từ 1981 đến 1985 có 285 trường hợp, từ 1996 đến 2000 có 639 trường hợp, chiếm 16,6% tổng số các bệnh nhân điều trị, đứng hàng thứ hai sau bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính [16].

Tóm lại, ung thư phổi là bệnh lý ác tính phổ biến nhất trong tất cả các loại ung thư trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Mặc dù đã có nhiều tiến bộ trong chẩn đoán và điều trị nhưng số tử vong do ung thư phổi giảm không đáng kể do đa số được chẩn đoán muộn.

1.1.2. Bệnh nguyên, bệnh sinh ung thư phổi

Sự phát sinh, phát triển ung thư nói chung và ung thư phổi nói riêng là một quá trình phức tạp diễn ra qua nhiều giai đoạn dưới sự tác động của các yếu tố nguy cơ (yếu tố môi trường, yếu tố cá thể) dẫn đến những biến đổi trong bộ gen của tế bào, từ đó làm các tế bào không ngừng tăng sinh, biệt hóa, xâm lấn, di căn.

❖ *Các yếu tố nguy cơ ung thư phổi*

Cho đến nay, người ta đã xác định được nhiều yếu tố nguy cơ gây ung thư phổi, trong đó yếu tố nguy cơ chính là hút thuốc lá.

- *Thuốc lá và ung thư phổi*

Hút thuốc lá là yếu tố nguy cơ chính gây ung thư phổi theo tất cả typ mô bệnh học trong đó liên quan mật thiết hơn với ung thư biểu mô vảy và ung thư tế bào nhỏ. Các tác dụng gây ung thư của khói thuốc lá đã được chứng minh từ những năm 1950 của thế kỷ trước và được công nhận bởi cơ quan quản lý y tế từ giữa những năm 1960 [17].

Thành phần của khói thuốc lá chứa khoảng 4.000 loại hoá chất trong đó khoảng hơn 60 chất gây ung thư đã được biết đến. Các phân tử quan trọng nhất liên quan đến sự phát triển của ung thư phổi là các PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons- các hợp chất có thể gây ung thư), trong đó chiếm đa số là các Hydrocarbon thơm như: 3- 4 Benzopyren, các dẫn xuất Hydrocarbon đa vòng có Nitơ, Aldehyd, Nitrosamin, Ceton và Polonium – một hạt α phát tia radon [18]. Khói thuốc có cả pha hơi có thể tạo ra các phân tử nhỏ hơn 0,1mm để vượt qua bộ lọc của thuốc lá và pha hạt. Nồng độ các gốc tự do được sinh ra là 10^{15} gốc tự do trong mỗi gam ở pha hơi và 10^{17} gốc tự do mỗi gam ở pha hạt [19]. Nicotin trong thuốc lá liên kết với các thụ thể acetylcholine ở màng tế bào gây kích hoạt các kênh canxi và các kênh ion khác. Nghiện nicotin là do biểu hiện thụ thể nicotin acetylcholine tăng lên khi phơi nhiễm lâu dài. Không có bằng chứng cho thấy nicotin gây ra khối u nhưng nó liên quan đến sự tiến triển của khối u hiện có, chủ yếu là u phổi, u đại tràng và ung thư dạ dày [19].

80- 85% các trường hợp được chẩn đoán ung thư phổi trên thế giới có hút thuốc lá. Mức độ tăng nguy cơ phụ thuộc vào: tuổi bắt đầu hút (hút càng sớm nguy cơ càng cao), số bao-năm (càng lớn nguy cơ càng cao), thời gian hút (thời gian hút càng dài

nguy cơ mắc bệnh càng lớn), nguy cơ ung thư phổi ở người hút thuốc lá cao gấp 10 – 20 lần so với người không hút thuốc. Nguy cơ mắc ung thư phổi tăng theo thời gian và số lượng thuốc hút nhưng thời gian có ảnh hưởng cao hơn: hút một gói thuốc lá mỗi ngày trong 40 năm nguy hiểm hơn hút hai gói mỗi ngày trong 20 năm. Bên cạnh việc hút thuốc lá chủ động, những người không trực tiếp hút thuốc lá nhưng thường xuyên tiếp xúc với người hút thuốc (hút thuốc lá thụ động) cũng có nguy cơ ung thư phổi rất cao [3], [2], [20]. Hút thuốc lá thụ động là một yếu tố khó đo lường và gây nhiều khi phân tích các kết quả nghiên cứu về ung thư phổi.

- *Các yếu tố nguy cơ khác*

Mặc dù hút thuốc lá là yếu tố nguy cơ hàng đầu gây ung thư phổi, vẫn có khoảng 15-20% những trường hợp ung thư phổi không có tiền sử hút thuốc lá được ghi nhận. Những yếu tố khác được xác định có nguy cơ gây ung thư phổi bao gồm: ô nhiễm không khí, các bức xạ ion hóa, phơi nhiễm nghề nghiệp, virus, chế độ ăn, tiền sử mắc các bệnh phế quản phổi [21], [22], [2], [23].

Bức xạ ion hóa: tiếp xúc với bức xạ ion hóa làm tăng nguy cơ ung thư phổi. Nguy cơ này đã được ghi nhận ở những người sống sót sau các vụ thả bom nguyên tử cũng như bệnh nhân được điều trị bằng xạ trị. Radon là một loại khí phóng xạ tự nhiên phát sinh từ sự phân hủy uranium trong đất và đá. Nghề nghiệp có tiếp xúc với các tia radon phóng xạ và các sản phẩm phân rã của nó phát ra hạt α là nguy cơ tăng ung thư phổi [24]. Hiện nay, mối quan tâm về ảnh hưởng của tia radon với nguy cơ ung thư phổi tập trung vào sự phơi nhiễm ở khu dân cư hơn là nghề nghiệp, phơi nhiễm radon trong nhà có thể là nguyên nhân quan trọng gây ung thư phổi. Cơ quan bảo vệ môi trường Hoa Kỳ ước tính đó là yếu tố nguy cơ quan trọng thứ 2 của ung thư phổi và là yếu tố nguy cơ hàng đầu trong số những người không hút thuốc lá [24]. Ngoài ra, những người có nghề nghiệp phơi nhiễm với các chất có khả năng gây

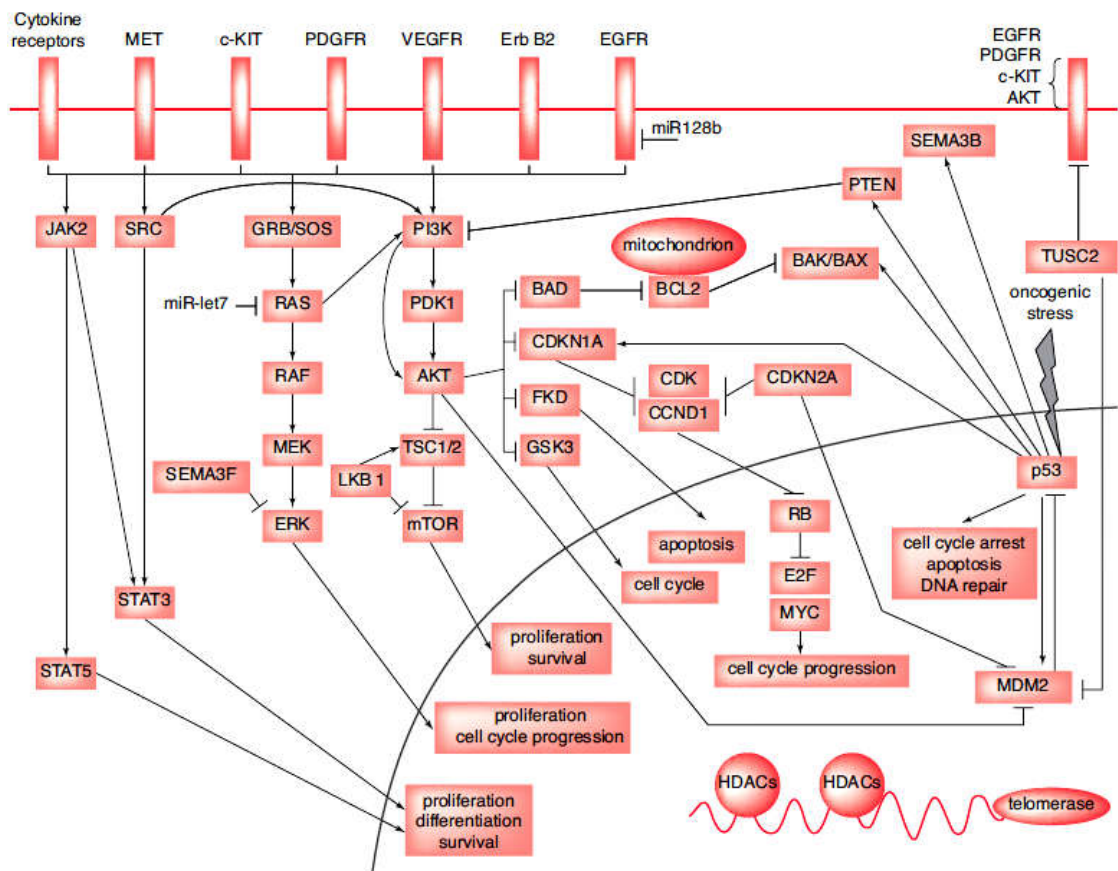
ung thư như amiăng, silic, kim loại nặng và hydrocarbon thơm đa vòng cũng tăng nguy cơ mắc ung thư phổi [24].

Yếu tố gen di truyền: Mỗi cá thể sẽ phản ứng lại với các điều kiện môi trường theo các cách thức khác nhau. Các số liệu thống kê cho thấy phần lớn các bệnh nhân ung thư phổi có hút thuốc lá, tuy nhiên chỉ có khoảng 15% người hút thuốc lá bị ung thư phổi. Các biến thể di truyền có thể đóng vai trò quan trọng trong cơ chế sống sót của cá thể khi đối diện với các yếu tố nguy cơ của bệnh tật [25]. Một số gia đình có tính nhạy cảm với bệnh lý ác tính. Những thành viên trong gia đình có người mắc ung thư phổi, đặc biệt mắc lúc trẻ sẽ có nguy cơ cao hơn những người không có yếu tố gia đình. Điều này có thể giải thích do được thừa hưởng các gen nhạy cảm khỏi u hoặc do cùng một điều kiện môi trường sống ảnh hưởng đến nguy cơ mắc bệnh [24].

Một số các yếu tố khác như chế độ ăn và uống rượu, bệnh viêm nhiễm mạn tính ở phổi, ô nhiễm môi trường cũng được cho là các yếu tố nguy cơ của ung thư phổi [24].

❖ *Cơ chế phân tử trong ung thư phổi*

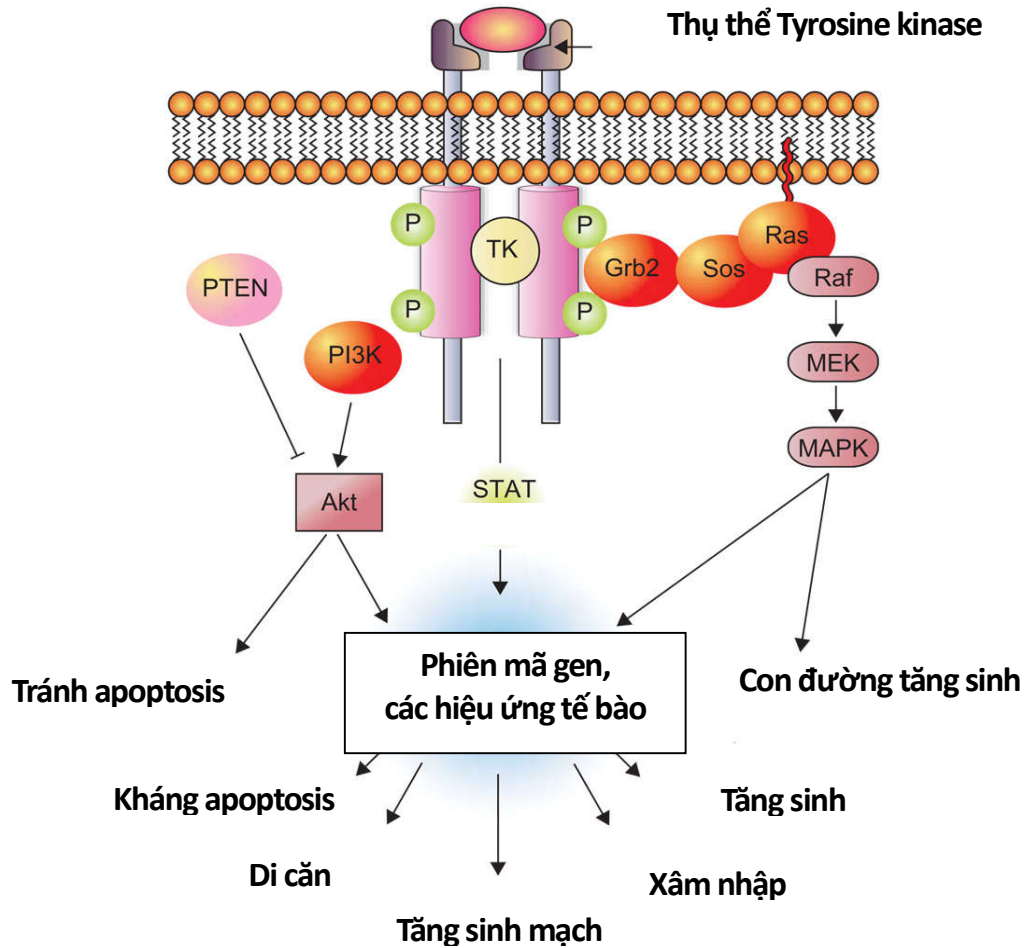
Các nghiên cứu ở cấp độ phân tử cho thấy, sự phát sinh, phát triển ung thư phổi diễn ra qua nhiều giai đoạn dưới tác động của các yếu tố nguy cơ, sự mất cảm gen và quá trình tích lũy đột biến xảy ra trên các gen gây ung thư (oncogene) và gen áp chế ung thư (tumor suppressor gene). Các cơ chế điều hòa gen vốn hoạt động nhịp nhàng và chặt chẽ, nhưng khi bị rối loạn sẽ dẫn tới sự tăng cường hay ức chế bất thường các gen chức năng (*hình 1.3*) [3], [2], [26], [27].



Hình 1.3: Các con đường tín hiệu phân tử trong bệnh sinh ung thư phổi [3]

(Theo Pass và cộng sự).

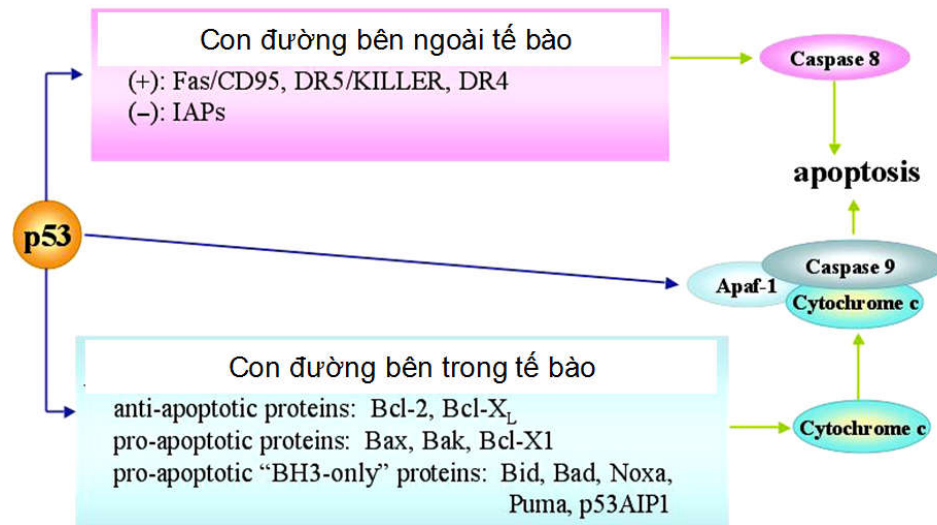
Bằng việc giải trình tự toàn bộ hệ gen của một dòng tế bào ung thư phổi, người ta đã phần nào giải thích được các con đường tín hiệu phân tử nội bào liên quan đến sự kích hoạt các gen sinh ung thư và bất hoạt các gen áp chế ung thư. Sự kích hoạt các gen sinh ung thư thông qua các con đường tín hiệu từ thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR) và một số thụ thể tyrosine kinase khác như MET, Her-2, c-KIT, IGF-1R và gần đây là dung hợp EML4-ALK. Tiếp đó các tín hiệu này sẽ hoạt hóa 1 loạt các con đường RAS/RAF/MEK/MAPK, PI3K/AKT và JAK/STAT dẫn đến tế bào không ngừng tăng sinh, biệt hóa, xâm lấn, di căn và kháng lại sự chết tế bào (apoptosis) (hình 1.3).



Hình 1.4: Con đường tín hiệu phát triển ung thư phổi thông qua RTKs [26]

Sự hoạt hóa các thụ thể tyrosine kinase (RTK) kích hoạt các con đường RAS/RAF/MEK/MAPK, PI3K/AKT và JAK/STAT dẫn đến tế bào không ngừng tăng sinh, biệt hóa, xâm lấn, di căn và kháng lại sự chết tế bào (*Theo Brambilla và cộng sự*).

Bên cạnh đó, một số đột biến của các gen áp chế ung thư cũng được phát hiện như đột biến gen *TP53*, *RBI*, *CDKN2A*, *FHIT*, *RASSF1A*, và *PTEN* trong đó phổ biến nhất là đột biến *TP53*, những đột biến này làm mất đi khả năng kiểm soát sự nhân lên của các tế bào, hậu quả là các tế bào không ngừng phân chia, phát triển thành ung thư (*hình 1.4*) [3], [26], [4].

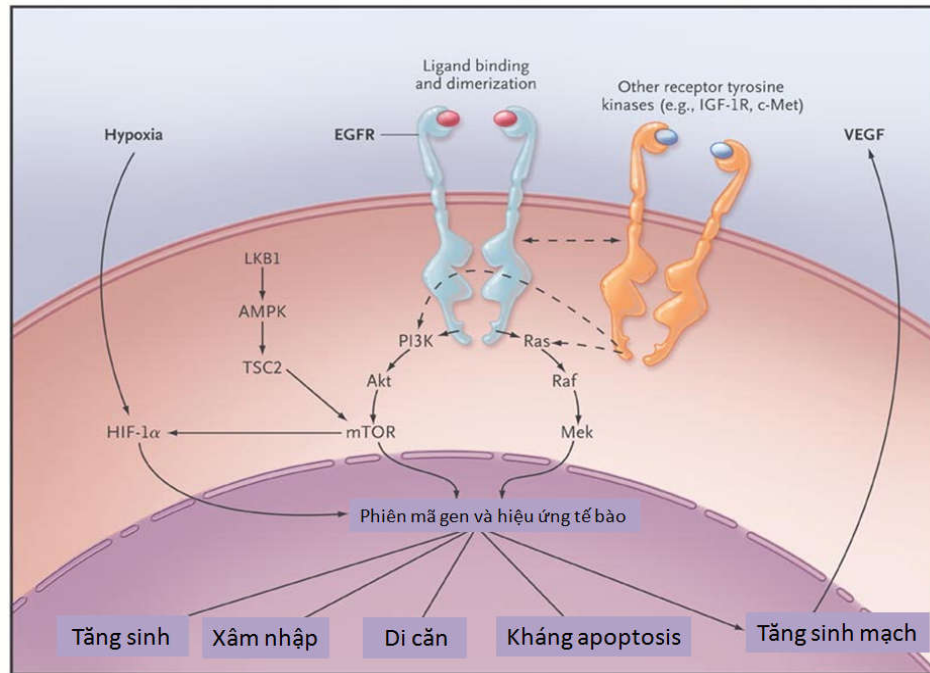


Hình 1.5: Các con đường gây apoptosis của gen TP53 [4]

Gen *TP53* gây apoptosis thông qua yếu tố Bax (Bcl-2-associated X protein), DR5/KILLER (death receptor 5), DRAL, Fas/CD95 (cell-death signaling receptor), PIG3 (p53-inducible gene 3), Puma (p53-upregulated modulator of apoptosis), PIDD (p53-induced protein with death domain), PERP (p53 apoptosis effector related to PMP-22), Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), Scotin, p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) và theo con đường bên trong tế bào hay con đường ty thể (Intrinsic pathway/mitochondrial pathway) và con đường bên ngoài tế bào hay con đường cái chết thụ thể (Extrinsic pathway/death receptor pathway). Ngoài ra, p53 có thể trực tiếp kích hoạt Apaf-1 (Theo Bai và cộng sự).

- **Một số đột biến kích hoạt các gen sinh ung thư**

Đột biến *EGFR*: Hoạt động của *EGFR* kích thích nhiều con đường tín hiệu nội bào phức tạp, vốn được điều hòa chặt chẽ bởi sự hiện diện của phối tử đặc hiệu. Ngay sau khi được hoạt hóa, vùng nội bào của *EGFR* sẽ tự phosphoryl hóa, khởi đầu một dòng thác tín hiệu lan tỏa khắp tế bào, gây kích hoạt sự tăng sinh mạch máu, di căn và ức chế quá trình chết theo chương trình, kích thích phân bào, và các con đường dẫn truyền tín hiệu phiên mã [28], [29], [30].



Hình 1.6: Các con đường hoạt hóa thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR)

Hoạt hóa *ERFR*-TK làm kích hoạt con đường các RAS/RAF/MEK và PI3K/AKT/mTOR dẫn đến tế bào không ngừng tăng sinh, xâm nhập, tăng sinh mạch, di căn và kháng lại sự chết tế bào (Theo Herbst và cộng sự [30]).

Trong tế bào bình thường, sự hoạt hóa của *EGFR* cần thiết cho nhiều chức năng quan trọng của tế bào như quá trình tăng sinh và biệt hóa tế bào. Tuy nhiên, sự hoạt hóa *EGFR* quá mức không phụ thuộc vào sự hiện diện của phối tử có thể dẫn đến sự tăng sinh bất thường cũng như sự chuyển dạng ác tính của tế bào. Có nhiều cơ chế dẫn đến sự hoạt động bất thường của *EGFR* như sự biểu hiện quá mức của thụ thể, sự khuếch đại của gen *EGFR* hoặc đột biến gen *EGFR*. Do giữ vị trí khởi nguồn của con đường tín hiệu tyrosin kinase trong các tế bào có nguồn gốc biểu mô nên *EGFR* đóng vai trò quan trọng trong sinh bệnh học của một số bệnh ung thư biểu mô của người, gồm có ung thư biểu mô tế bào vảy đầu cổ, UTPKTBN, ung thư đại trực tràng, ung thư tụy và ung thư vú. Ngoài ra, cũng do vị trí quan trọng này nên *EGFR* còn trở thành đích nhắm tiềm năng cho các thể hệ thuốc mới điều trị ung thư [29].

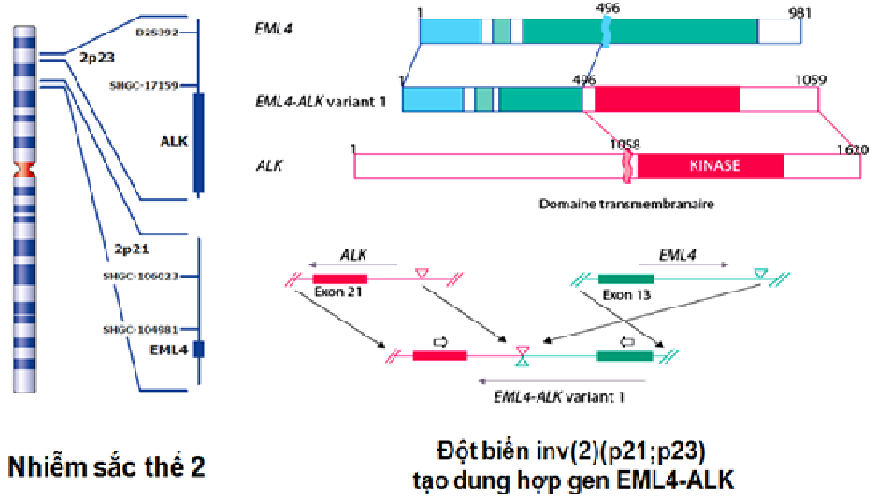
Đột biến gen *EGFR* xảy ra ở giai đoạn rất sớm và có tỷ lệ khá cao trong UTPKTBN. Tất cả các đột biến gây hoạt hóa *EGFR* đều thuộc vùng bám adenosine triphosphate (ATP) của thụ thể tyrosine kinase, cũng đồng thời là vị trí tương tác của các loại thuốc ức chế hoạt tính tyrosine kinase [31]. Đột biến gen *EGFR* thuộc bốn exon mã hóa vùng tyrosine kinase (exon 18- 21) có tác dụng tăng sự nhạy cảm của khối u hoặc giúp kháng lại thuốc ức chế *EGFR* tyrosine kinase. Những đột biến này được chia làm ba nhóm, trong đó các đột biến quyết định tính nhạy cảm của khối u với thuốc ức chế tyrosine kinase chủ yếu thuộc hai nhóm I và II [27].

- Nhóm I: gồm các đột biến mất đoạn nhỏ ở exon 19, phổ biến nhất là kiểu đột biến mất acid amin vị trí 747- leucine tới acid amin vị trí 749- acid glutamic (đột biến Δ LR759). Dạng đột biến này chiếm khoảng 45% tổng số các đột biến của gen *EGFR*.

- Nhóm II: gồm các đột biến thay thế một nucleotide làm thay đổi acid amin ở exon 18 và 21. Đột biến điển hình thường gặp nhất là đột biến ở exon 21 thay arginine bằng leucine tại codon 858 (đột biến L858R). Đột biến R858L chiếm 41% tổng số các đột biến gen *EGFR*. Một số đột biến khác thuộc nhóm II như đột biến gây thay thế glycine ở vị trí 719 (G719) thành serine, alanine hoặc cysteine chiếm khoảng 5%; một số đột biến vô nghĩa khác chiếm 3%.

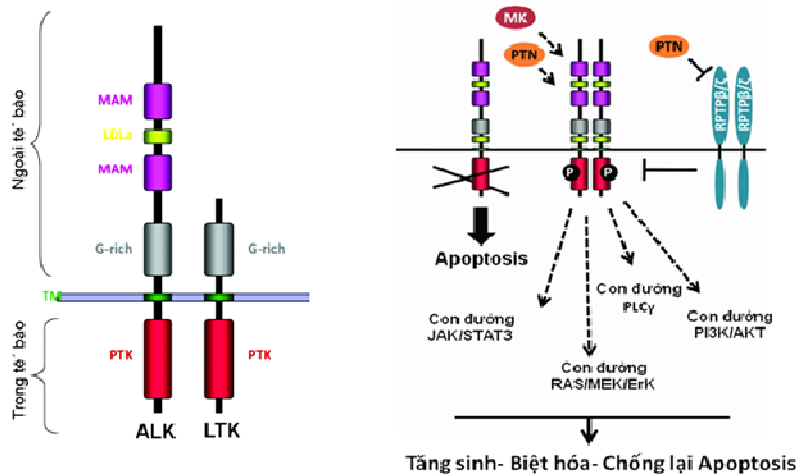
- Nhóm III: gồm các đột biến lặp đoạn và thêm đoạn tại exon 20 gen *EGFR*, những đột biến này chiếm khoảng 1% tổng số các đột biến gen *EGFR*.

Dung hợp gen *EML4-ALK*: Anaplastic lymphoma kinase (ALK) là một protein có hoạt tính kinase thuộc nhóm insulin receptor, phân họ receptor tyrosine kinases (RTKs) [32]. Dung hợp gen *EML4-ALK* phát sinh do xuất hiện một đảo đoạn trên cánh ngắn của NST số 2- inv(2)(p21;p23).



Hình 1.7: Dung hợp gen EML4-ALK do đảo đoạn trên NST 2 (Theo Soda và cộng sự [33])

Kể từ khi được mô tả lần đầu tiên, đã có nhiều biến thể khác nhau của dung hợp gen *EML4-ALK* được phát hiện. Các biến thể này mang phần exon 20 của gen *ALK* mã hóa Tyrosine kinases kết hợp với các exon khác của gen tổng hợp *EML4* (bao gồm các exon 2, 6, 13, 14, 15, 18 và 20) [33], [34].



Hình 1.8: Cấu tạo của ALK-TK và con đường hoạt hóa thụ thể ALK-TK [32]

Theo các nghiên cứu, dung hợp gen *EML4-ALK* xuất hiện trong khoảng 7% UTPKTBN (dao động trong khoảng 3-13% tùy theo nghiên cứu và

phương pháp phát hiện) [3], [2]. Khi nghiên cứu về cơ chế phân tử của *EML4-ALK* trong bệnh sinh ung thư phổi, các nhà khoa học đã đưa ra giả thuyết rằng phân tử này kích hoạt con đường RAS/MEK/ErK và PI3K/AKT, từ đó thúc đẩy quá trình tăng sinh tế bào và chống lại Apoptosis.

Khi nghiên cứu về các dấu hiệu lâm sàng ở những bệnh nhân ung thư phổi mang dung hợp gen *EML4-ALK*, người ta ghi nhận một số đặc tính nổi bật: độ tuổi khởi phát khá trẻ, thường không có tiền sử hút thuốc lá, có thể gặp ở cả hai giới và ung thư biểu mô tuyến phổ biến hơn các dạng tổn thương khác [35], [36], [37].

Đột biến KRAS: Trong UTPKTBN, *KRAS* là một trong những gen sinh ung thư (oncogene) bị đột biến chiếm tỷ lệ cao (khoảng 15-25%) với chủ yếu là dạng đột biến thay thế một nucleotid tại codon 12 và 13 [38]. Gen *KRAS* bị đột biến sẽ mã hóa những protein RAS mới có khả năng chống lại hoạt tính GTPase của GAPs. Do đó, những protein RAS đột biến này luôn luôn tồn tại ở trạng thái hoạt hóa RAS- GTP. Không giống như các protein RAS lành tính luôn bị bất hoạt sau một khoảng thời gian rất ngắn, các protein RAS đột biến có khả năng kích hoạt vĩnh viễn các con đường truyền tín hiệu nằm xuôi dòng (con đường MEK-ERK và con đường PI3K/AKT) bất kể có sự hoạt hóa của thụ thể EGFR hay không [39]. Đây chính là cơ sở ở mức độ phân tử giải thích việc các liệu pháp điều trị trúng đích cho EGFR trở nên vô tác dụng một khi gen *KRAS* bị đột biến, bởi lúc này protein RAS không còn bị phụ thuộc vào sự hoạt hóa từ EGFR [40].

Cho đến nay, có hơn 3000 đột biến điểm trên gen *KRAS* đã được công bố. Đột biến thường gặp nhất là đột biến thay thế nucleotid ở codon 12 (chiếm 82%) và codon 13 (chiếm 17%) ở exon 2 gen *KRAS* [40]. Đột biến gen *KRAS* không phát hiện trên bệnh nhân ung thư phổi thể tế bào nhỏ và xảy ra với tần suất khoảng 15-25% trên bệnh nhân UTPKTBN, trong đó chủ yếu ở

nhóm ung thư biểu mô tuyến hơn là ung thư biểu mô vảy. Khác với đột biến gen *EGFR* thường được phát hiện ở người châu Á và không hút thuốc lá (hút dưới 100 bao trong suốt cuộc đời), đột biến gen *KRAS* lại xảy ra phổ biến ở người da trắng và hút thuốc lá lâu năm [41].

Đột biến gen *BRAF*: gen *BRAF* mã hóa một protein kinase serine/threonine, loại protein hoạt động hạ nguồn của *KRAS* và kích hoạt con đường tín hiệu mitogen-activated protein kinase (MAPK) quy định sự tồn tại và tăng sinh của tế bào. Các đột biến *BRAF* phổ biến là V600E là (50%), G469A (39%), và D594G (11%), tương ứng trên exon 15, 11, và 15. Đột biến gen *BRAF* hiện diện ở khoảng 1-3% ung thư phổi loại biểu mô tuyến và bệnh nhân thường hút thuốc lá nhiều năm [42].

Gen *ROS1* được coi như tiền gen ung thư (proto-oncogene) nằm ở nhánh dài nhiễm sắc thể số 6, mã hoá cho thụ thể xuyên màng có hoạt tính tyrosin kinase thuộc họ thụ thể của insulin. Dung hợp gen *ROS1* được coi như là gen gây UTPKTBN với các gen dung hợp cùng *ROS1* đã được phát hiện như CD74, SLC34A2/NaPi2b và FIG. Dung hợp gen *ROS1* gặp khoảng 2% trong UTPKTBN ở người trẻ tuổi, không hút thuốc lá và UTBM tuyến, tương tự như nhóm người UTPKTBN có dung hợp gen *ALK* [3].

Gen *RET* nằm ở nhánh dài của nhiễm sắc thể số 10 cũng là một gen tiền ung thư mã hoá cho một thụ thể có hoạt tính tyrosin kinase tham gia vào sự phát triển của mào thần kinh. Sự sắp xếp lại của gen *RET* là kết quả của sự dung hợp với một số những gen khác đã được tìm thấy trong UTPKTBN như KIF5B-*RET* (loại phổ biến nhất), CCDC6-*RET* (*PTC1*), NCOA4-*RET* (*PTC3*) và TRIM33-*RET2*. Dung hợp gen *RET* thường gặp ở người trẻ, không hút thuốc, ung thư biểu mô tuyến, không kèm theo những đột biến điều khiển khác [3].

Gen *MAP2K1* mã hóa protein MEK1, phân tử hạ nguồn của BRAF trong con đường tín hiệu MAP, là chất điều hòa trung tâm của sự tăng sinh tế bào. Đột biến MEK1 có tần suất khoảng 1% các trường hợp UTPKTBN [43].

Gen *MET* mã hóa cho protein MET đóng vai trò là thụ thể bề mặt nhận tín hiệu từ phối tử HGF. Thông qua hoạt tính tyrosine kinase, MET gây phosphoryl hóa phân tử ERBB3, duy trì sự hoạt hóa con đường tín hiệu PI3K/Akt làm kích hoạt các quá trình xâm lấn, di căn và sinh mạch của khối u. Lúc này thay vì phụ thuộc vào EGFR, nguồn tín hiệu sinh trưởng của tế bào ung thư lại đến từ MET và các con đường xuôi dòng của MET [44].

- **Đột biến bất hoạt các gen áp chế ung thư**

Đột biến gen *TP53*: Đột biến gen *TP53* là một trong những bất thường quan trọng nhất được ghi nhận ở bệnh nhân ung thư phổi, bất thường này được tìm thấy trong 90% bệnh nhân ung thư phổi tế bào nhỏ và khoảng 65% UTPKTBN. Các đột biến trong *TP53* đã được tìm thấy trên toàn bộ vùng mã hóa và hoạt động áp chế khối u bị mất bởi các cơ chế khác nhau tùy thuộc vào loại đột biến. Theo tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế, hiện có hơn 7000 đột biến chỉ ở vùng mã hóa của gen *TP53* với >70% là các đột biến sai nghĩa. Đa số các đột biến nằm ở vùng gắn DNA (ở vị trí các cặp base: 102-292) với 6 đột biến điểm thường gặp (R175, G245, R249, R273, R282) chiếm gần 30% tất cả các đột biến. Các đột biến này làm gián đoạn vai trò áp chế khối u bằng cách ảnh hưởng đến cấu trúc bậc 3 của protein p53 (R175, G245, R249, R282) hoặc cản trở sự gắn với DNA (R248, R273) [45], [46]. Ngoài ra, nhiều đột biến *TP53* hiện nay được biết có các đặc tính gây ung thư cho phép thúc đẩy sự xâm lấn, di căn, tăng sinh và sự sống sót của tế bào [47], [48]. Ở UTPKTBN, các đột biến *TP53* thường liên kết với tiền sử hút thuốc lá hoặc phơi nhiễm khói bụi nghề nghiệp. Các đột biến gen *TP53* có thể độc lập hoặc kết hợp cùng với các đột biến oncogen khác như KRAS, EGFR [49].

Đột biến PTEN: Gen PTEN nằm trên NST 10 mã hóa cho một lipid và protein ức chế con đường tín hiệu PI3K/AKT/mTOR bởi sự khử phosphoryl hóa PI-(3,4,5)-triphosphate. Bất hoạt các chức năng gen PTEN dẫn tới sự hoạt hóa không kiểm soát của AKT/protein kinase B mà không phụ thuộc vào sự gắn kết với phối tử. Các đột biến của PTEN là hiếm, chỉ gặp ở khoảng 5% UTPKTBN, phổ biến hơn ở ung thư phổi tế bào vảy hơn là ung thư biểu mô tuyến và bệnh nhân thường có tiền sử hút thuốc lá [50].

Đột biến LKB1: LKB1 (còn được gọi là STK11) là gen áp chế ung thư nằm trên nhiễm sắc thể 19p13 mã hóa một kinase serine-threonine ức chế mTOR. Trong ung thư phổi, LKB1 có thể bị bất hoạt bởi một loạt các đột biến soma hoặc đột biến xóa đoạn. Đột biến LKB1 được ghi nhận ở khoảng 11-30% ung thư biểu mô tuyến, là loại đột biến phổ biến thứ 3 trong ung thư biểu mô tuyến sau p53 và KRAS. Đột biến này được ghi nhận nhiều hơn ở nam giới, hút thuốc và có thể liên kết với đột biến KRAS [50].

1.1.3. Chẩn đoán ung thư phổi

Phổi là cơ quan nằm sâu trong lồng ngực, các triệu chứng thường xuất hiện muộn và không đặc hiệu. Vì vậy, nhiều BN dù không có biểu hiện lâm sàng đặc biệt nhưng bệnh đã ở giai đoạn muộn, có di căn. Các biểu hiện lâm sàng có thể gặp là ho khan, ho ra máu, đau ngực, đôi khi khó thở; hoặc các biểu hiện toàn thân như gầy sút cân, sốt kéo dài; hay các dấu hiệu của các cơ quan di căn như đau đầu, đau nhức xương...[31], [51].

Chụp XQ phổi và đặc biệt là chụp CLVT lồng ngực có tiêm thuốc cản quang cho phép xác định vị trí, kích thước, số lượng, mức độ xâm lấn và di căn sang một số vùng lân cận của ung thư. Tuy nhiên cả hai phương pháp này đều không cho phép chẩn đoán phân biệt u lành với u ác [31], [51], [52].

PET Scan và PET-CT là hai phương pháp chẩn đoán hình ảnh dựa trên hoạt tính sinh học của tế bào ung thư. Các tế bào ung thư phổi có khả năng hấp thu chuyển hoá glucose cao hơn các tế bào bình thường, do đó người ta sử dụng glucose có đánh dấu phóng xạ sau đó ghi lại hình ảnh bằng các máy quét PET để phát hiện sự tích lũy bất thường các chất phóng xạ. Kỹ thuật cho phép đánh giá được mức độ ác tính của khối u một cách tương đối thông qua độ bắt xạ, hơn nữa kỹ thuật cũng cho phép phát hiện được các di căn của ung thư [31], [51], [52]. Tuy nhiên, hiện nay chi phí cho PET Scan và PET-CT còn khá cao nên phạm vi ứng dụng trên lâm sàng còn hạn chế, đặc biệt ở những nước đang phát triển như Việt Nam.

Mô bệnh học là tiêu chuẩn vàng để chuẩn đoán xác định ung thư. Vì vậy, khi nghi ngờ ung thư phổi, các bệnh nhân cần phải làm các thăm dò xâm nhập để chẩn đoán mô bệnh. Các kỹ thuật thông thường là sinh thiết qua nội soi phế quản, sinh thiết phổi xuyên thành ngực dưới hướng dẫn của siêu âm, XQ hoặc CLVT. Đôi khi, người ta có thể sinh thiết các tổn thương di căn của ung thư như hạch ngoại vi, gan hoặc xương. Tổn thương mô bệnh học ung thư phổi rất đa dạng với nhiều type và subtype khác nhau, tuy nhiên trên lâm sàng người ta có thể chia thành hai nhóm lớn là ung thư phổi không tế bào nhỏ và ung thư phổi tế bào nhỏ. Việc xác định chính xác dạng tổn thương mô bệnh sẽ giúp các nhà lâm sàng quyết định lựa chọn phương pháp điều trị phù hợp nhất.

1.1.4. Điều trị ung thư phổi

Mặc dù trong nhiều năm qua, các nhà y sinh học, phổi học và ung thư học đã nỗ lực nghiên cứu về bệnh nguyên, bệnh sinh của ung thư phổi. Tuy nhiên, việc điều trị ung thư phổi cho đến nay vẫn còn rất nhiều khó khăn, kết quả điều trị phụ thuộc rất nhiều vào loại tổn thương mô bệnh học và giai đoạn bệnh khi phát hiện.

Trên lâm sàng, ung thư phổi được chia làm 2 nhóm lớn là ung thư phổi không tế bào nhỏ và ung thư phổi tế bào nhỏ. Nhìn chung, ung thư phổi tế bào nhỏ chiếm khoảng 20% và ung thư phổi không tế bào nhỏ chiếm khoảng 80% ung thư phổi. Ung thư phổi tế bào nhỏ thường tiến triển rất nhanh, tiên lượng rất hạn chế và chỉ định điều trị hóa chất là bắt buộc. Với ung thư phổi không tế bào nhỏ, lựa chọn phương pháp điều trị phụ thuộc vào giai đoạn của bệnh. Phẫu thuật được xem là phương pháp điều trị hiệu quả nhất cho những trường hợp ung thư phổi giai đoạn khu trú, khi bệnh ở giai đoạn lan rộng hoặc di căn xa thì hóa trị và xạ trị sẽ được lựa chọn [2], [3].

Gần đây, khi người ta hiểu sâu hơn về các cơ chế phân tử trong bệnh sinh ung thư phổi, một phương pháp điều trị mới nhắm tới các đích phân tử đã được áp dụng. Người ta có thể sử dụng các kháng thể đơn dòng bất hoạt các protein đóng vai trò mắt xích trong các con đường tín hiệu nội bào trong bệnh sinh ung thư hoặc có thể sửa chữa những gen bị đột biến nhờ công nghệ chuyển gen thông qua các virus [2], [3], [28], [53]. Với những tiến bộ đó, chúng ta hy vọng sẽ mang lại nhiều thành công trên con đường chống lại căn bệnh hiểm nghèo này.

1.2. Tổng quan về SNP

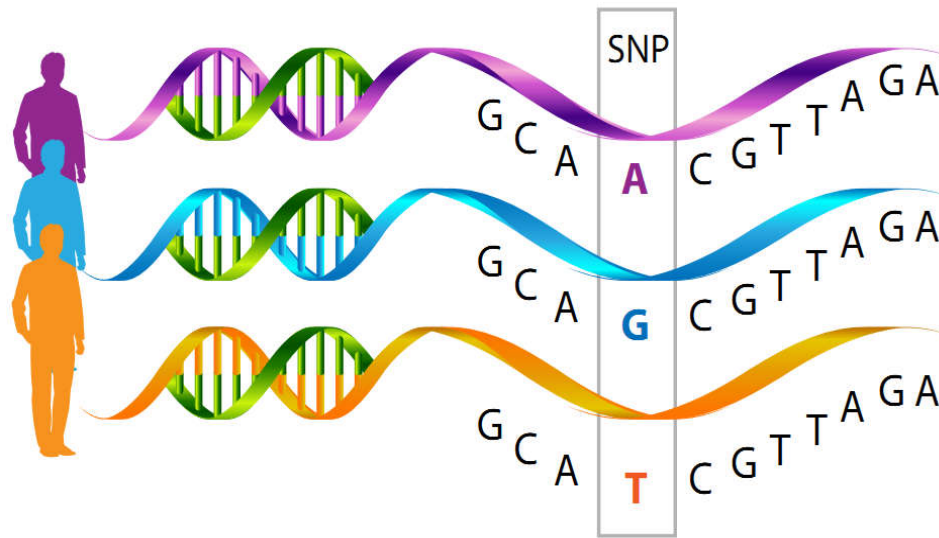
1.2.1. Định nghĩa SNP

Theo Viện sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ (NIH), single nucleotid polymorphisms, thường được gọi là SNPs (phát âm là "Snips"), là loại biến đổi di truyền phổ biến nhất của người. Mỗi SNP đại diện cho một sự khác biệt chỉ ở một đơn vị cấu tạo duy nhất của DNA là nucleotid. Ví dụ, một SNP có thể có sự thay thế nucleotid cytosin (C) với thymin (T) trong một đoạn nào đó của DNA (*Hình 1.9*).

Sự xuất hiện của SNPs là hiện tượng phổ biến trong toàn bộ chuỗi DNA của một người. Nguyên nhân hình thành nên các SNPs có thể do tác động của

chọn lọc tự nhiên, hệ gen của người tự biến đổi và sửa chữa để thích nghi với môi trường sống. Qua quá trình tiến hóa và chọn lọc, những biến thể có khả năng thích nghi sẽ xuất hiện với tần số ổn định trong một quần thể nào đó. Tập hợp các điểm đa hình trên một gen được gọi là tính đa hình của gen. Tuy nhiên không phải tất cả sự biến đổi nucleotid đơn đều là SNP. Để được xếp loại là SNP, sự thay đổi một nucleotid phải được xuất hiện với tần suất từ 1% trở lên trong quần thể. Với tần suất trung bình mỗi 300 nucleotid xuất hiện 1 SNP, bộ gen con người với 3 tỉ nucleotid sẽ có khoảng 10 triệu SNP [54]. Những biến thể này thường được tìm thấy trong đoạn DNA giữa các gen, ở vùng không mã hoá do đó SNPs ít ảnh hưởng đến chức năng của protein hay làm thay đổi kiểu hình. Tuy nhiên, đây có thể là những dấu ấn sinh học giúp các nhà khoa học xác định vị trí các gen có liên quan với bệnh. Khi SNPs xuất hiện trong một gen hoặc tại khu vực điều khiển của gen, nó có thể ảnh hưởng đến chức năng của gen, dẫn đến có vai trò đối với một bệnh lý cụ thể liên quan đến gen đó.

Hầu hết các SNPs không có ảnh hưởng đến sức khỏe hoặc sự phát triển của cơ thể. Bên cạnh đó, một số SNPs đã được chứng minh có vai trò quan trọng trong việc nghiên cứu sức khỏe con người. Nhiều nghiên cứu đã tìm thấy SNPs có thể giúp dự đoán phản ứng của một cá nhân với các loại thuốc nhất định, sự nhạy cảm với các yếu tố môi trường như độc tố và nguy cơ phát triển một bệnh cụ thể. SNPs cũng có thể được sử dụng để theo dõi sự di truyền gen bệnh trong gia đình. Hướng nghiên cứu mới của nền y học hiện nay là xác định mối liên quan của SNPs với các bệnh lý phức tạp như bệnh tim, tiểu đường và ung thư từ đó hướng tới phát triển nền y học cá thể hoá trong điều trị.



Hình 1.9: Hiện tượng đa hình nucleotid đơn

Sự thay thế một nucleotid trong phân tử DNA có thể tạo nên những kiểu hình khác nhau trong quần thể (Nguồn: <http://molecularbiologynews.org>)

1.2.2. Các loại SNPs

Dựa vào vị trí, SNPs được phân chia thành 2 loại chính [54]:

- SNPs liên kết (còn gọi là SNPs chỉ thị) không nằm trong gen và không ảnh hưởng đến chức năng tổng hợp protein của gen. Mặc dù vậy, SNPs được phát hiện thường nằm gần gen liên quan đến một bệnh nào đó nên có thể sử dụng SNPs như dấu hiệu sinh học để xác định bệnh hoặc gen bệnh.
- SNPs nằm trong gen là nguyên nhân ảnh hưởng đến chức năng của protein, liên quan đến bệnh hay ảnh hưởng đến sự đáp ứng với thuốc điều trị, bao gồm:
 - + SNPs mã hoá nằm trên vùng mã hoá của gen dẫn đến sự thay đổi acid amin của protein do gen đó mã hoá.
 - + SNPs không mã hóa nằm trong vùng điều hoà của gen có thể dẫn đến thay đổi mức độ biểu hiện gen thông qua mức độ RNA và protein.

1.2.3. Vai trò và ứng dụng của SNPs trong Y học

Các biến thể trong trình tự DNA của con người có thể ảnh hưởng đến cách cơ

thể phát triển bệnh, cách cơ thể đáp ứng với các tác nhân gây bệnh, các hóa chất, thuốc, vaccin và các loại tác nhân khác. Các SNP được cho là chìa khóa tiềm năng trong việc thực hiện y học cá thể hoá. Vai trò quan trọng nhất của các SNP trong các nghiên cứu y học là sử dụng để so sánh các vùng của hệ gen giữa các nhóm người (có thể là giữa bệnh nhân và người khỏe mạnh) trong các nghiên cứu ở mức toàn bộ hệ gen (genome-wide association studies - GWAS). Một SNP đơn có thể là nguyên nhân gây ra một bệnh di truyền. Đối với các bệnh phức tạp, các SNP thường không hoạt động đơn lẻ mà chúng hoạt động trong một sự kết hợp với các SNP khác và tương tác với điều kiện môi trường để biểu hiện một tình trạng bệnh lý như ung thư. Phát hiện gần đây về các SNP trong các nghiên cứu so sánh ở mức toàn bộ hệ gen (GWAS) tạo ra một điều kiện thuận lợi hơn rất nhiều không chỉ cho quá trình phát hiện các biến thể di truyền và bệnh di truyền mà còn phát triển nghiên cứu nhằm tìm ra cách phòng ngừa và chữa bệnh trong tương lai. Trên thực tế, mỗi người có những đặc điểm riêng và rất phức tạp được quy định bởi nhiều yếu tố trong đó có vai trò của các SNPs. Nhiều SNP đã được sử dụng như chỉ thị giúp cho việc lập bản đồ gen liên quan đến bệnh hoặc một đặc điểm đặc trưng nào đó. Là kiểu đa hình phổ biến nhất, ước tính chiếm 80% sự biến đổi trong hệ gen người, các đa hình SNP nắm giữ chìa khóa phân tử quan trọng nhất đối với cơ thể sống.

Như vậy, SNPs có thể có nhiều chức năng tùy thuộc vị trí của nó trong bộ gen cũng như những thay đổi do SNPs gây ra. Câu hỏi đặt ra liệu SNPs là yếu tố thúc đẩy quá trình ác tính hoá hay là một phần trong sự biến đổi ác tính của tế bào hoặc chỉ là một sự trùng hợp ngẫu nhiên. Để trả lời được câu hỏi trên cần nhiều nghiên cứu đi sâu vào tìm hiểu mối liên quan giữa SNPs với bệnh tật trong đó có ung thư để có những hiểu biết toàn diện góp phần dự phòng, điều trị và tiên lượng bệnh hiệu quả.

1.2.4. SNPs và ung thư phổi

Các nghiên cứu về SNPs và ung thư thường theo 2 hướng chính: (a) sự nhạy cảm với bệnh, (b) kết quả điều trị bệnh như thời gian sống thêm, các biến chứng hay

đáp ứng với thuốc điều trị. Các nghiên cứu thường tập trung vào các SNPs của các gen liên quan đến các cơ chế ung thư như các oncogene hay gen áp chế ung thư, hoặc các quá trình sinh học như các gen quy định các enzyme sửa chữa DNA hay chuyển hoá xenobiotic.

(a). Sự nhạy cảm với ung thư: ung thư là hậu quả của một quá trình phức tạp bao gồm nhiều giai đoạn dưới tác động của các yếu tố nguy cơ, sự mất cảm gen và sự tích lũy các đột biến gen. Nhiều nghiên cứu về ung thư phổi đã khảo sát các gen quan trọng trong quá trình chuyển hoá khói thuốc lá và nghiện nicotin. Các nghiên cứu tập trung xác định tương tác giữa yếu tố nguy cơ cao của bệnh và kiểu gen nhạy cảm hay bảo vệ cơ thể. Khi đó, tương tác giữa kiểu gen và yếu tố nguy cơ có vai trò như một stress ảnh hưởng đến sự biểu hiện kiểu hình của các SNP nguyên nhân. Ví dụ, gen myeloperoxidase (MPO) đã được nghiên cứu rộng rãi trong các nghiên cứu với người da trắng. Sự biến đổi nucleotid từ G thành A ở vị trí 463 của promoter gần dẫn đến giảm biểu hiện mRNA MPO. Người mang kiểu gen đồng hợp tử AA có nguy cơ thấp hơn đáng kể cho sự phát triển ung thư phổi so với những người có đồng hợp tử GG [55].

(b). Đáp ứng với điều trị: Biến thể di truyền có thể ảnh hưởng đến kết quả điều trị, do đó sẽ giúp ích cho các bác sỹ đưa ra quyết định lâm sàng. Ví dụ như trong nghiên cứu độc tính của thuốc điều trị UTPKTBN, Ling Zhang và cộng sự năm 2012 đã nghiên cứu mối liên quan giữa tính đa hình của các gen trong con đường sửa chữa cắt bỏ nucleotid (nucleotid-excision repair - NER) với khả năng dung nạp hoá trị của bệnh nhân. Kết quả cho thấy một số mối liên quan như: MMS19L (methyl methanesulfonate sensitivity gene 19) có thể liên quan với các tác dụng phụ của hóa trị liệu trong UTPKTBN như giảm bạch cầu ($p = 0,020$), vàng da ($p = 0,037$) và tăng creatinine ($p = 0,013$). MMS19L có liên quan với các tác dụng phụ trên ($p = 0,024$) và giảm tiểu cầu ($p = 0,035$). RRM1 ngoài các tác dụng phụ trên ($p = 0,047$) còn liên quan đến triệu chứng nôn ($p = 0,046$). ERCC5 (excision repair cross-

complementation nhóm 5) có liên quan chủ yếu với nhiễm trùng ($p = 0,017$). Như vậy, các tác giả đã ghi nhận một số SNPs của các gen trong con đường NER có liên quan với độc tính của hóa trị liệu kép ở những bệnh nhân UTPKTBN, đặc biệt là SNPs của MMS19L, RRM1 và ERCC5 [56].

1.3. Gen *TP53* và gen *MDM2*

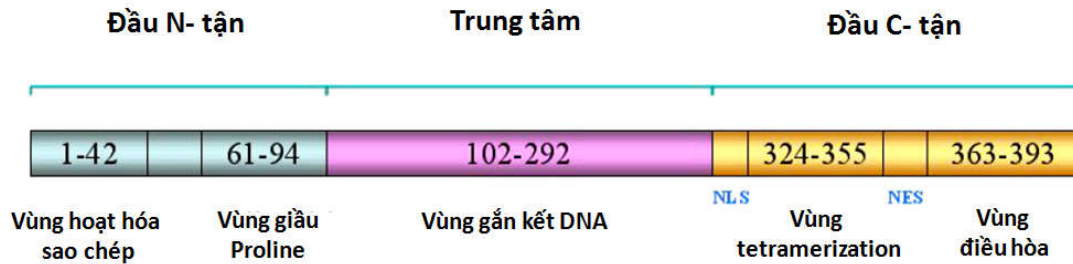
1.3.1. Gen *TP53*

❖ Cấu trúc phân tử

Gen *TP53* nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể số 17 (17p13.1), dài 20kb bao gồm 11 exon (từ E1 đến E11, trong đó E1 không mã hóa) và 10 intron. Gen *TP53* mã hóa cho protein p53 người là một phosphoprotein có trọng lượng phân tử 53 kDa bao gồm 393 acid amin với 3 vùng chức năng khác nhau [4]:

- Vùng hoạt hóa N tận (NH₂-terminal acidic transactivation domain) bao gồm:
 - + Vùng amin tận (1-42): vùng này cần thiết cho hoạt động sao chép và tương tác với MDM2.
 - + Vùng giàu prolin (61-94): liên quan đến chức năng pro-apoptosis và có vai trò điều hòa hoạt động gen p53. Khi vùng này bị xóa bỏ sẽ dẫn đến mất hoàn toàn chức năng pro-apoptosis của gen p53.
- Vùng gắn kết DNA (DNA binding domain) gồm các acid amin từ 102-292 và gắn kết các DNA có trình tự đặc biệt.
- Vùng C tận (COOH-terminal oligomerization domain OD) bao gồm:
 - + Vùng tetramerization (324-355) tạo cấu trúc bậc 4 của p53.
 - + Vùng điều hòa nhóm carboxyl tận (363-393) có vai trò điều hòa xuôi dòng sự gắn kết DNA với vùng trung tâm và liên quan đến apoptosis. Nếu sự tương tác giữa vùng C tận và vùng gắn DNA bị phá vỡ thì vùng gắn DNA tổn thương sẽ hoạt hóa và gây tăng quá trình phiên mã.

Ngoài 3 vùng chức năng điển hình, protein p53 còn có vài vùng đặc trưng cần thiết cho hoạt động của p53 như NLS (Nuclear Localization Signals), NES (Nuclear Export Signal) giàu Leucin.



Hình 1.10: Cấu trúc phân tử protein p53

(Theo Bai và cộng sự [4])

❖ *Vai trò của gen TP53 trong bệnh sinh ung thư*

Gen *TP53* có vai trò quan trọng trong sửa chữa DNA, kiểm soát chu kỳ tế bào và apoptosis. Sự khiếm khuyết gen *TP53* cho phép sự tăng sinh tế bào bất thường và dẫn đến hình thành ung thư. Khi cơ thể bị tác động bởi các kích thích (tổn thương DNA, stress tế bào, thiếu oxy, sự biểu hiện quá mức oncogen), p53 sẽ được hoạt hóa gây dừng chu kỳ phân bào cho đến khi DNA được sửa chữa hoặc gây apoptosis nếu DNA tổn thương không sửa chữa được. Vì vậy, p53 được xem như trạm gác của bộ gen tế bào (guardian genome). Ngoài ra, p53 còn có khả năng hoạt hóa hoặc ức chế một số gen khác [4], [57], [58].

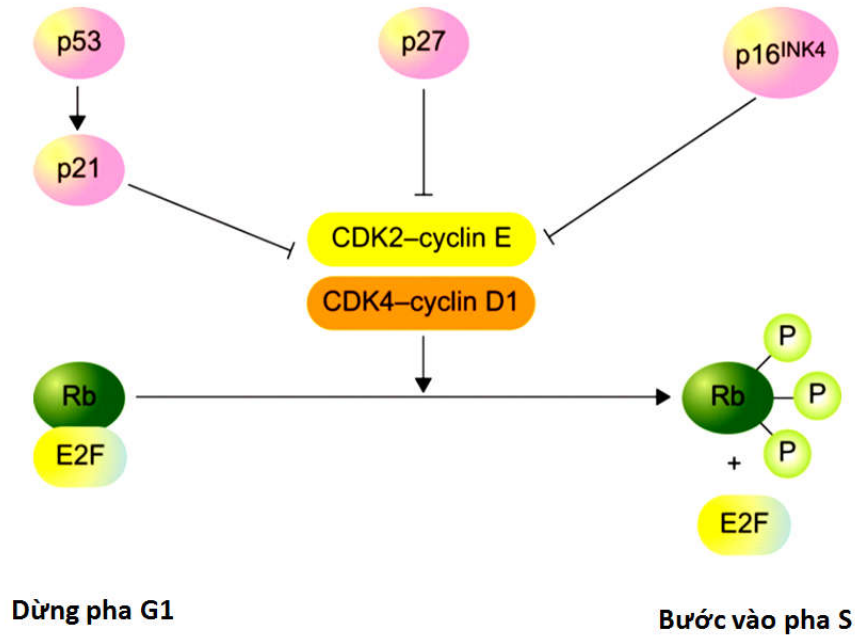
- *Vai trò kiểm soát chu kỳ tế bào*

Gen *TP53* có thể gây dừng chu kỳ tế bào ở pha G1/S và G2/M bằng cách tác động đến các gen kiểm soát chu kỳ phân chia tế bào như GADD 45, p21 và 14-3-3δ. Sự dừng chu kỳ tế bào giúp tế bào có thời gian sửa chữa tổn thương DNA trước khi bước vào giai đoạn quan trọng của sự tổng hợp DNA và nguyên phân. Chu kỳ tế bào bước vào pha S cần enzyme cdk2 và vào pha M cần cdc2. Enzyme cdk2 có thể bị ức chế bởi p21 và cdc2 có thể bị ức chế bởi p21, GADD45, 14-3-3δ.

Khi DNA bị tổn thương, p53 gây tăng phiên mã p21. p21 có 2 vùng gắn với

p53 là p21-WAF1 và p21-CIP1. Protein p21-CIP1 gây bất hoạt phức hợp cyclinE-CDK2, p21-WAF1 gây bất hoạt phức hợp CyclinD1-CDK4. Các phức hợp CDK bất hoạt không có khả năng phosphoryl hóa pRB và pRB không phosphoryl hóa là dạng kích hoạt, sẽ gắn vào E2F. E2F (transcription factor induces cyclin E gene) có tác dụng kích hoạt một loạt các gen như myc, myb tham gia vào sự nhân lên của DNA trong pha S. Sự hình thành phức hợp pRB-E2F trực tiếp ngăn cản chu trình tế bào từ pha G1 chuyển vào pha S và kết quả là chu trình phân bào bị dừng ở pha G1 cho đến khi DNA tổn thương được sửa chữa (Hình 1.13).

Gen *TP53* gây tăng phiên mã GADD 45. GADD 45 gắn vào CDC2, ngăn cản sự hình thành phức hợp cyclin B/CDC2 và ức chế hoạt động của enzym kinase. Đồng thời GADD 45 cũng tác dụng trực tiếp lên sự nhân đôi DNA trong pha S bằng cách gắn với PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) và chiếm chỗ của DNA polymerase. Protein 14-3-3 δ sẽ loại bỏ cyclin B/CDC2 khỏi nhân để phân tách cyclin B/CDC2 ra khỏi protein đích của nó. Sự biểu hiện quá mức của 14-3-3 δ gây ngừng chu kỳ tế bào ở pha G2 [4], [58].



Hình 1.11: Cơ chế kiểm soát chu kỳ tế bào của p53 qua trung gian p21

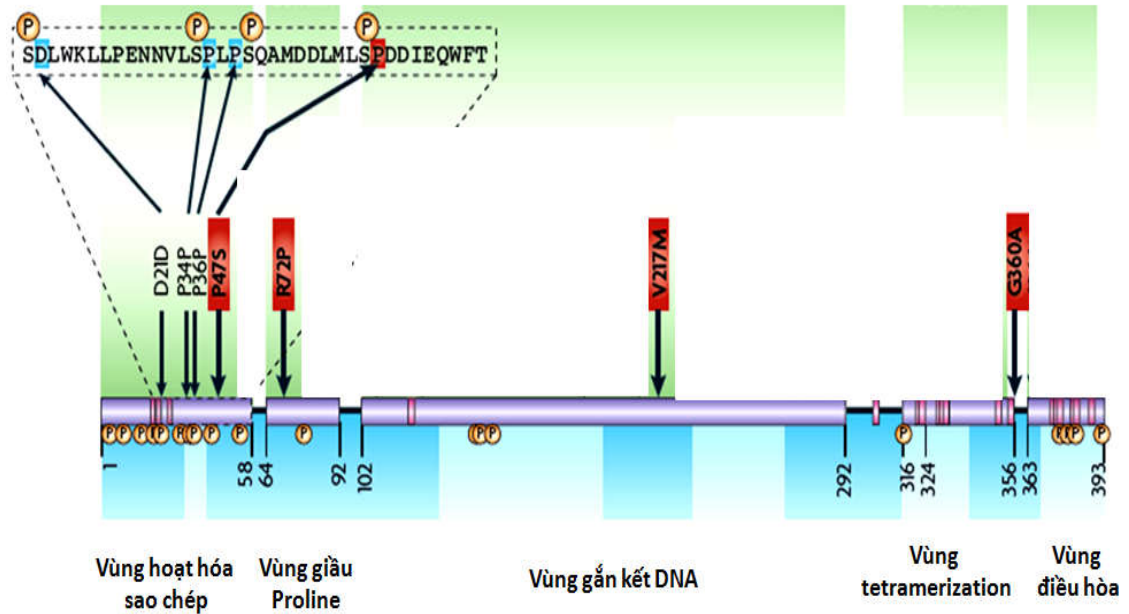
- *Vai trò khởi phát Apoptosis*

Gen *TP53* gây apoptosis thông qua yếu tố Bax (Bcl-2-associated X protein), DR5/KILLER (death receptor 5), DRAL, Fas/CD95 (cell-death signaling receptor), PIG3 (p53-inducible gene 3), Puma (p53-upregulated modulator of apoptosis), PIDD (p53-induced protein with death domain), PERP (p53 apoptosis effector related to PMP-22), Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), Scotin, p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) và theo con đường bên trong tế bào hay con đường ty thể (Intrinsic pathway/mitochondrial pathway) và con đường bên ngoài tế bào hay con đường cái chết thụ thể (Extrinsic pathway/death receptor pathway). Ngoài ra, p53 có thể trực tiếp kích hoạt Apaf-1 apoptosis (Hình 1.14) [4], [57].

❖ *Tính đa hình gen TP53*

Theo kết quả của các nghiên cứu đã được công bố thì có rất nhiều SNPs được tìm thấy trên vùng mã hóa và không mã hóa của gen *TP53* (hình 1.16). Các SNPs

này đã tạo ra các kiểu gen (genotype) khác nhau của *TP53* trong cộng đồng. Một số SNPs đóng vai trò quan trọng đối với sự phát sinh phát triển của nhiều loại ung thư và được coi là những yếu tố nguy cơ cần được quan tâm [8], [9], [10], [11], [59].



Hình 1.12: Các SNPs trên các vùng mã hóa và không mã hóa của gen *TP53* [11]

Một số SNPs như P47S, R72P, V217M, G360A được xác định làm gia tăng nguy cơ gây ung thư ở người (Theo Whibley và cộng sự)

Đầu tiên phải kể đến là hiện tượng đa hình do sự thêm 16 base - pairs tại vùng không mã hóa thứ 3 (intron-3) của *TP53*. Những người mang kiểu gen này thì sự biểu hiện protein p53 trong tế bào ở mức thấp và có nguy cơ cao mắc một số loại ung thư bao gồm ung thư phổi, ung thư vú và ung thư đại trực tràng [60], [61]. Điều này chứng tỏ rằng SNPs có khả năng thay đổi quá trình hoàn thiện mRNA [60]. Bên cạnh đó các SNPs trên vùng mã hóa của *p53* tại các bộ ba mã hóa 21 (GAC → GAT), 34 (CCC → CCA) và 36 (CCG → CCT) mặc dù không làm thay đổi trình tự acid amin nhưng cũng làm giảm sự biểu hiện của protein p53. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các SNPs này nằm tại vùng N-tận của *TP53* chứa vị trí tương tác của với *MDM2* và làm giảm khả năng dịch mã của *TP53* mRNA [11]. Mặt khác, các SNPs trên vùng

mã hóa làm thay đổi trình tự acid amin đều có thể dẫn đến sự thay đổi khả năng bám của *TP53* đối với đoạn trình tự đặc hiệu tại gen đích, thay đổi quá trình hoàn thiện, tính ổn định của protein cũng như thay đổi khả năng tương tác của p53 với các protein nội bào. Đây là những SNPs nằm tại các bộ ba mã hóa 47 (P47S), 72 (R72P), 217 (V217M) và 360 (G360A). Trong điều kiện bình thường, dưới tác động của protein p38 và homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) p53 được phosphoryl hóa tại vị trí S46 dẫn đến sự tăng cường sao chép các gen liên quan đến quá trình chết theo chương trình (apoptosis). Và khi alen *TP53*-P47 được thay thế bởi alen *TP53*-S47 sự phosphoryl hóa tại vị trí S46 bị giảm sút làm giảm hoạt tính tác động lên các gen đích của quá trình thực bào và tăng khả năng mắc ung thư [62].

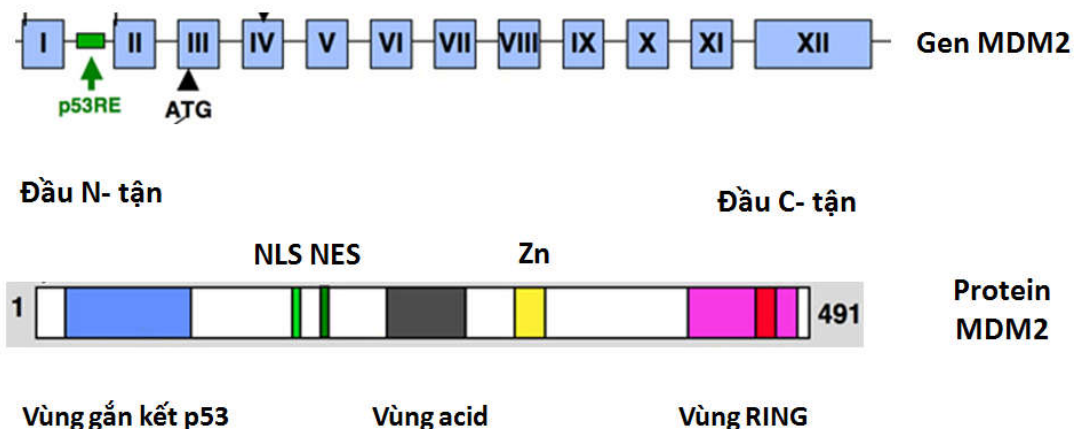
Tương tự như vậy, tính đa hình tại bộ ba mã hóa 72 (R72P) đã tạo ra 2 kiểu gen đối với vị trí này là *TP53*-R72 và *TP53*-P72 [63], [64]. Nghiên cứu của Boldrine và cộng sự cho thấy kiểu gen đồng hợp tử *TP53*-P72 có nguy cơ cao mắc ung thư phổi [59]. Đồng thời kiểu gen *TP53*-P72 cùng với kiểu gen G/G của MDM2 cũng thường gặp trên những bệnh nhân ung thư phổi hút thuốc lá lâu năm [59], [65], [66]. Đối với 2 dạng SNPs còn lại, V217M nằm trên vùng bám vào DNA của p53 (DNA binding domain), SNPs này có khả năng làm giảm hoạt động của p53 và các gen bị ảnh hưởng trực tiếp gồm có CDKN1A, BAX và PMAIP1. Nghiên cứu chức năng cho thấy kiểu gen *TP53*-M217 có sự biểu hiện của những gen trên cao gấp nhiều lần kiểu gen *TP53*-V217. Như vậy kiểu gen *TP53*-M217 có khả năng bảo vệ tế bào chống lại các tác nhân gây ung thư tốt hơn kiểu gen *TP53*-V217. Tuy nhiên cơ chế phân tử của hiện tượng này vẫn chưa thực sự rõ ràng. SNPs G360A nằm tại vùng nối của *TP53*. SNPs này tác động lên sự biểu hiện của *BAX* và *MDM2*, đây là những gen quan trọng trong con đường tín hiệu p53 [11].

1.3.2. Gen *MDM2*

❖ Cấu trúc gen *MDM2*

Gen *MDM2* (Murine double minute 2) còn được gọi là *HDM2* (Human double minute 2) gồm có 12 exon và 1 intron nằm trên nhánh dài của NST số 12, được xác định lần đầu tiên năm 1980. Phân tử protein *MDM2* được tổng hợp có 491 acid amin, gồm 5 vùng cấu trúc chức năng [6]:

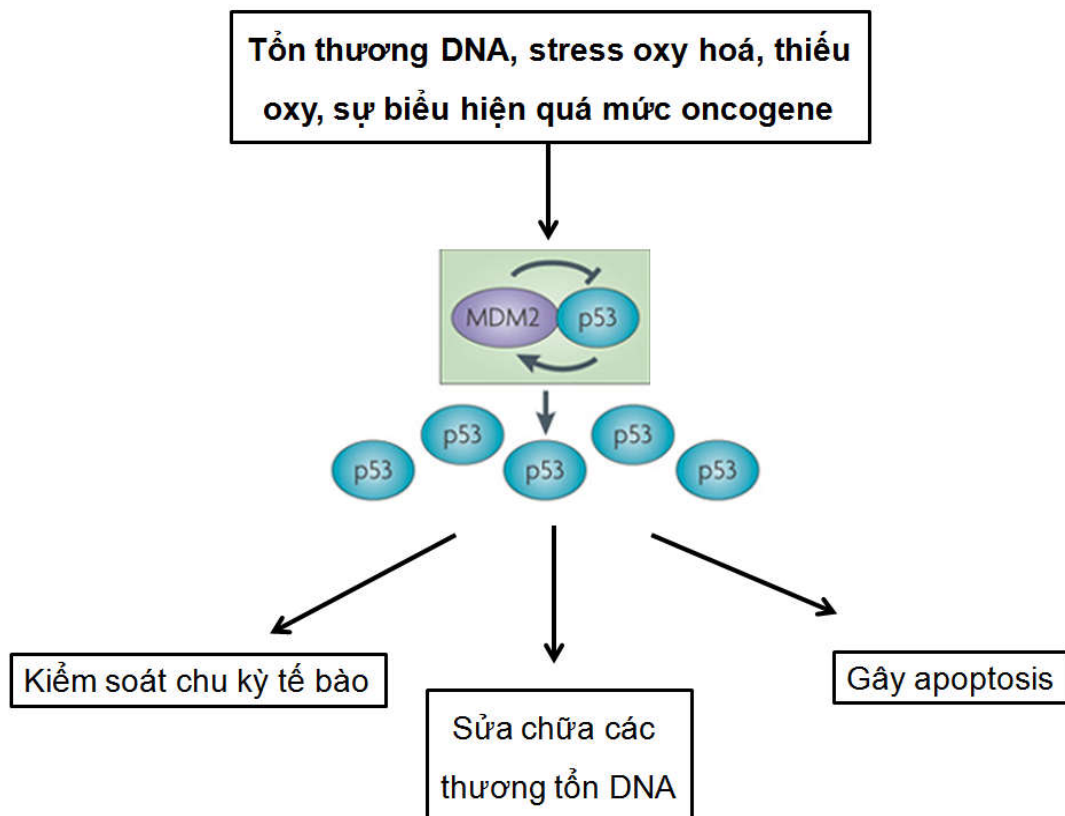
- Vùng tương tác p53 (p53 interacting domain): nằm ở đầu N- tận của phân tử *MDM2* gắn kết với vùng hoạt hóa sao chép của protein p53. Sự gắn kết này làm mất đi chức năng hoạt hóa sao chép của p53 với các mục tiêu phiên mã đồng thời cũng giúp *MDM2* vận chuyển p53 ra khỏi nhân tế bào qua con đường phụ thuộc vùng RING.
- Vùng RING: nằm ở đầu C- tận của phân tử *MDM2* có chức năng vận chuyển p53 ra khỏi nhân thông qua quá trình E3 ubiquitin hóa.
- Chuỗi tín hiệu NLS (Nuclear localization signal) và NES (Nuclear export signal) giúp *MDM2* có thể ra vào hạt nhân.
- Vùng acid (Acidic domain): nằm ở trung tâm, giúp *MDM2* gắn kết với protein ribosom L5, và với p300/CBP (CREB-binding protein)
- Vùng Zn (Zn finger): chức năng chưa được biết rõ



Hình 1.13: Cấu trúc phân tử protein *MDM2*
(Theo Iwakuma và cộng sự [6])

❖ *Vai trò của gen MDM2*

Cho đến nay, vai trò quan trọng nhất được biết đến của *MDM2* là điều hòa hoạt động của gen *TP53* trong con đường tín hiệu p53. Ở điều kiện bình thường, *MDM2* gắn kết vào vùng kích hoạt sao chép của p53, kiểm soát sự phân bố và giáng hóa của protein p53. Ngược lại, p53 hoạt hóa sẽ thúc đẩy quá trình sao chép *MDM2* do đó sự biểu hiện của p53 và *MDM2* trong tế bào luôn được giữ ở trạng thái cân bằng thông qua quá trình điều hòa ngược giữa *MDM2* và p53. Khi xuất hiện các yếu tố kích thích (tổn thương DNA, stress tế bào, thiếu oxy, sự biểu hiện quá mức oncogen), *MDM2* sẽ được phosphoryl hóa và bộc lộ vùng hoạt hóa của p53, khởi phát các chức năng của p53 [6], [7], [67], [68].

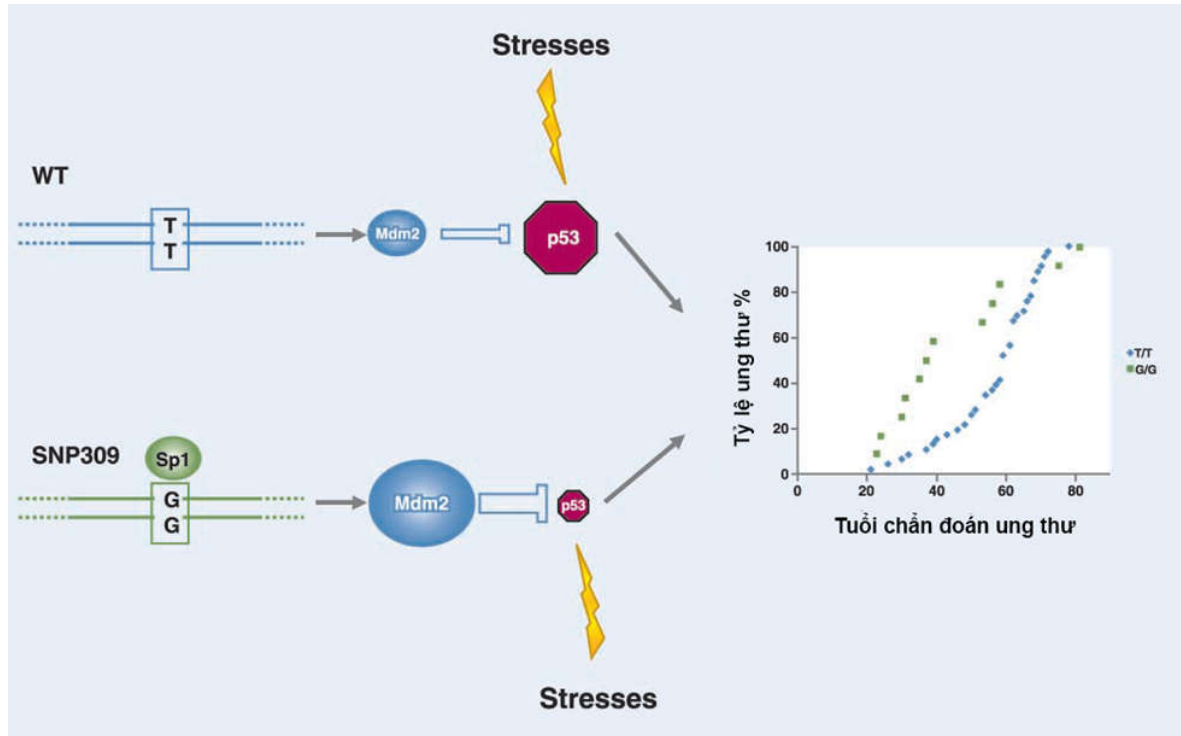


Hình 1.14: Vai trò điều hòa p53 của MDM2

Bên cạnh đó, người ta cũng ghi nhận nhiều tương tác khác của *MDM2* trong các tín hiệu nội bào phức tạp với các phân tử khác như RB, SP1, E2F1/DP1, p300/CBP, thụ thể Androgen (AR) và Protein ribosome L5 để kiểm soát chu kỳ tế bào. Chính những tương tác này mà một số tác giả đã coi *MDM2* có vai trò như một oncogen. Tuy nhiên, cho đến nay, những tương tác này còn nhiều điều chưa được sáng tỏ [6], [7], [69].

❖ *Đa hình gen MDM2*

MDM2 kiểm soát chặt chẽ mức độ biểu hiện và hoạt động của p53 vì vậy sự thay đổi mức độ biểu hiện của *MDM2* sẽ làm thay đổi khả năng kháng ung thư của p53 và các gen trong con đường tín hiệu p53. Mặc dù các đột biến của *MDM2* được ghi nhận là hiếm, tuy nhiên nó rất đa hình, có ít nhất 152 SNP được biết đến [70]. Nghiên cứu tính đa hình của *MDM2* cho thấy SNP quan trọng nhất nằm ở bộ ba mã hóa 309 (SNP309 T/G) [66], [71], [72], [73], [74]. Kiểu gen đồng hợp tử G/G có sự gia tăng tổng hợp *MDM2* cao gấp 2,5 lần so với kiểu gen nguyên thủy T/T. Chính sự gia tăng nồng độ của *MDM2* này dẫn đến bất hoạt vai trò của p53. Gui và cộng sự đã thực hiện một phân tích cộng gộp trên 6063 bệnh nhân ung thư phổi và 6678 đối chứng, kết quả ghi nhận một nguy cơ cao ung thư phổi với kiểu gen đồng hợp tử G/G (OR = 1,17; 95% CI = 1,02-1,34; p= 0,06) [75]. Một số nghiên cứu cũng ghi nhận đối với những người mang đột biến di truyền trên gen *TP53* thì kiểu gen đồng hợp tử G/G có khả năng phát triển ung thư sớm hơn khoảng 10 năm so với kiểu gen T/T [65], [71].



Hình 1.15: Đa hình SNP 309 T/G [65]

Kiểu gen đồng hợp tử G/G làm gia tăng nồng độ MDM2 so với kiểu gen T/T dẫn đến sự bất hoạt p53, gia tăng nguy cơ gây ung thư (Theo Bond và cộng sự)

1.3.3. Tình hình nghiên cứu về đa hình gen TP53 và gen MDM2 liên quan với ung thư phổi trên thế giới

❖ Gen TP53

- Codon R72P

Trên thế giới có nhiều nghiên cứu về SNP R72P trong mối liên quan với ung thư phổi. Các giả định về mối tương quan được đưa ra không hoàn toàn thống nhất. Nghiên cứu của Kawajiri K (1993) chỉ ra rằng, đa hình nucleotid đơn SNP R72P R/P của gen TP53 có liên quan đến tính nhạy cảm di truyền với ung thư phổi do hút thuốc gây ra, đồng thời kiểu gen SNP R72P P/P có nguy cơ bị ung thư phổi cao hơn 1,7 lần so với các kiểu gen khác [76]. Trong một nghiên cứu khác của Rong Fan và cộng sự

năm 2000 cũng chỉ ra các đa hình tại codon 72 (Arg / Pro) của gen ức chế khối u phổ biến *TP53* góp phần vào tính nhạy cảm di truyền cho ung thư biểu mô phổi do hút thuốc. Ngoài ra, mức độ hút thuốc dẫn đến tăng nguy cơ của các kiểu gen nhạy cảm với ung thư biểu mô phổi [77]. Tuy nhiên, kết luận này không được xác nhận trong sáu nghiên cứu bệnh- chứng khác [78]. Tương tự, hai phân tích cộng gộp khác đã được thực hiện và cũng báo cáo các kết quả khác nhau. Một nghiên cứu phân tích cộng gộp từ 13 nghiên cứu đề cập đến đa hình R72P của gen *TP53* với nguy cơ ung thư phổi và kết quả là không tìm thấy bất kỳ liên kết chặt chẽ nào [79]. Một phân tích khác từ 23 nghiên cứu được công bố trước đó đã chỉ ra rằng nguy cơ tương đối của ung thư phổi với kiểu gen đồng hợp SNP R72P P/P và người mang alen P (SNP R72P P/P + R/P) lần lượt là 1,221 và 1,148. Khi phân tích phân tầng theo dân tộc, rủi ro tăng lên đáng kể đã được tìm thấy ở người châu Á cho cả đồng hợp tử Pro / Pro (OR = 1,395) và người mang alen Pro (OR = 1,109). Khi phân tích nguy cơ theo tình trạng hút thuốc lá, nguy cơ mắc ung thư phổi cho người mang alen Pro và hút thuốc lá là 1,44 [80].

Gần đây, một phân tích tổng hợp từ 39 nghiên cứu trên 27.958 đối tượng tham gia đã kết luận: Các OR gộp chung cho thấy không có mối tương quan đáng kể của đa hình codon 72 gen *TP53* với tăng hoặc giảm nguy cơ ung thư phổi trong tất cả các mô hình gen (OR Pro với Arg = 1,04; $p < 0,001$; OR Pro / Pro với Arg / Arg = 1,07, $p < 0,001$; OR Arg / Pro với Arg / Arg = 1,04, $p < 0,001$; OR Pro / Pro + Arg / Pro với Arg / Arg = 1,04; $p < 0,001$; OR Pro / Pro với Arg / Arg + Arg / Pro = 1,07; $p < 0,001$). Ngoài ra, phân tích phân nhóm theo tình trạng hút thuốc đã chứng minh rằng biến thể codon 72 gen *TP53* dường như đóng một vai trò bảo vệ trong ung thư phổi ở người không hút thuốc [81]. Các hiện phân tích tổng hợp hiện tại cho thấy R72P *TP53* có thể làm giảm thiểu một phần nhỏ nguy cơ ung thư phổi ở những bệnh nhân ung thư tuyến và không hút thuốc. Tuy nhiên, sự kết hợp này cần thêm xác nhận trong các nghiên cứu trong tương lai với chất lượng cao hơn [81]. Ngược lại,

Siyang Wang và cộng sự khi nghiên cứu trên quần thể người châu Á lại cho thấy một liên kết quan trọng giữa các đa hình Arg / Pro codon 72 và nguy cơ ung thư phổi ở người dân châu Á (OR = 1,14; p <0.001). Tuy nhiên, nhóm nghiên cứu đã không thành công trong việc xác định mối liên quan này về tình trạng hút thuốc lá và loại mô học của bệnh nhân ung thư phổi [82].

– Codon P47S

Là đa hình phổ biến thứ hai xảy ra trên exon 4 gen *TP53* dẫn đến thay thế roline bằng serine. Các nhà khoa học đã chỉ ra rằng SNP này gây ra sự sụt giảm đáng kể trong khả năng gây apoptosis của protein p53. Phosphoryl hóa của serine ở codon 46 là một khâu quan trọng trong quá trình apoptosis qua trung gian *TP53*, nơi proline hoạt động như một chất nền cho kinase hướng proline như protein MAPK1. Nhưng biến thể serine ở codon 47 là một cơ chất nghèo cho sự phosphoryl hóa và do đó, khả năng gây apoptosis thấp hơn năm lần [82]. Nghiên cứu của Emanuela Felley-Bosco và cộng sự tại Mỹ (n=101), chỉ 4,7% người Mỹ gốc Phi biểu hiện SNP P47S và không tìm thấy ở tất cả người da trắng [62]. Mặc dù mối tương quan giữa đa hình codon 47 và ung thư phổi đã có một số tác giả nghiên cứu, tuy nhiên vì là một đa hình hiếm và chưa có nhiều công bố nên chưa cho thấy được mối tương quan giữa SNP P47S với ung thư phổi. Mostaid MS và cộng sự năm 2014 nghiên cứu trên 106 bệnh nhân ung thư phổi ở Bangladesh đã không tìm thấy mối liên quan đáng kể nào giữa SNP P47S với nguy cơ mắc ung thư phổi [83].

❖ Gen *MDM2*

Đa hình nucleotid đơn của gen *MDM2* được nghiên cứu nhiều nhất nằm tại intron đầu tiên, rs2279744 (*MDM2* - SNP309), với sự biến đổi từ T thành G (*MDM2* - SNP309 T > G) làm gia tăng ái lực của SP1 (Stimulatory protein 1) với *MDM2*, kết quả làm tăng sự biểu hiện của *MDM2* dẫn đến gen *TP53* bị ức chế và là điều kiện cho các tế bào ung thư hình thành và tiến triển [65]. Mặc dù vậy, các dữ liệu được công bố về mối liên quan giữa *MDM2*-SNP309 T→G với ung thư phổi đến nay

chưa đi đến những kết quả thống nhất. Trong phân tích tổng hợp của Bai và cộng sự năm 2009 về mối quan hệ giữa đa hình MDM2 T309G với nguy cơ ung thư phổi đã chỉ ra rằng kiểu gen MDM2 SNP309 GG tăng nguy cơ phát triển ung thư phổi 1,16 lần có ý nghĩa thống kê (OR = 1,16; 95% CI: 1,01-1,34). Nguy cơ ung thư phổi tăng lên không đáng kể khi kết hợp với kiểu gen MDM2 SNP309 ở những người từng hút thuốc nhưng ở những người không hút thuốc kiểu gen MDM2 SNP309GG làm tăng nguy cơ phát triển ung thư phổi lên 1,36 lần (OR = 1,36; 95% CI= 1,10-1,68) [84]. Một số phân tích khác cũng ủng hộ quan điểm rằng gen MDM2 SNP309 là một gen nhạy cảm di truyền thấp trong sự phát triển của bệnh ung thư phổi và các mối quan hệ của MDM2 SNP309 với nguy cơ ung thư phổi mạnh mẽ hơn ở người không hút thuốc [75], [85]. Điều thú vị trong phân tích của Wenlei Zhuo và cộng sự là khi phân tích phân nhóm theo giới tính đã chỉ ra rằng kiểu gen đồng hợp tử GG có thể làm tăng nguy cơ ung thư phổi ở nữ giới (OR=1.29) [85]. Tương tự Wenwu He trong phân tích của mình cũng khẳng định kiểu gen MDM2 SNP309GG làm tăng đáng kể nguy cơ phát triển ung thư phổi ở nữ giới (OR=1,282) và nhóm người không hút thuốc lá (OR= 1,328) [86]. Tuy nhiên Gansmo và cộng sự khi nghiên cứu ảnh hưởng của MDM2 SNP309 và SNP285 lên nguy cơ mắc các ung thư vú, tiền liệt tuyến, phổi và đại tràng lại đưa ra kết luận ngược lại rằng nguy cơ mắc ung thư phổi được giảm nhẹ ở những người mang kiểu gen SNP309 TG/GG so với kiểu gen SNP309TT và mối tương quan này chỉ gặp ở nữ giới mà không xuất hiện ở nam giới [87].

Một số nghiên cứu khác đã chỉ ra một nguy cơ gia tăng ung thư phổi ở người mang alen G của MDM2 SNP309 ở quần thể người Hàn Quốc và Trung Quốc [88], [89]. Các nghiên cứu này đều thống nhất rằng kiểu gen đồng hợp G/G mang đến nguy cơ cao hơn so với kiểu gen T/G. Và khi kết hợp cả SNP R72P TP53 với SNP309 MDM2 thì OR=4,56, nếu kết hợp thêm cả hút thuốc lá với 2 SNP này thì OR=10,41 [88].

❖ *Nghiên cứu về đa hình gen TP53 và MDM2 liên quan đến tình trạng hút thuốc lá*

Khi nghiên cứu sự liên quan giữa các đa hình đơn của gen *TP53* và gen *MDM2* với các yếu tố nguy cơ của ung thư phổi, người ta thấy một số SNP của 2 gen này có liên quan với thói quen hút thuốc lá, đặc biệt chú ý đến đa hình gen *TP53* tại codon 72 và đa hình đơn SNP309 của gen *MDM2*.

Một nghiên cứu của Fernandez-Rubio và cộng sự trên 589 bệnh nhân ung thư phổi và 582 đối chứng đã chỉ ra đa hình tại codon 72 của gen *TP53* biến Arginine thành Proline làm gia tăng nguy cơ ung thư phổi, đặc biệt ở nhóm nghiện thuốc lá [61]. Fan và cộng sự cũng ghi nhận một tần suất cao hơn kiểu gen SNP R72P/P của gen *TP53* trên bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến hút thuốc lá so với nhóm chứng [77]. Li và cộng sự đã tiến hành một phân tích cộng gộp trên 15.857 đối tượng (7.495 bệnh nhân ung thư phổi và 8.362 chứng) từ 23 nghiên cứu đã được công bố, cũng chỉ ra rằng alen Pro trên codon 72 của gen *TP53* làm gia tăng nguy cơ ung thư phổi ở người hút thuốc lá [80].

Đối với sự phân bố kiểu gen *MDM2* liên quan đến tình trạng hút thuốc lá, nhiều nghiên cứu cho thấy mối tương quan chặt chẽ giữa những người mắc ung thư phổi với đa hình tại SNP309 kiểu gen G/G và kiểu gen này thường gặp ở những người hút thuốc lâu năm [75], [90], [88]. Tuy nhiên, các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng cần thực hiện các phân tích sâu hơn, với cỡ mẫu lớn hơn và thực hiện trên những cộng đồng khác nhau để có thể đưa ra những kết luận có ý nghĩa về vai trò của SNP309 T/G với nguy cơ phát triển ung thư phổi trên những người hút thuốc lá.

Như vậy, có thể thấy rằng tính đa hình của gen *MDM2* và *TP53* đóng vai trò quan trọng trong sự phát sinh phát triển ung thư phổi và ở một mức độ nhất định có liên quan đến chặt chẽ đến thói quen hút thuốc của người dân trong cộng đồng.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 220 bệnh nhân ung thư phổi nguyên phát chẩn đoán tại Trung tâm Hô hấp, Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu- Bệnh viện Bạch Mai và 230 đối chứng từ tháng 10 năm 2013 đến tháng 12 năm 2014.

2.1.1. Nhóm bệnh

❖ *Tiêu chuẩn lựa chọn*

- 220 bệnh nhân được chẩn đoán xác định ung thư phổi tại Trung tâm Hô Hấp, Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu- Bệnh viện Bạch Mai bằng kết quả xét nghiệm mô bệnh học.
- Đồng ý tham gia nghiên cứu.

❖ *Tiêu chuẩn loại trừ*

- Ung thư phổi thứ phát.
- Ung thư phổi có kèm theo các ung thư khác.
- Không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.2. Nhóm chứng

- 230 đối chứng được lựa chọn từ những người đến khám sức khỏe tại khoa Khám bệnh- Bệnh viện Bạch Mai. Nhóm chứng được khám lâm sàng, làm các xét nghiệm cận lâm sàng, chụp XQ phổi, siêu âm và được kết luận không mắc ung thư phổi hay bất cứ loại ung thư nào khác.
- Tương ứng về tuổi và giới với nhóm bệnh nhân ung thư phổi.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

- Nghiên cứu mô tả cắt ngang có đối chứng.

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Cỡ mẫu nghiên cứu được tính toán dựa trên công thức tính cỡ mẫu cho so sánh 2 tỷ lệ của Tổ chức Y tế thế giới:

$$n = \frac{\left\{ z_{1-\alpha/2} \sqrt{2\bar{P}(1-\bar{P})} + z_{1-\beta} \sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)} \right\}^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

n: cỡ mẫu

$P_1=0,3$: tỷ lệ biến thể liên quan đến ung thư của nhóm bệnh [88].

$P_2=0,2$: tỷ lệ biến thể liên quan đến ung thư của nhóm chứng [88].

Cỡ mẫu của nghiên cứu tối thiểu phải được 178 bệnh nhân và 178 đối chứng.

2.2.3. Các chỉ số nghiên cứu

- Các thông tin: tuổi, giới, tình trạng hút thuốc lá.
- Các xét nghiệm cận lâm sàng: các xét nghiệm tế bào học, mô bệnh học từ các bệnh phẩm lấy qua soi phế quản, chọc hút qua thành ngực, sinh thiết.
- Kết quả mô bệnh học là tiêu chuẩn vàng trong lựa chọn nhóm bệnh nhân ung thư phổi: kết quả phải được đọc bởi các bác sỹ giải phẫu bệnh của Bệnh viện Bạch mai, khẳng định là ung thư phổi nguyên phát.
- Thông tin về hút thuốc lá được thu thập qua phỏng vấn bệnh nhân: bệnh nhân có hút thuốc hay không, nếu bệnh nhân hút thuốc sẽ phỏng vấn về số lượng điều thuốc hút trong một ngày, thời gian hút thuốc, từ đó tính được số bao-năm bằng số bao hút trong 1 ngày nhân với số năm hút thuốc. 20 điều thuốc được quy đổi thành 1 bao thuốc.
- Các đa hình gen được phân tích
 - ✓ **Gen TP53**
 - + Thêm đoạn 16 cặp base tại intron 3 (dup 16).
 - + SNP P34P, tại codon 34, exon 4 (CCC →CCA), mã hoá Prolin.
 - + SNP P36P, tại codon 36, exon 4 (CCG →CCA), mã hoá Prolin.

+ SNP P47S, tại codon 47, exon 4, (CCG hoặc TCG), tương ứng với Prolin hoặc Serin.

+ SNP R72P tại codon 72, exon 4, (CGC hoặc CCC), tương ứng với Arginin hoặc Prolin.

+ SNP V217M, tại codon 217, exon 6, (GTG hoặc ATG), tương ứng với Valin hoặc Methionin.

+ SNP G360A tại codon 360, exon 10, (GGG hoặc GCG), tương ứng với Glycin hoặc Alanin.

✓ **Gen *MDM2* SNP 309 T>G:** đa hình nucleotid đơn tại vị trí nucleotid 309, intron 1 vùng promoter của gen.

2.2.4. Trang thiết bị, hóa chất

❖ **Trang thiết bị:** dụng cụ phải được vô trùng tuyệt đối (hấp 120°C trong 20 phút).

- Máy hấp vô trùng dụng cụ.
- Máy Gene Amp PCR System 9700 (USA).
- Tủ lạnh sâu (-30°C, -80°C), tủ ẩm.
- Máy đọc trình tự gen 3100-Avant Genetic Analyzer của hãng ABI-PRISM.
- Lò vi sóng (Samsung).
- Máy ly tâm để bàn Eppendorf (Đức), máy ly tâm lạnh Beckman (USA).
- Hệ thống điện di ngang Mupid (Nhật Bản).
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động: Chemidoc EQ-Bio-Rad (USA).
- Máy đo nồng độ DNA Nano Drop 1000 (Mỹ).
- Tủ ẩm.
- Buồng hút.
- Pipette, pipette tip, polypropylene tube (200µL, 500 µL).
- Ống PCR, ống eppendorf 1,5ml, ống Falcon, găng tay, giấy thấm đã được vô trùng tuyệt đối.

❖ **Hóa chất:**

- **Tách chiết DNA từ máu toàn phần:** Kit Promega
- **Kỹ thuật PCR:** dung dịch đệm, cặp mồi đặc hiệu, dNTP, DNA polymerase, Mg^{2+} , nước cất 2 lần vô trùng.
- **Điện di sản phẩm PCR:** gel agarose, dung dịch TBE (boric acid EDTA), ethidium bromide, loading dye, thang DNA chuẩn 100bp (marker 100bp)
- **Tinh sạch sản phẩm PCR:** *Promega Wizard SV gel clean-up system* (Promega Inc.) gồm dung dịch gắn kết màng, dung dịch rửa màng, nước cất không có nuclease.
- **Enzym cắt giới hạn:**
 - + Enzym *MspAI* nhận biết điểm cắt (CCG↓CTG) có vị trí nucleotid 309 của gen MDM2. Sản xuất bởi Promega- USA.
 - + Enzym *BstUI* nhận biết điểm cắt (CG↓CG) tại vị trí codon 72 của gen TP53. Sản xuất bởi ThermoFisher scientific- Phần Lan.
- **Kỹ thuật giải trình tự gen:** BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*) gồm *BigDye Terminator v3.0* (*dATP*, *dCTP*, *dGTP* và *dUTP*), *BigDye buffer*, cặp mồi đặc hiệu, dung dịch formamide.

2.2.5. Quy trình nghiên cứu

❖ *Lựa chọn đối tượng nghiên cứu, thu thập các chỉ số nghiên cứu, thu thập mẫu nghiên cứu*

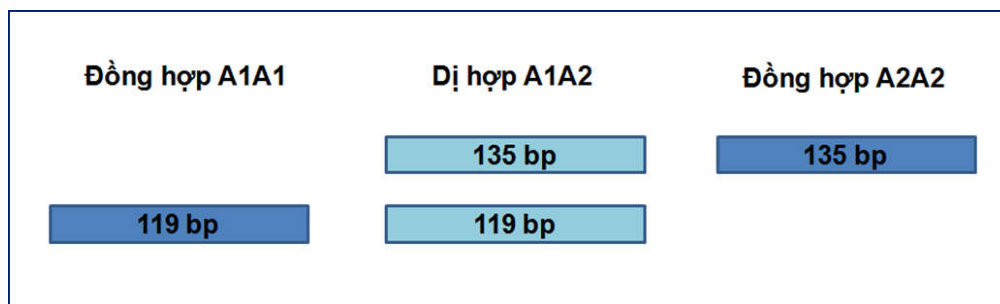
- Các đối tượng đủ tiêu chuẩn lựa chọn được khai thác thông tin theo bệnh án nghiên cứu mẫu (*Phụ lục 1*).
 - + 2ml máu toàn phần chống đông bằng EDTA được thu thập từ 220 bệnh nhân ung thư phổi tại Trung tâm hô hấp và Trung tâm y học hạt nhân và ung bướu Bệnh viện Bạch mai, 230 người mạnh khỏe làm đối chứng.
 - + Bảo quản mẫu trong tủ lạnh âm sâu ($t^{\circ} = -80^{\circ}C$) cho đến khi phân tích mẫu.

❖ *Tách chiết DNA từ máu ngoại vi*

- Tách chiết DNA toàn phần: theo kit Promega (*Phụ lục 2*)
- Đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch của DNA bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 260 nm và 280 nm trên máy Nanodrop. Kết quả OD của mẫu DNA được coi là đạt khi nồng độ từ 20 ng/μl trở lên. Với những mẫu có nồng độ DNA quá cao >300 ng/μl sẽ được pha loãng để đưa về nồng độ < 100 ng/μl. Độ tinh sạch của DNA được đo bằng tỷ số A260/A280 và mẫu DNA tinh sạch khi tỷ số này từ 1,8-2,0.
- Điện di DNA trên gel agarose để kiểm tra sự toàn vẹn của DNA.

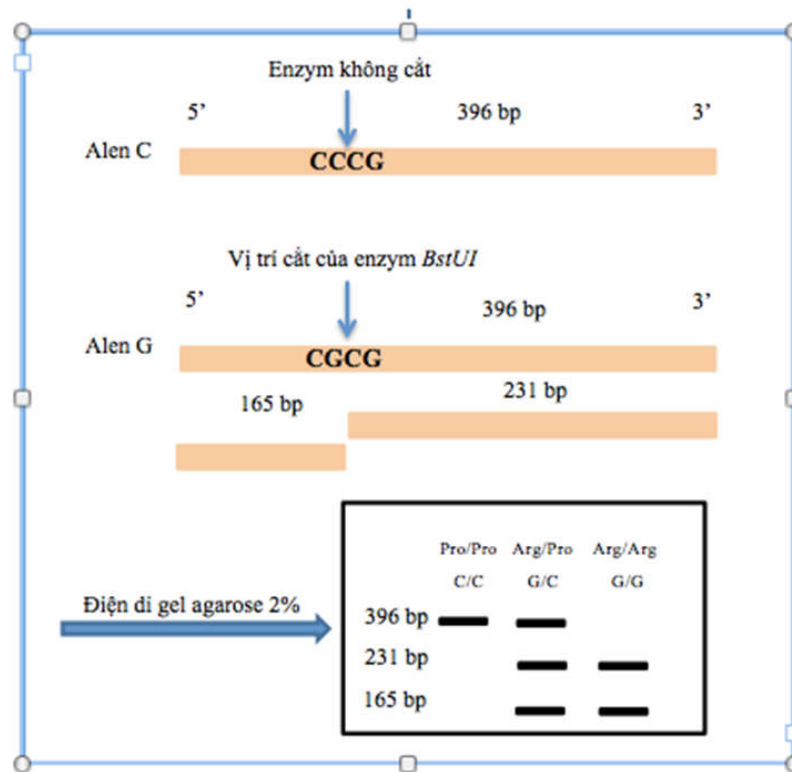
❖ *Xác định các đa hình gen TP53 và gen MDM2*

- Sử dụng kỹ thuật PCR xác định đột biến thêm 16bp tại vùng intron 3 của gen *TP53* (*Phụ lục 3*)
 - + Khuếch đại vùng gen chứa intron 3 gen *TP53* bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu (*Bảng 2.1*).
 - + Sản phẩm PCR sẽ được điện di trên gel agarose 3 % cùng với thang chuẩn 100→1000 (*Phụ lục 4*).
 - + Hình ảnh điện di nếu có thêm đoạn 16bp sẽ có kích thước 135bp so với đoạn gen nguyên thủy 119bp. Kiểu gen A1A1 sẽ chỉ có 1 băng 119bp, kiểu gen A1A2 sẽ có hai băng 119bp và 135bp, kiểu gen A2A2 sẽ có một băng với kích thước 135bp.



Hình 2.1. Mô tả hình ảnh điện di xác định đa hình gen do thêm 16bp tại vùng intron 3 của gen *TP53*

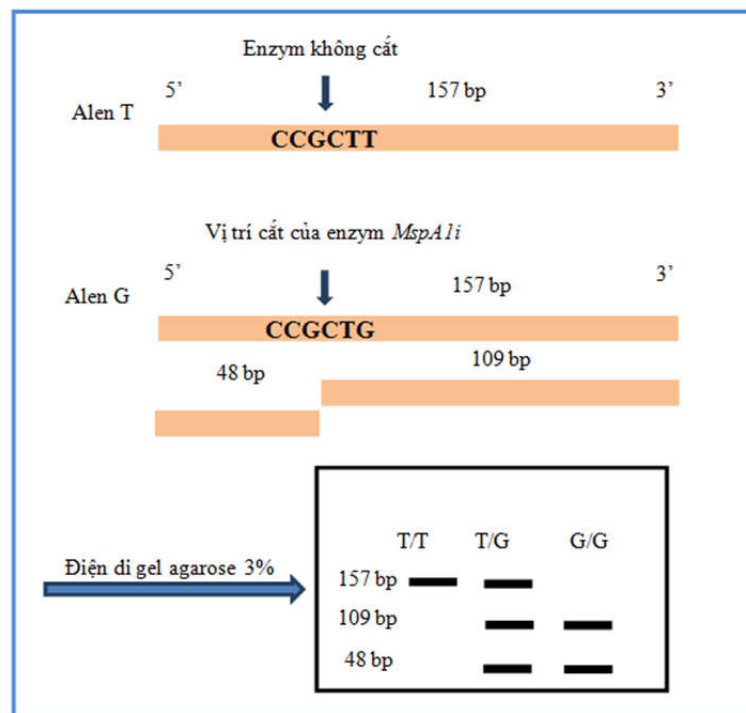
- Sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR) xác định SNP R72P của gen *TP53* (Phụ lục 5).
 - + Khuếch đại vùng gen chứa SNP Arg72Pro của gen *TP53* bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu (Bảng 2.1).
 - + Thành phần phản ứng PCR (thể tích 10 μ l) gồm: 1X đệm PCR; 2,5mM dNTP, 0,2 μ M mồi xuôi và ngược, 0,5U *Taq* polymerase, 20-50ng DNA và H₂O.
 - + Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C - 5 phút, 35 chu kỳ 94°C - 30 giây, 55°C - 30 giây, 72°C - 30 giây, 72°C - 5 phút. Bảo quản mẫu ở 15°C.
 - + Phân tích RFLP: sản phẩm PCR được ủ với enzyme giới hạn *Bst*UI ở điều kiện 37°C qua đêm (18-22 giờ). Sản phẩm cắt được điện di cùng với thang chuẩn 100bp trên gel agarose 2%. Các băng DNA được nhuộm ethidium bromide và chụp ảnh bằng hệ thống máy EC3 Imaging system. Đoạn gen được nghiên cứu chứa trình tự nhận biết của enzyme *Bst*UI (CG↓CG) tại vị trí codon 72. Khi *Bst*UI cắt đoạn gen sẽ tạo ra các đoạn DNA có kích thước 165 bp và 231 bp, tương ứng với kiểu allele Arg (wild type-GG). Khi base G bị thay thế bởi base C sẽ làm mất trình tự nhận biết của enzyme *Bst*UI, do đó đoạn gen sẽ không bị cắt, tương ứng với kiểu allele Pro (mutant type-CC). Kiểu gen đồng hợp R72R có hai băng 165 và 231. Kiểu gen dị hợp R72P có 3 băng 165, 231 và 396 bp. Kiểu gen đồng hợp P72P chỉ có một băng 396 bp (Hình 2.2).



Hình 2.2: Xác định kiểu gen R72P bằng kỹ thuật PCR-RFLP

- + Kết quả được kiểm tra lại bằng giải trình tự trực tiếp.
- Phân tích SNP309 của gen MDM2 bằng phương pháp RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism - PCR) (Phụ lục 5).
 - + Khuếch đại vùng gen SNP309 của gen MDM2 bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu (Bảng 2.1).
 - + Thành phần phản ứng PCR (thể tích 10 μ l) gồm: 1X đệm PCR; 2,5mM dNTP, 0,2 μ M mồi xuôi và mồi ngược, 0,5U *Taq* polymerase, 20-50ng DNA và H₂O.
 - + Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/5 phút, 35 chu kỳ 95°C/30 giây, 55°C/30 giây, 72°C/30 giây), 72°C/7 phút. Bảo quản mẫu ở 15°C.
 - + Kỹ thuật RFLP: Sản phẩm PCR được ủ với enzym cắt giới hạn *MspA1i* ở điều kiện 37°C qua đêm (18-22 giờ). Sản phẩm cắt được điện di cùng với thang chuẩn 100bp trên gel agarose 3%. Các băng DNA được nhuộm ethidium bromide và chụp ảnh bằng hệ thống máy EC3 Imaging system.

Đoạn gen được nghiên cứu chứa trình tự nhận biết của enzym *MspA1i* (CCG↓CTG) tại vị trí SNP309. Bình thường vị trí SNP309 của gen MDM2 là T, không chứa vị trí nhận biết của enzym *MspA1i*, đoạn gen được khuếch đại không bị cắt và giữ nguyên kích thước 157bp, tương ứng với kiểu allele T (wild type-TT). Khi có sự thay thế base T bởi base G sẽ xuất hiện trình tự nhận biết của enzym *MspA1i*, do đó đoạn gen bị cắt và tạo ra các đoạn DNA có kích thước 48 bp và 109 bp, tương ứng với kiểu allele G (mutant type-GG). Kiểu gen đồng hợp TT có một băng duy nhất 157 bp. Nếu hình ảnh điện di có 3 băng 157, 109 và 48 bp, tương ứng với kiểu gen dị hợp GT. Nếu kết quả có 2 băng 109 bp và 48 bp thì tương ứng với kiểu gen đồng hợp GG (Hình 2.3).



Hình 2.3: Xác định kiểu gen SNP309 gen MDM2 bằng kỹ thuật PCR-RFLP

- + Kết quả được kiểm tra lại bằng giải trình tự trực tiếp.
- Phân tích các SNP P34P, P36P, P47S, V217M, G360A gen *TP53* bằng phương pháp giải trình tự (Phụ lục 6, 7).

- + Khuếch đại đoạn gen chứa các SNP P34P, P36P, P47S, V217M, G360A bằng phương pháp PCR
 - ✓ Thành phần phản ứng PCR (thể tích 20 μ l) gồm: 10 μ l Taq polymerase, 1 μ l mỗi xuôi, 1 μ l mỗi ngược, 2 μ l DNA và 6 μ l H₂O.
 - ✓ Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/5 phút, 33 chu kỳ 94°C/30 giây, 60°C/30 giây, 72°C/30 giây), 72°C/7 phút. Bảo quản mẫu ở 15°C.
- + Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose kiểm tra, sau đó được tiến hành giải trình tự theo quy trình thường quy.
- + Kết quả được so với trình tự Genebank.

Bảng 2.1. Trình tự môi cho phản ứng PCR khuếch đại các SNP [91], [92], [93], [94], [95].

STT	Đa hình gen	Trình tự môi	Sản phẩm PCR (bp)
1	Dup16bp intron 3- <i>TP53</i>	F: 5'-TGGGACTGACTTTCTGCTCTT-3' R: 5'-TCAAATCATCCATTGCTTGG-3'	135 hoặc 119
2	R72P- <i>TP53</i>	F: 5'-CTG GTA AGG ACA AGG GTT GG-3' R: 5'-ACT GAC CGT GCA AGT CAC AG-3'	396
3	SNP309- <i>MDM2</i>	F:5'-CGCGGGAGTTCAGGGTAAAG-3' R:5'-CTGAGTCAACCTGCCCACTG-3'	157
4	P34P, P36P, P47S (exon 4- <i>TP53</i>)	F: 5'-CAACGTTCTGGTAAGGACAA-3' R: 5'-GCCAGGCATTGAAGTCTCAT-3'	511
5	V217M- (exon 6- <i>TP53</i>)	F: 5'-AGCGCTGCTCAGATAGCGAT -3' R: 5'-TAAGCAGCAGGAGAAAGCCC -3'	181
6	G360A- (exon 10- <i>TP53</i>)	F: 5'-GCTGTATAGGTAAGTGC -3' R: 5'-CTGTGGATACTGAGG CAAG -3'	433

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

2.3.1. Địa điểm nghiên cứu

- Bộ môn Hóa sinh- Trường Đại học Y Hà Nội.
- Trung tâm Hô hấp, Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu- Bệnh viện Bạch Mai.
- Trung tâm Nghiên cứu Gen & Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

2.3.2. Thời gian nghiên cứu

- Từ tháng 10 năm 2013 đến tháng 10 năm 2017.

2.4. Xử lý số liệu

- Số liệu sau khi làm sạch được nhập và máy bằng phần mềm SPSS 20.0.
- Phân tích số liệu bằng phần mềm SPSS 20.0, sử dụng các thuật toán thống kê:
 - + Kiểm định Khi bình phương được sử dụng trong so sánh 2 tỷ lệ.
 - + Tỷ suất chênh (OR) và 95% khoảng tin cậy của OR được tính toán trong phân tích tương quan...
 - + Mô hình hồi quy logistic đa biến được áp dụng trong phân tích mối tương quan... nhằm khống chế các yếu tố nhiễu.
 - + Mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ được áp dụng.

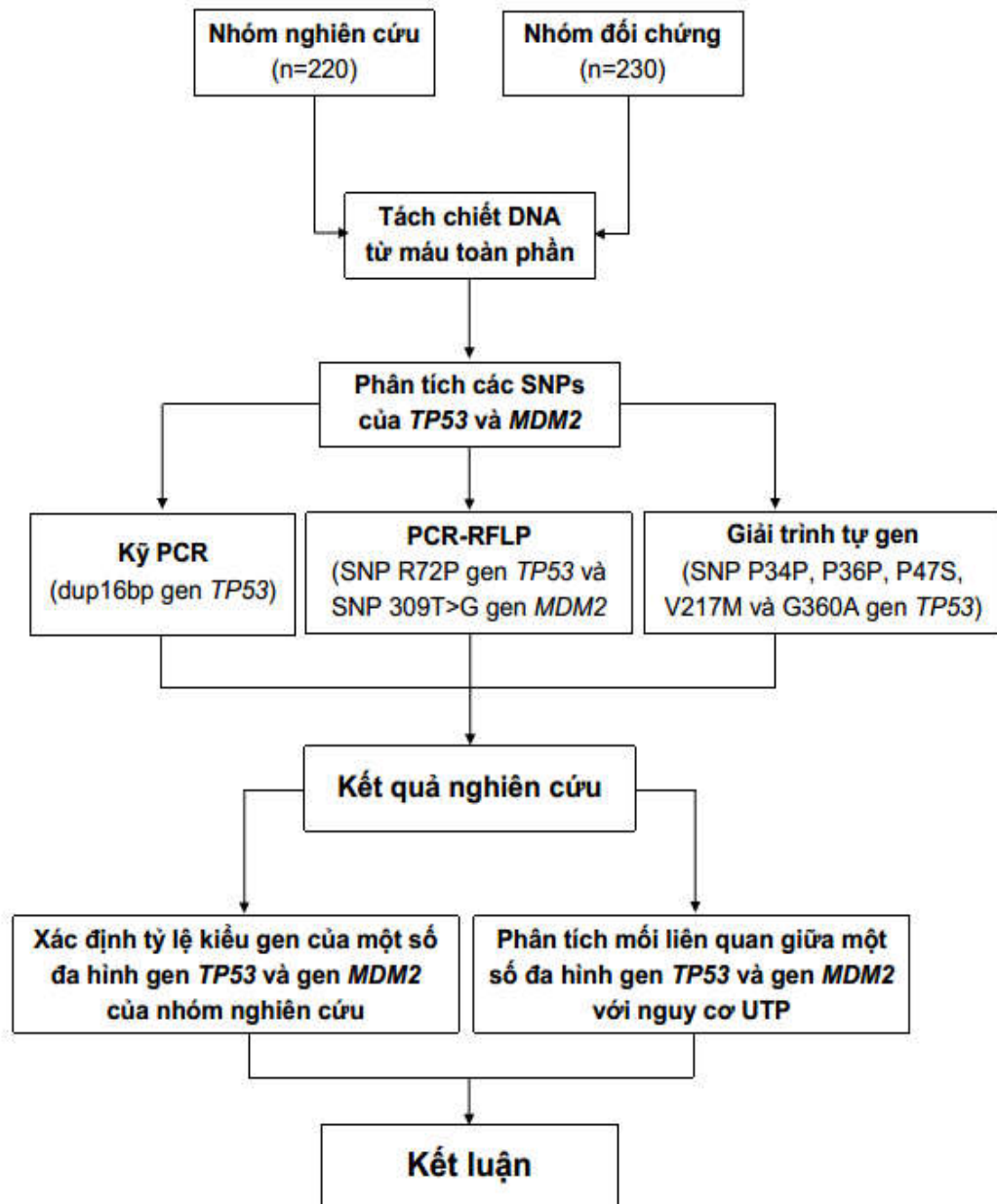
2.5. Đạo đức trong nghiên cứu của đề tài

Đề tài đã được thông qua Hội đồng đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội học theo Quyết định số 188/HĐĐĐĐHYHN, ngày 31/1/2013. Bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không đồng ý tiếp tục tham gia vào nghiên cứu. Các thông tin cá nhân được đảm bảo bí mật.

2.6. Kinh phí thực hiện đề tài

Đề tài được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nhánh cấp nhà nước “*Đánh giá sự phân bố kiểu gen của một số gen liên quan đến ung thư phổi và ung thư gan*” thuộc đề tài nhiệm vụ Quỹ gen “*Đánh giá đặc điểm di truyền người Việt Nam*”.

SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Qua nghiên cứu tính đa hình gen *TP53*, *MDM2* ở 220 bệnh nhân ung thư phổi nguyên phát chẩn đoán tại Trung tâm Hô hấp, Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu- Bệnh viện Bạch Mai và 230 đối chứng từ tháng 10 năm 2013 đến tháng 12 năm 2014, chúng tôi thu được những kết quả như sau:

3.1. Đặc điểm của nhóm đối tượng nghiên cứu

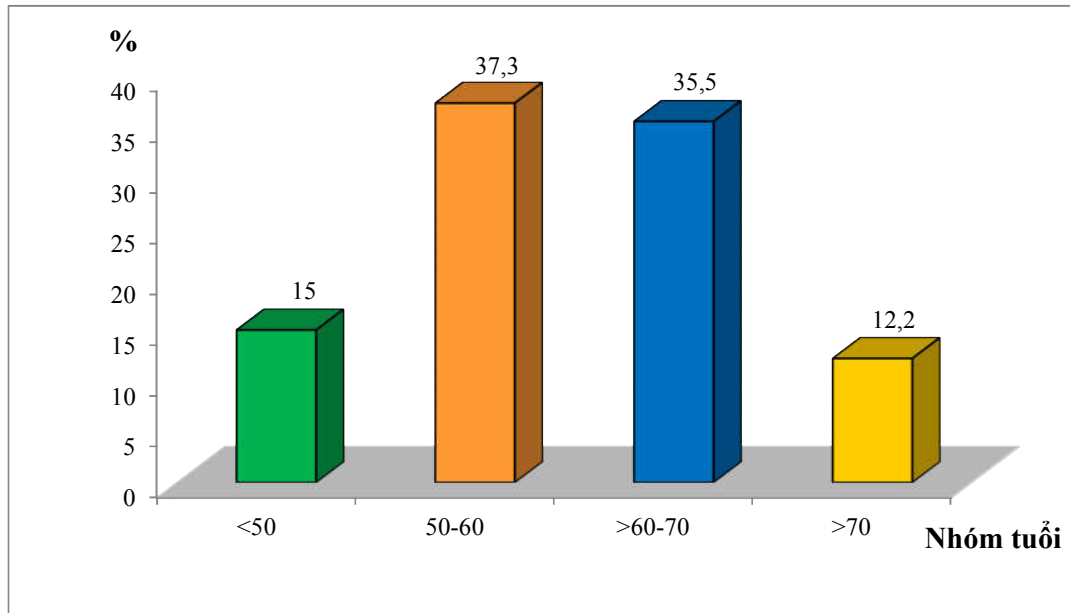
3.1.1. Đặc điểm về tuổi của nhóm nghiên cứu

Bảng 3.1: Đặc điểm về tuổi của nhóm nghiên cứu (tuổi)

Tuổi (năm)	Bệnh nhân ung thư phổi (n=220)		Nhóm chứng (n=230)		p
	n	%	n	%	
$\bar{X} \pm SD$	59,89 \pm 9,432		60,67 \pm 9,335		0,379
Min	33		24		
Max	86		81		

Nhận xét:

- Tuổi trung bình của nhóm bệnh là 59,89 \pm 9,432 không khác biệt với tuổi của nhóm chứng là 60,67 \pm 9,335.

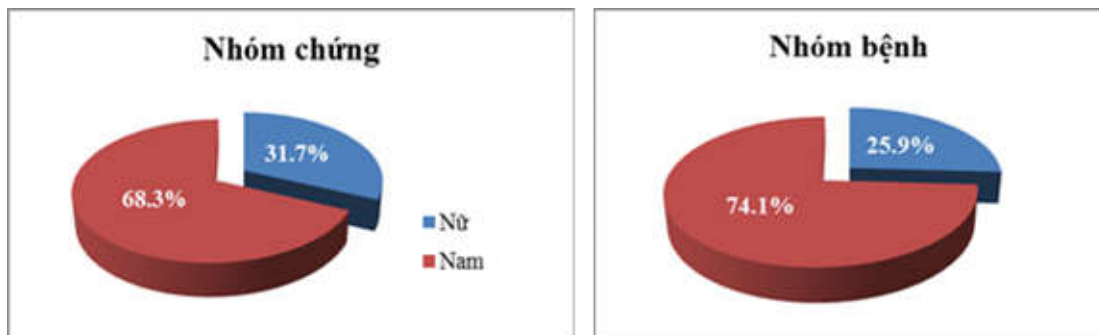


Hình 3.1: Tỷ lệ bệnh nhân ung thư phổi theo nhóm tuổi

Nhận xét:

- Độ tuổi mắc ung thư phổi nhiều nhất từ 50-70 chiếm 72,7%.

3.1.2. Đặc điểm về giới của nhóm nghiên cứu



Hình 3.2: Đặc điểm về giới của nhóm nghiên cứu

Nhận xét:

- Nam mắc ung thư phổi nhiều hơn nữ.
- Tỷ lệ Nam/Nữ trong nhóm ung thư phổi là: 2,86/1.

3.1.3. Tình trạng hút thuốc lá của nhóm nghiên cứu

Bảng 3.2: Tình trạng hút thuốc lá của nhóm nghiên cứu

Đặc điểm		Bệnh nhân ung thư phổi (220)		Nhóm chứng (230)		p
		n	%	n	%	
Tiền sử hút thuốc lá	Có	94	42,7	68	29,6	0,004
	Không	126	57,3	162	70,4	
	< 20 bao-năm	43	45,7	33	48,5	0,726
	>20 bao-năm	51	54,3	35	51,5	

Nhận xét:

- Tỷ lệ hút thuốc lá ở nhóm bệnh là 42,7% cao hơn và có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p=0,004$). Tỷ lệ bệnh nhân ung thư phổi hút thuốc lá > 20 bao-năm là 54,3% không có sự khác biệt với tỷ lệ bệnh nhân ung thư phổi hút thuốc lá < 20 bao-năm là 45,7% ($p=0,726$).
- Không gặp nữ giới hút thuốc lá trong nghiên cứu.

3.1.4. Đặc điểm mô bệnh học của nhóm ung thư phổi

Bảng 3.3: Đặc điểm mô bệnh học của nhóm ung thư phổi

Đặc điểm			Bệnh nhân ung thư phổi (220)	
			n	%
Mô bệnh học	UTBM KTBN	UTBM tuyến	161	73,2
		UTBM vảy	13	5,9
		UTBM loại khác	25	11,4
	UTBM TBN	21	9,5	

Nhận xét:

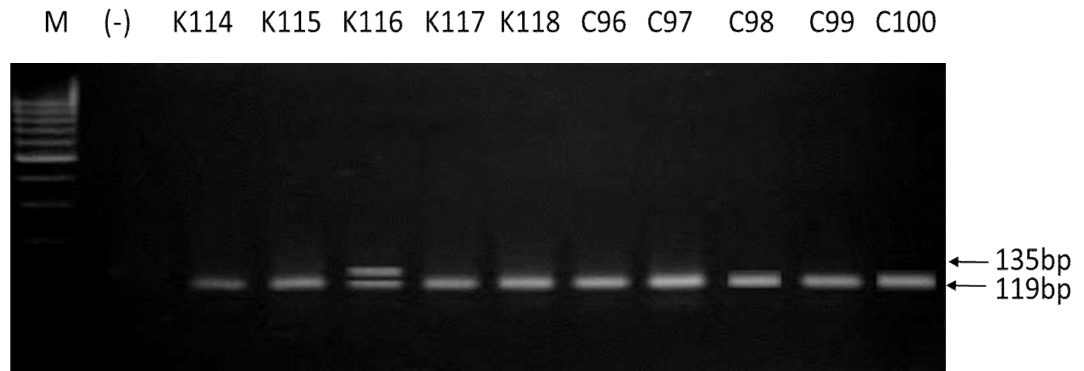
- Ung thư biểu mô tuyến chiếm tỷ lệ cao nhất trong các typ mô bệnh học.

3.2. Kết quả phân tích đa hình kiểu gen *TP53*

3.2.1. Đa hình thêm 16bp tại vùng intron 3 gen *TP53*

3.2.1.1. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại đoạn gen chứa intron 3 của gen *TP53*

Đoạn gen mang vùng intron 3 gen *TP53* được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 3%.



Hình 3.3: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen vùng intron 3 gen *TP53* trên gel agarose 3%

Mẫu K114, K115, K117, K118, C96÷C100: kiểu gen A1A1;

Mẫu K116: kiểu gen A1A2

M: Thang chuẩn 100bp, (-): Chứng âm

Nhận xét:

- Kiểu gen A1A1 có 1 băng duy nhất với kích thước 119bp.
- Kiểu gen A1A2 có 2 băng với các kích thước 119bp và 135bp.
- Băng DNA rõ nét, không có băng phụ đảm bảo việc xác định kiểu gen đa hình thêm 16bp tại vùng intron 3 của gen *TP53*.

3.2.1.2. Kết quả phân tích đa hình do thêm 16 bp tại vùng intron 3 của gen TP53

Bảng 3.4: Kết quả phân tích đa hình do thêm 16bp tại vùng intron 3 của gen TP53 ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng

Đa hình	Ung thư phổi (n=220)		Nhóm chứng (n=230)		OR
	n	%	n	%	
A1A1	212	96,4	226	98,3	1,0
A1A2	8	3,6	4	1,7	2,13 (0,633 - 7,184)

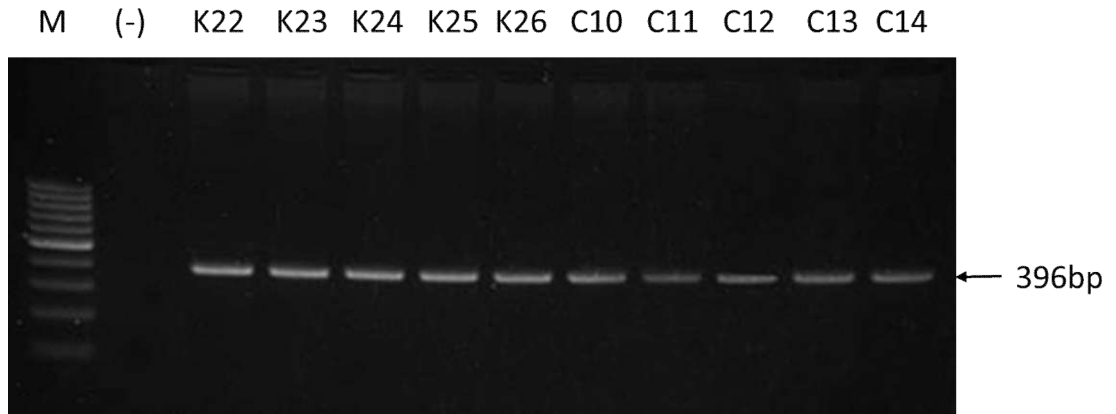
Nhận xét:

Kiểu gen A1A2 chiếm tỷ lệ 3,6% trong nhóm bệnh nhân ung thư phổi cao hơn trong nhóm chứng 1,7%, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.

3.2.2. Đa hình kiểu gen tại SNP R72P gen TP53

3.2.2.1. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại đoạn gen chứa SNP R72P gen TP53

Đoạn gen chứa SNP R72P được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%.



Hình 3.4: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen chứa SNP R72P gen TP53 trên gel agarose 1,5%.

Mẫu K22÷K26, C10÷C14: Đoạn gen chứa SNP R72P

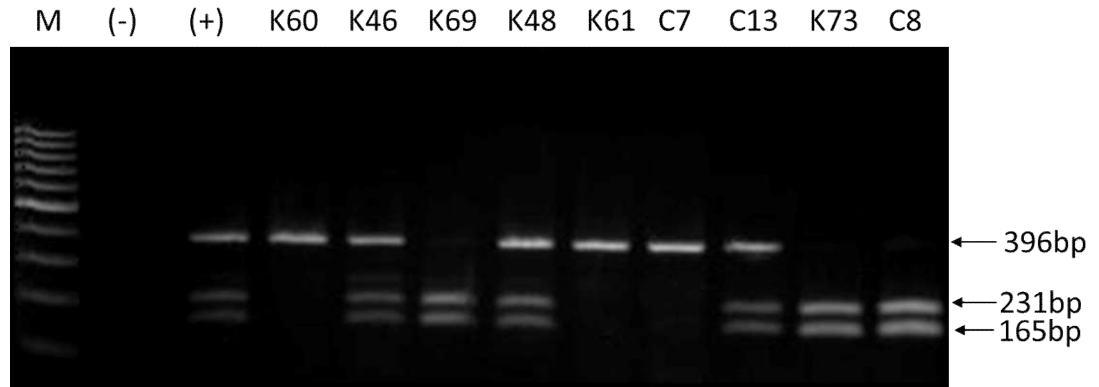
M: Thang chuẩn 100bp, (-): Chứng âm.

Nhận xét:

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR đoạn gen chứa SNP R72P gen TP53 chỉ gồm một băng duy nhất, rõ nét, không có các băng phụ, kích thước 396bp so trên thang DNA chuẩn.

3.2.2.2. Kết quả xác định kiểu gen chứa SNP R72P gen TP53 bằng phương pháp PCR-RFLP

Sản phẩm PCR được ủ với enzym cắt giới hạn *Bst*UI ở điều kiện 37°C trong khoảng thời gian 18-22 giờ. Sản phẩm cắt được điện di cùng với thang chuẩn 100bp trên gel agarose 2%.



Hình 3.5: Hình ảnh điện di sản phẩm cắt đoạn gen *TP53* mang SNP R72P bằng enzym *Bst*UI trên các mẫu nghiên cứu.

M: Thang chuẩn 100bp; (-): Chứng âm; (+): Chứng dương.

Mẫu K60, K61, C7 : Kiểu gen CC (R72P P/P).

Mẫu K69, K73, C8: Kiểu gen GG (R72P R/R).

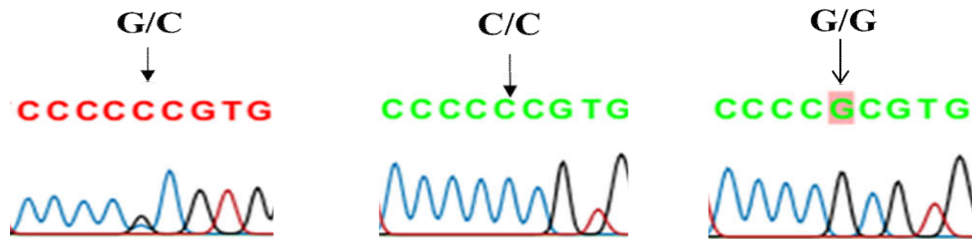
Mẫu K46, K48, C13 : Kiểu gen GC (R72P R/P).

Nhận xét:

Sản phẩm cắt đoạn gen chứa SNP R72P gen *TP53* bởi enzym *Bst*UI gồm các đoạn DNA có kích thước khác nhau, phù hợp với tính toán lý thuyết. Kiểu gen đồng hợp GG (R72P R/R) gồm 2 đoạn DNA có kích thước tương ứng là 165bp và 231bp (mẫu K69, K73, C8). Kiểu gen đồng hợp CC (R72P P/P) khi điện di chỉ xuất hiện 1 băng DNA duy nhất có kích thước 396bp (mẫu K60, K61, C7). Sản phẩm điện di của kiểu gen dị hợp tử GC (R72P R/P) gồm 3 băng với các kích thước tương ứng: 396bp, 231bp và 165bp (mẫu K46, K48, C13).

3.2.2.3. Kết quả kiểm tra kiểu gen tại vị trí SNP R72P bằng phương pháp giải trình tự gen

Sau khi được khuếch đại, sản phẩm PCR mang SNP R72P của gen *TP53* được tinh sạch và tiến hành phản ứng giải trình tự. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench sau đó được so sánh với trình tự chuẩn của gen *TP53* trên GeneBank.



Hình 3.6: Kết quả giải trình tự exon 4 gen TP53 chứa SNP R72P tương ứng với các kiểu gen GC (R72P R/P), CC (R72P P/P), GG (R72P R/R).

Tại vị trí nucleotid thứ 2 của codon 72: Kiểu gen GC (R72P R/P) có 2 đỉnh nucleotid G và C với màu sắc tương ứng. Kiểu gen CC (R72P P/P): có 1 đỉnh nucleotid C duy nhất với màu sắc tương ứng. Kiểu gen GG (R72P R/R): có 1 đỉnh nucleotid G duy nhất với màu sắc tương ứng.

Nhận xét:

Hình 3.6 cho thấy:

- Sản phẩm giải trình tự rõ nét. Các đỉnh màu tương ứng với các nucleotid rõ ràng và không có tín hiệu nhiễu.
- Kết quả giải trình tự DNA của mẫu nghiên cứu cho thấy hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích PCR-RFLP.

3.2.2.4. Kết quả phân tích kiểu gen SNP R72P gen TP53 bằng phương pháp PCR-RFLP ở nhóm nghiên cứu.

Bảng 3.5: Tỷ lệ các kiểu gen SNP R72P của gen TP53 ở nhóm nghiên cứu

Kiểu alen/gen	Tổng số nhóm nghiên cứu (n=450)	
	n	%
G	433	48,1
C	467	51,9
GG	117	26
GC	199	44,2
CC	134	29,8

Nhận xét:

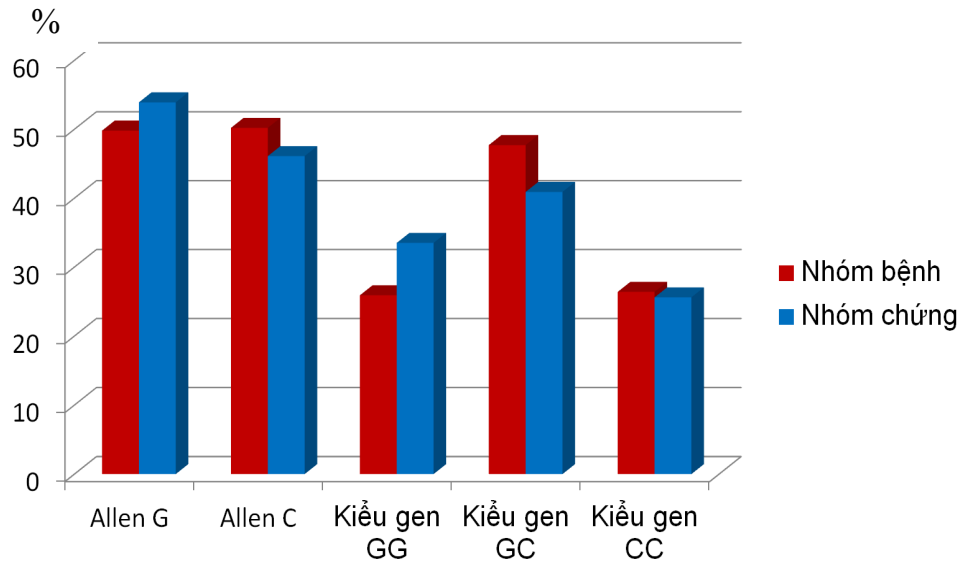
- Tỷ lệ alen G trong nhóm nghiên cứu gần bằng alen C.
- Kiểu gen đồng hợp GG có tần suất gần tương đương so với kiểu gen CC.
- Kiểu gen dị hợp GC chiếm tỷ lệ cao nhất trong nhóm nghiên cứu.

Bảng 3.6: Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của SNP TP53-R72P giữa nhóm bệnh và chứng

Kiểu gen	Nhóm bệnh (n=220)		Nhóm chứng (n=230)		p
	n	%	n	%	
Alen G	219	49,8	248	53,9	0,214
Alen C	221	50,2	212	46,1	
GG	57	25,9	77	33,5	0.184
GC	105	47,7	94	40,9	
CC	58	26,4	59	25,7	

Nhận xét:

- Kiểu gen dị hợp tử G/C codon 72 gen *TP53* chiếm tỷ lệ cao nhất ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng.



Hình 3.7: Phân bố các kiểu gen của SNP TP53-R72P giữa nhóm bệnh và chứng

Nhận xét:

- Alen C có tỷ lệ cao hơn ở nhóm bệnh tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.
- Kiểu gen dị hợp GC có tỷ lệ cao nhất ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng.

Bảng 3.7: Các kiểu gen SNP R72P của gen TP53 và nguy cơ mắc ung thư phổi

Đa hình		Ung thư phổi (n=220)		Nhóm chứng (n=230)		OR, 95%CI
		n	%	n	%	
Alen	G	219	49,8	248	53,9	1,0
	C	221	50,2	212	46,1	1,18 (0,91 – 1,53)
Kiểu gen	G/G	57	25,9	77	33,5	1,0
	G/C	105	47,7	94	40,9	1,51 (0,97 - 2,35)
	C/C	58	26,4	59	25,7	1,33 (0,81 - 2,19)
Kết hợp gen lặn	G/G+G/C	162	73,6	171	74,3	1,0
	C/C	58	26,4	59	25,7	1,04 (0,68 - 1,58)
Kết hợp gen trội	G/G	57	25,9	77	33,5	1,0
	G/C + C/C	163	74,1	153	66,5	1,44 (0,96 - 2,16)

Nhận xét:

- Kiểu gen dị hợp tử G/C codon 72 gen TP53 chiếm tỷ lệ cao nhất ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng.
- Kiểu gen G/C và C/C codon 72 gen TP53 có khả năng làm tăng nguy cơ ung thư phổi nhưng mối liên quan trên chưa có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.8: Độ tuổi trung bình của bệnh nhân ung thư phổi mang các kiểu gen TP53 SNP R72P (năm)

Đặc điểm		Độ tuổi trung bình (Mean ± SD)	<i>p</i>
Kiểu gen TP53-R72P	GG	60,87 ± 8,700	0,538
	GC	60,34 ± 9,588	
	CC	59,55 ± 9,795	

Nhận xét:

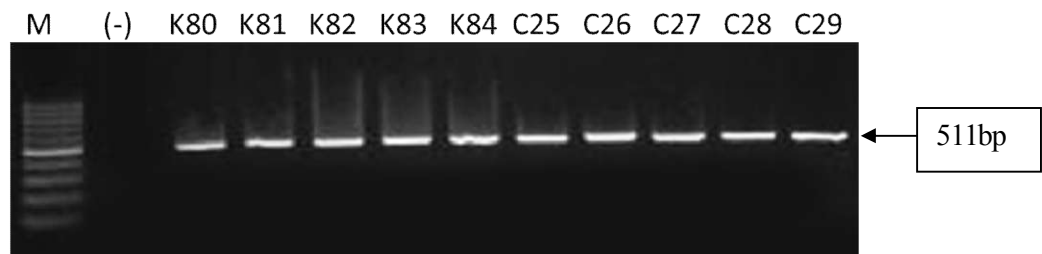
Tuổi trung bình của các nhóm bệnh nhân mang 3 kiểu gen tại SNP R72P gen TP53: kiểu gen CC có tuổi trung bình thấp nhất tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

3.2.3. Xác định một số SNP không có vị trí cắt enzym giới hạn

3.2.3.1. SNPs không có vị trí cắt enzym giới hạn P34P (CCC → CCA), P36P (CCG → CCT), P47S (CCG → CTG)

❖ Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại exon 4 gen TP53

Do các codon 34, 36, 47 đều nằm trên exon 4 nên chúng tôi tiến hành khuếch đại exon 4 để giải trình tự toàn bộ exon 4. Sản phẩm PCR khuếch đại exon 4 gen TP53 được điện di trên gel agarose 1.5%.



Hình 3.8: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 4 gen TP53 mang SNP: P34P, P36P, P47S

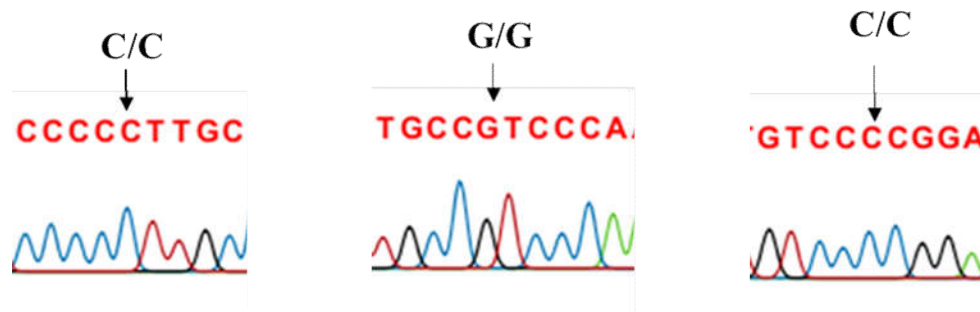
M: Thang chuẩn 100bp, (-): Chứng âm,

Mẫu K80÷K84, C25÷C29: Exon 4 gen TP53 được khuếch đại

Nhận xét:

Hình 3.8 cho thấy: sản phẩm PCR của exon 4 gen *TP53* chỉ gồm một băng duy nhất, rõ nét, không có các băng phụ, kích thước 511bp so trên thang DNA chuẩn.

- ❖ Hình ảnh kết quả giải trình tự exon 4 xác định kiểu gen của các SNPs tại các vị trí codon 34, 36, 47.



Hình 3.9: Hình ảnh kết quả giải trình tự exon 4 gen *TP53* mang SNP: P34P, P36P, P47S tương ứng với các kiểu gen C/C, G/G, C/C.

Nhận xét:

Hình 3.9 cho thấy:

- Sản phẩm giải trình tự rõ nét, các đỉnh màu tương ứng với các nucleotid rõ ràng và không có tín hiệu nhiễu. Khi so sánh với trình tự gen *TP53* trên GeneBank cho thấy các tại các codon này không có sự thay thế nucleotid của các bộ 3 mã hóa.
- Kết quả tương tự khi phân tích ở nhóm ung thư phổi và nhóm chứng.
- ❖ Tỷ lệ kiểu gen của một số SNP không có vị trí cắt enzym giới hạn 34 (CCC → CCA), 36 (CCG → CCT), 47(CCG → CTG).

Bảng 3.9: Tỷ lệ kiểu gen của một số SNP không có vị trí cắt enzym giới hạn P34P (CCC → CCA), P36P (CCG → CCT), P47S (CCG → CTG)

Kiểu gen	Nhóm bệnh		Nhóm chứng	
	n	%	n	%
P34P(C/C)	220	100	230	100
P36P (G/G)	220	100	230	100
P47S (C/C)	220	100	230	100

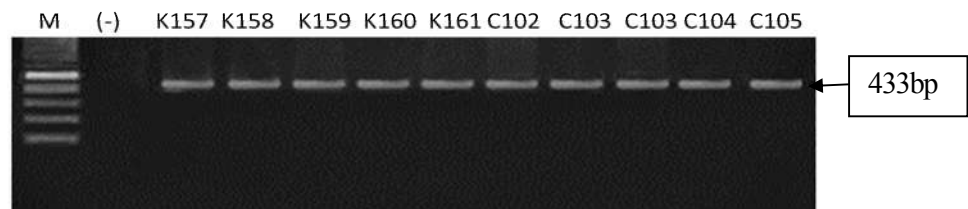
Nhận xét:

Tất cả các mẫu nghiên cứu đều mang cùng một kiểu gen tại các vị trí codon 34, 36 và 47 của gen *TP53*.

3.2.3.2. SNP G360A gen *TP53*

- ❖ Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại exon 10 mang SNP G360A gen *TP53*.

Đoạn gen chứa SNP G360A được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%.



Hình 3.10: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 10 gen *TP53* chứa SNP G360A trên gel agarose 1,5%

M: thang chuẩn 100bp (-): chứng âm.

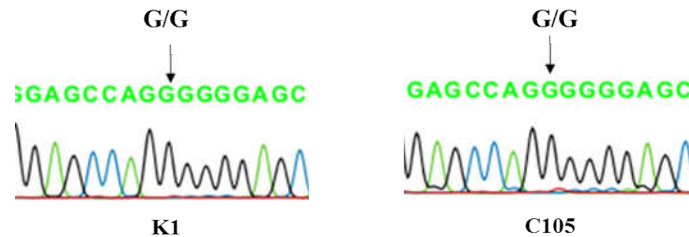
Mẫu K157÷K161, C102÷C105: Exon 10 gen *TP53* được khuếch đại.

Nhận xét:

Sản phẩm PCR của exon 10 gen *TP53* chỉ gồm một băng duy nhất, rõ nét, không có các băng phụ, kích thước 433bp so trên thang DNA chuẩn. Như

vậy, sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu, đảm bảo cho kỹ thuật giải trình tự gen tiếp theo để xác định tính đa hình codon 360 trên gen *TP53*.

❖ Hình ảnh kết quả giải trình tự exon 10 xác định SNP G360A gen *TP53*



Hình 3.11: Kết quả giải trình tự exon 10 xác định kiểu gen tại SNP G360A gen *TP53*

Nhận xét:

- Hình 3.11 cho thấy: Sản phẩm giải trình tự rõ nét, các đỉnh màu tương ứng với các nucleotid rõ ràng và không có tín hiệu nhiễu. Khi so sánh với trình tự gen *TP53* trên GeneBank cho thấy các tại codon này không có sự thay thế nucleotid G thành C ở vị trí nucleotid thứ 2 của bộ 3 mã hóa.
- Kết quả tương tự khi phân tích ở nhóm ung thư phổi và nhóm chứng.
- ❖ Tỷ lệ các kiểu gen tại SNP G360A gen *TP53*(GGG→GCG)

Bảng 3.10: Tần số các kiểu gen tại codon 360 gen TP53

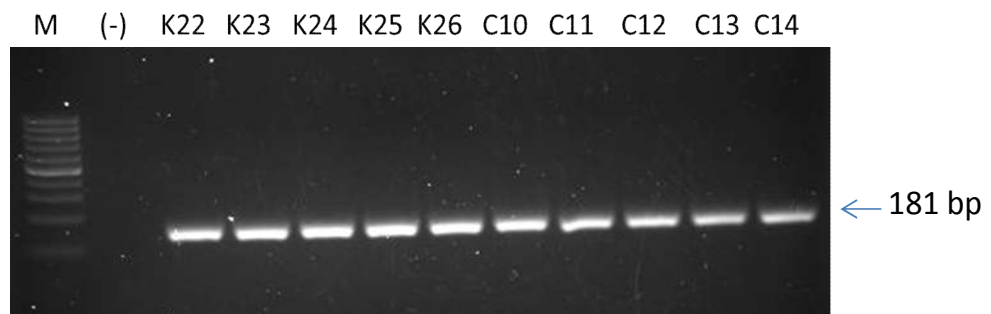
Kiểu gen	Nhóm bệnh (n=220)		Nhóm chứng (n=230)	
	n	%	n	%
Alen G	440	100	460	100
Alen C	0	0	0	0
GG	220	100	230	100
GC	0	0	0	0
CC	0	0	0	0

Nhận xét: Tất cả các mẫu nghiên cứu đều mang cùng 1 kiểu gen GG.

3.2.3.3. Đa hình kiểu gen tại SNP V217M (GTG → ATG)

- ❖ Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại exon 6 mang SNP V217M gen TP53

Đoạn gen chứa SNP V217M được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%.



Hình 3.12: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 6 gen TP53 chứa SNP V217M trên gel agarose 2%

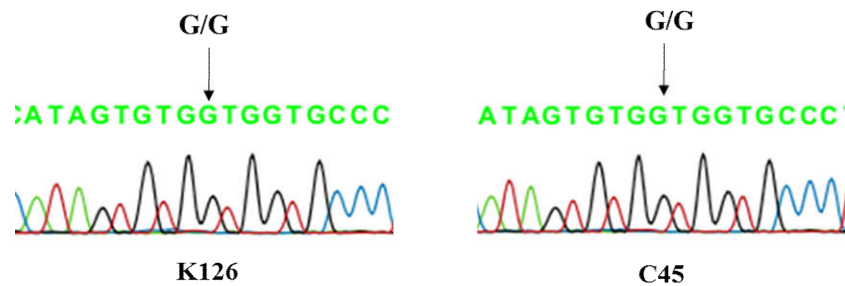
M: thang chuẩn 100bp; (-): chứng âm

Mẫu K22÷K26, C10÷C14: Exon 6 gen TP53 được khuếch đại

Nhận xét:

Sản phẩm PCR của exon 6 gen TP53 chỉ gồm một băng duy nhất, rõ nét, không có các băng phụ, kích thước 181bp so trên thang DNA chuẩn. Như vậy, sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu, đảm bảo cho kỹ thuật giải trình tự gen tiếp theo để xác định tính đa hình codon 217 trên gen TP53.

❖ Hình ảnh kết quả giải trình tự exon 6 xác định SNP V217M gen *TP53*



Hình 3.13: Kết quả giải trình tự exon 6 xác định kiểu gen tại SNP V217M gen *TP53*

Nhận xét:

Hình 3.13 cho thấy:

- Sản phẩm giải trình tự rõ nét, các đỉnh màu tương ứng với các nucleotid rõ ràng và không có tín hiệu nhiễu. Khi so sánh với trình tự gen *TP53* trên GeneBank cho thấy các tại codon này không có sự thay thế nucleotid G thành A ở vị trí nucleotid thứ nhất của bộ 3 mã hóa.
- Kết quả tương tự khi phân tích ở nhóm ung thư phổi và nhóm chứng.

❖ Tỷ lệ các kiểu gen tại SNP V217M gen *TP53* (GTG→ATG)

Bảng 3.11: Tỷ lệ các kiểu gen tại codon 217 gen *TP53*

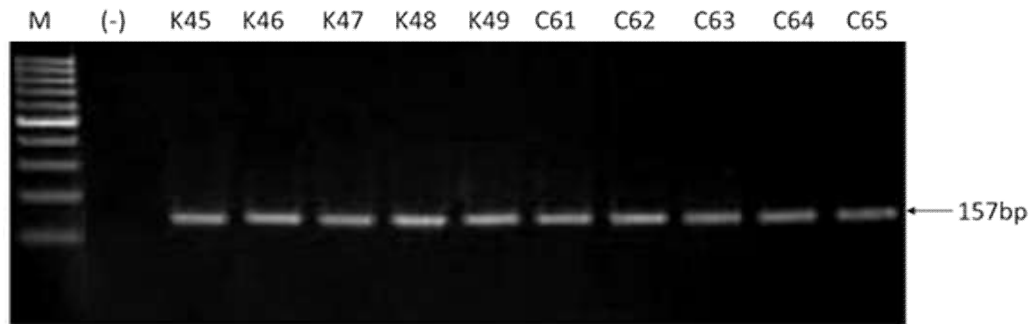
Kiểu gen	Nhóm bệnh (n=220)		Nhóm chứng (n=230)	
	n	%	n	%
Alen G	440	100	460	100
Alen A	0	0	0	0
GG	220	100	230	100
GA	0	0	0	0
AA	0	0	0	0

Nhận xét: Tất cả các mẫu nghiên cứu đều mang cùng 1 kiểu gen GG.

3.3. Kết quả phân tích đa hình kiểu gen SNP 309T>G gen *MDM2*

3.3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại đoạn gen mang SNP 309T>G của gen *MDM2*

Đoạn gen mang SNP 309T>G gen *MDM2* được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 2%.



Hình 3.14: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn gen mang SNP 309T>G của gen *MDM2*

M: Thang chuẩn 100bp; (-): Chứng âm;

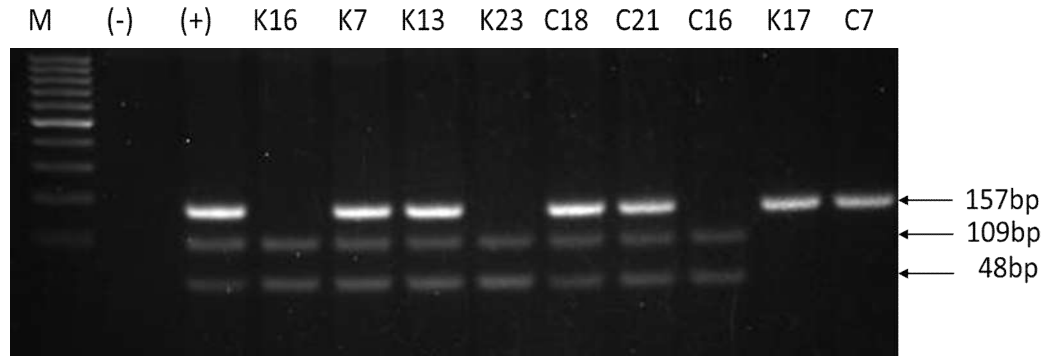
Mẫu K45÷K49, C61÷C65: Khuếch đại đoạn gen mang SNP 309T>G của gen *MDM2*

Nhận xét:

Sản phẩm PCR của đoạn gen chứa SNP 309T>G gen *MDM2* chỉ gồm một băng duy nhất, rõ nét, không có các băng phụ, kích thước 157bp so trên thang DNA chuẩn.

3.3.2. Kết quả xác định kiểu gen tại SNP 309T>G gen *MDM2* bằng phương pháp PCR-RFLP

Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen mang SNP 309 T>G được ủ với enzym cắt giới hạn *MspA1i* ở điều kiện 37°C trong khoảng thời gian 18-22 giờ. Sản phẩm cắt được điện di cùng với thang chuẩn 100-1000 bp trên gel agarose 3%.



Hình 3.15: Hình ảnh điện di sản phẩm cắt đoạn gen *MDM2* mang SNP 309T>G bằng enzym *MspA1* trên các mẫu nghiên cứu.

Mẫu K17, C7: Kiểu gen đồng hợp tử T/T.

Mẫu K16, K23, C16: Kiểu gen đồng hợp tử G/G.

Mẫu K7, K13, C18, C21: Kiểu gen dị hợp tử T/G.

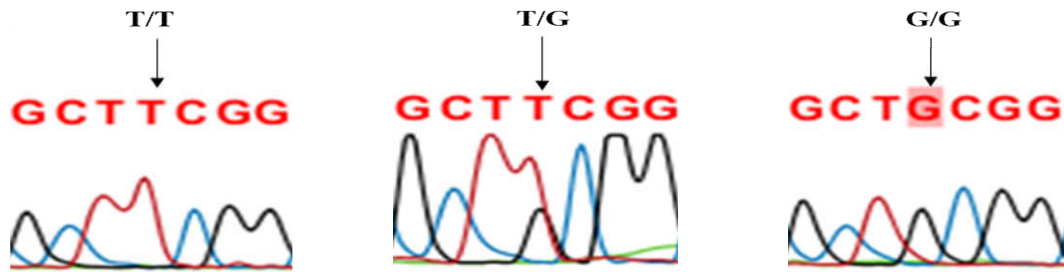
M: Thang chuẩn 100bp; (-): Chứng âm, (+): Chứng dương.

Nhận xét:

Sản phẩm cắt gồm các đoạn DNA có kích thước khác nhau, phù hợp với tính toán lý thuyết. Mẫu mang kiểu gen T/T gồm 1 băng DNA có kích thước 157bp (mẫu K17, C7). Mẫu mang kiểu gen G/G gồm 2 băng DNA có kích thước 109 bp và 48 bp (mẫu K16, K23, C16). Mẫu mang kiểu gen dị hợp tử T/G gồm 3 băng DNA có kích thước 157bp, 109 bp và 48 bp (mẫu K7, K13, C18, C21).

3.3.3. Kết quả kiểm tra kiểu gen tại vị trí SNP 309T>G gen *MDM2* bằng phương pháp giải trình tự gen

Sau khi được khuếch đại, sản phẩm PCR mang SNP 309T>G gen *MDM2* được tinh sạch và tiến hành phản ứng giải trình tự kiểm tra kiểu gen. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench sau đó được so sánh với trình tự chuẩn của gen *MDM2* trên GeneBank.



Hình 3.16: Kết quả giải trình tự đoạn gen chứa SNP 309T>G gen MDM2 tương ứng kiểu gen T/T, T/G, G/G

Tại vị trí nucleotid thứ 309 intron1 gen *MDM2*: Kiểu gen T/T có 1 đỉnh nucleotid T duy nhất với màu sắc tương ứng. Kiểu gen T/G: có 2 đỉnh nucleotid T và G với màu sắc tương ứng. Kiểu gen G/G: có 1 đỉnh nucleotid G duy nhất với màu sắc tương ứng.

Nhận xét:

Hình 3.16 cho thấy:

- Sản phẩm giải trình tự rõ nét. Các đỉnh màu tương ứng với các nucleotid rõ ràng và không có tín hiệu nhiễu.
- Kết quả giải trình tự DNA của mẫu nghiên cứu cho thấy hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích PCR-RFLP.

3.3.4. Kết quả phân tích kiểu gen SNP 309T>G gen MDM2 ở nhóm nghiên cứu

Bảng 3.12: Tỷ lệ các kiểu gen SNP 309T>G của gen MDM2 ở nhóm nghiên cứu

Kiểu alen/gen	Tổng số nhóm nghiên cứu (n=450)	
	n	%
T	458	50,9
G	442	49,1
TT	115	25,6
TG	228	50,7
GG	107	23,8

Nhận xét:

Bảng 3.12 cho thấy:

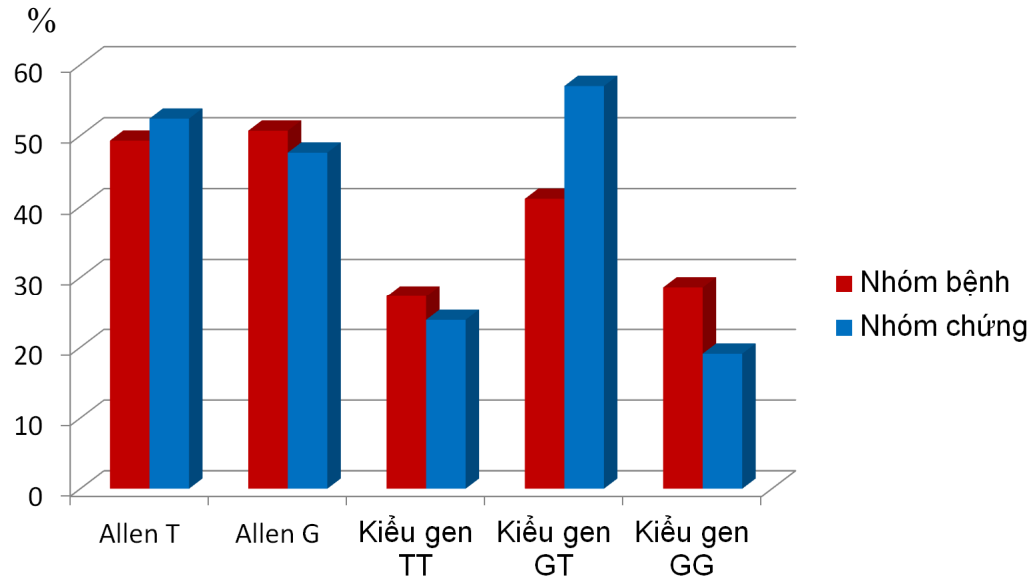
- Tỷ lệ alen G trong nhóm nghiên cứu gần bằng alen T.
- Kiểu gen đồng hợp TT có tần suất gần tương đương so với kiểu gen CC.
- Kiểu gen dị hợp TG chiếm tỷ lệ cao nhất trong nhóm nghiên cứu.

Bảng 3.13: Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của SNP MDM2-309T>G giữa nhóm bệnh và chứng

Kiểu gen	Nhóm bệnh (n=220)		Nhóm chứng (n=230)		p
	n	%	n	%	
Alen T	217	49,3	241	52,4	0,357
Alen G	223	50,7	219	47,6	
TT	60	27,3	55	23,9	0,015
GT	97	44,1	131	57,0	
GG	63	28,6	44	19,1	

Nhận xét:

- Kiểu gen GG có tần suất cao hơn ở nhóm bệnh (28,6%) so với nhóm chứng (19,1%). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p=0,015$.



Hình 3.17: Phân bố các kiểu gen của SNP MDM2-309T>G giữa nhóm bệnh và chứng

Nhận xét:

- Alen đột biến G chiếm tỷ lệ cao hơn ở nhóm bệnh, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

- Kiểu gen GG chiếm tỷ lệ cao hơn ở nhóm bệnh với $p=0,015$.

Bảng 3.14: Độ tuổi trung bình của bệnh nhân ung thư phổi mang kiểu các kiểu gen của SNP MDM2-309T>G (tuổi)

Kiểu gen MDM2 309T>G	Độ tuổi trung bình (Mean ± SD)	<i>p</i>
TT	60,94 ± 8,967	0,691
TG	60,06 ± 9,012	
GG	60,08 ± 10,568	

Nhận xét:

- Không ghi nhận sự khác biệt về tuổi giữa các nhóm bệnh nhân ung thư phổi mang các kiểu gen khác nhau tại SNP 309T>G gen *MDM2*.

3.3.5. Các kiểu gen SNP 309T>G của gen *MDM2* và nguy cơ mắc ung thư phổi

Bảng 3.15: Các kiểu gen SNP 309T>G của gen *MDM2* và nguy cơ mắc ung thư phổi

Đa hình		Ung thư phổi (n=220)		Nhóm chứng (n=230)		OR, 95%CI	OR*, 95%CI
		n	%	n	%		
Alen	T	217	49,3	241	52,4	1,0	
	G	223	50,7	219	47,6	1,13 (0,87 – 1,47)	
Kiểu gen	TT	60	27,3	55	23,9	1,0	1,0
	TG	97	44,1	131	57,0	0,68 (0,43 – 1,07)	0,65 (0,41 – 1,03)
	GG	63	28,6	44	19,1	1,31 (0,77 – 2,32)	1,10 (0,84 – 1,44)
Kết hợp gen lặn	TT+TG	157	71,4	186	80,9	1,0	1,0
	GG	63	28,6	44	19,1	1,7 (1,09 – 2,63)	1,61 (1,03 – 2,51)
Kết hợp gen trội	TT	60	27,3	55	23,9	1,0	1,0
	TG + GG	160	72,7	175	76,1	0,84 (0,55 – 1,28)	0,78 (0,51 – 1,20)

OR* được điều chỉnh theo các biến: tuổi, giới, tình trạng hút thuốc lá theo mô hình hồi quy logistic đa biến.

Nhận xét:

- Kiểu gen dị hợp tử SNP 309T>G chiếm tỷ lệ cao nhất ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng.

- Kiểu gen đồng hợp tử SNP 309GG làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi 1,7 lần theo mô hình gen lặn (OR = 1,7; 95% CI= 1,09 – 2,63).
- Khi hiệu chỉnh theo các biến tuổi, giới và tình trạng hút thuốc lá theo mô hình hồi quy logistic đa biến vẫn cho thấy kiểu gen đồng hợp tử SNP 309GG làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi 1,61 lần theo mô hình gen lặn (OR = 1,61; 95% CI= 1,03 – 2,51).

3.4. Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *TP53* và gen *MDM2* với nguy cơ mắc ung thư phổi

3.4.1. Mối liên quan giữa đa hình gen *TP53* và nguy cơ mắc ung thư phổi theo một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trong ung thư phổi

3.4.1.1. Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *TP53* SNP R72P và nguy cơ mắc ung thư phổi theo giới

Bảng 3.16: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *TP53* SNP R72P và nguy cơ mắc ung thư phổi theo giới

Nhóm	OR _{CC/GG} (95%CI)	OR _{GC/GG} (95%CI)	OR _{CC/GC+CC} (95%CI)	OR _{CC+GC/GG} (95%CI)
Nam	1,24 (0,69 - 2,21)	1,48 (0,88 - 2,51)	0,98 (0,60 - 1,60)	1,38 (0,85 - 2,34)
Nữ	1,563 (0,59 - 4,13)	1,62 (0,71 - 3,69)	1,16 (0,51 - 2,63)	1,6 (0,84 - 3,47)

Nhận xét:

Chưa ghi nhận mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa kiểu gen SNP R72P gen *TP53* với nguy cơ ung thư phổi theo giới.

3.4.1.2. *Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen TP53 SNP R72P và nguy cơ mắc ung thư phổi theo đặc điểm mô bệnh học*

Bảng 3.17: *Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen TP53 SNP R72P và nguy cơ mắc ung thư phổi theo mô bệnh học*

Nhóm	OR_{CC/GG} (95%CI)	OR_{GC/GG} (95%CI)	OR_{CC/GC+CC} (95%CI)	OR_{CC+GC/GG} (95%CI)
UTBM không tế bào nhỏ	1,35 (0,82 - 2,25)	1,39 (0,88 - 2,19)	1,12 (0,73 - 1,71)	1,38 (0,91 - 2,09)
UTBM tế bào nhỏ	0,98 (0,21 - 4,54)	3,07 (0,98 - 9,64)	0,46 (0,13 - 1,60)	2,27 (0,74 - 6,92)
UTBM tuyến	1,25 (0,73 - 2,14)	1,40 (0,87 - 2,54)	1,02 (0,65 - 1,62)	1,34 (0,86 - 2,08)
UTBM vảy	1,31 (0,31 - 5,44)	1,02 (0,27 - 3,95)	1,29 (0,38 - 4,34)	1,13 (0,34 - 3,79)

Nhận xét:

Chưa ghi nhận mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa kiểu gen SNP R72P gen *TP53* với nguy cơ ung thư phổi theo giới.

3.4.1.3. *Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen TP53 SNP R72P và nguy cơ mắc ung thư phổi theo tình trạng hút thuốc lá*

Bảng 3.18: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen TP53 SNP R72P và nguy cơ mắc ung thư phổi theo trình trạng hút thuốc lá

Nhóm	OR _{CC/GG} (95%CI)	OR _{GC/GG} (95%CI)	OR _{CC/GC+CC} (95%CI)	OR _{CC+GC/GG} (95%CI)
Có hút thuốc	1,77 (0,74 - 4,26)	1,39 (0,68 - 2,87)	1,45 (0,68 - 3,11)	1,51 (0,77 - 2,96)
Không hút thuốc	1,22 (0,66 - 2,28)	1,58 (0,90 - 2,77)	0,93 (0,55 - 1,57)	1,43 (0,85 - 1,68)
Hút thuốc <20 bao-năm	3,14 (0,71 - 13,96)	0,86 (0,31 - 2,36)	3,44 (0,87 - 13,53)	1,18 (0,46 - 3,07)
Hút thuốc >20 bao-năm	1,42 (0,44 - 4,53)	2,27 (0,79 - 6,49)	0,86 (0,33 - 2,25)	1,90 (0,72 - 4,98)

Nhận xét:

Chưa có mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa kiểu gen SNP R72P gen TP53 với nguy cơ ung thư phổi theo tình trạng hút thuốc lá.

3.4.2. *Mối liên quan giữa đa hình gen MDM2 SNP 309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trong ung thư phổi*

3.4.2.1. *Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen MDM2 SNP309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo giới*

Bảng 3.19: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen MDM2 SNP 309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo giới

Nhóm	OR _{GG/TT} (95%CI)	OR _{TG/TT} (95%CI)	OR _{GG/TG+TT} (95%CI)	OR _{TG+GG/TT} (95%CI)
Nam	1,31 (0,71 - 2,43)	0,69 (0,41 - 1,18)	1,66 (1,01 - 2,76)	0,87 (0,526 - 1,43)
Nữ	1,26 (0,43 - 3,67)	0,67 (0,29 - 1,56)	1,67 (0,68 - 4,06)	0,79 (0,35 - 1,77)

Nhận xét:

- Kiểu gen đồng hợp tử SNP 309GG làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi ở nam giới 1,66 lần theo mô hình gen lặn (OR=1,66; 95% CI=1,01-2,76).

3.4.2.2. *Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen MDM2 SNP 309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo mô bệnh học*

Bảng 3.20: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen MDM2 SNP309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo mô bệnh học

Nhóm	OR _{GG/TT} (95%CI)	OR _{TG/TT} (95%CI)	OR _{GG/TG+TT} (95%CI)	OR _{TG+GG/TT} (95%CI)
UTBM không tế bào nhỏ	1,37 (0,79 – 2,37)	0,72 (0,45 – 1,14)	1,71 (1,09 – 2,68)	0,88 (0,57 – 1,37)
UTBM tế bào nhỏ	0,94 (0,30 – 2,90)	0,42 (0,15 – 1,18)	1,59 (0,59 – 4,28)	0,55 (0,22 – 1,38)
UTBM tuyến	1,40 (0,79 – 2,50)	0,76 (0,46 – 1,24)	1,69 (1,05 – 2,72)	0,92 (0,58 – 1,47)
UTBM vảy	2,50 (0,44 – 14,29)	1,47 (2,97 – 7,30)	1,88 (0,55 – 6,38)	1,73 (0,37 – 8,04)

Nhận xét:

- Kiểu gen đồng hợp tử SNP 309GG trong nhóm có hút thuốc lá làm tăng nguy cơ mắc UTBM không tế bào nhỏ 1,71 lần (OR=1,71; 95% CI= 1,09-2,68) và UTBM tuyến 1,69 lần (OR=1,69; 95% CI= 1,05-2,72) theo mô hình gen lặn.

3.4.2.3. *Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen MDM2 SNP 309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo tình trạng hút thuốc lá*

Bảng 3.21: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen MDM2 SNP 309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo tình trạng hút thuốc lá

Nhóm	OR _{GG/TT} (95%CI)	OR _{TG/TT} (95%CI)	OR _{GG/TG+TT} (95%CI)	OR _{TG+GG/TT} (95%CI)
Có hút thuốc	1,86 (0,74 – 4,68)	0,85 (0,38 – 1,90)	2,09 (1,01 – 4,31)	1,12 (0,52 – 2,40)
Không hút thuốc	0,98 (0,50 – 1,90)	0,58 (0,34 – 1,01)	1,38 (0,78 – 2,43)	0,68 (0,41 – 1,14)
Hút thuốc <20 bao-năm	1,86 (0,48 – 7,26)	0,92 (0,28 – 3,04)	1,99 (0,70 – 5,65)	1,18 (0,37 – 3,66)
Hút thuốc >20 bao-năm	1,87 (0,53 – 6,60)	0,80 (0,27 – 2,39)	2,18 (0,80 – 5,98)	1,08 (0,38 – 3,03)

Nhận xét:

- Kiểu gen đồng hợp tử SNP 309GG trong nhóm có hút thuốc lá làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi 2,09 lần theo mô hình gen lặn (OR= 2,09; 95% CI= 1,01-4,31).

3.4.3. Nguy cơ mắc ung thư phổi khi kết hợp đa hình gen TP53 SNP R72P và gen MDM2 SNP 309T>G

3.4.3.1. Nguy cơ mắc ung thư phổi khi kết hợp đa hình gen TP53 SNP R72P và gen MDM2 SNP 309T>G với hút thuốc lá

Bảng 3.22: Nguy cơ mắc ung thư phổi khi kết hợp đa hình gen TP53 SNP R72P và gen MDM2 SNP 309T>G với hút thuốc lá

Đặc điểm	ung thư phổi		Nhóm chứng		OR
	n	%	n	%	
Không hút thuốc	126	57,3	162	70,4	1,00
Hút thuốc	94	42,7	68	29,6	1,78 (1,20 - 2,62)
Hút thuốc < 20 bao.năm	43	45,7	33	48,5	1,68 (1,01 – 2,79)
Hút thuốc > 20 bao.năm	51	54,3	35	51,5	1,87 (1,15 – 3,06)
GG gen TP53 SNP R72P và không hút thuốc	32	57,1	53	80,3	1,00
CC gen TP53 SNP R72P và hút thuốc	24	42,9	13	19,7	3,06 (1,37 - 6,84)
TT gen MDM2 SNP309T>G và không hút thuốc	41	55,4	40	74,1	1,00
GG gen MDM2 SNP309T>G và hút thuốc	33	44,6	14	25,9	2,30 (1,07 - 4,93)

Nhận xét:

- Hút thuốc lá làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi 1,78 lần (OR= 1,78; 95% CI= 1,20-2,62).
- Hút thuốc lá >20 bao-năm làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi lên 1,87 lần (OR=1,87; 95% CI= 1,15-3,06) cao hơn nguy cơ mắc ung thư phổi khi hút thuốc lá <20 bao-năm (OR=1,68; 95% CI= 1,01 – 2,79).
- Người mang kiểu gen CC gen *TP53* SNP R72P có hút thuốc lá nguy cơ mắc ung thư phổi tăng cao gấp 3,06 lần so với người mang kiểu gen GG và không hút thuốc lá (OR=3,06; 95% CI= 1,37-6,48).
- Người mang kiểu gen GG gen *MDM2* SNP 309T>G có hút thuốc lá nguy cơ mắc ung thư phổi tăng cao gấp 2,3 lần so với người mang kiểu gen TT và không hút thuốc lá (OR= 1,07-4,93).

3.4.3.2. Kết hợp đa hình kiểu gen *SNP R72P* và *SNP 309T>G MDM2* với nguy cơ ung thư phổi

Bảng 3.23: Kết hợp đa hình kiểu gen *TP53* SNP R72P và SNP 309T>G *MDM2* với nguy cơ ung thư phổi

Kiểu gen <i>MDM2</i> 309T>G	Kiểu gen <i>TP53</i> R72P	Bệnh (%)	Chứng (%)	OR	p
TT	GG	16 (7,3)	18 (7,8)	1,0	
TT	GC	25 (11,4)	24 (10,4)	1,172 (0,488 – 2,814)	0,824
TT	CC	19 (8,6)	13 (5,7)	1,644 (0,62 – 6,36)	0,337
TG	GG	18 (8,2)	48 (20,9)	0,422 (0,178 – 1,001)	0,074
TG	GC	54 (24,5)	47 (20,4)	1,293 (0,593 – 2,816)	0,556
TG	CC	25 (11,4)	36 (15,7)	0,781 (0,336 – 1,819)	0,667
GG	GG	23 (10,5)	11 (4,8)	2,352 (0,879 – 6,297)	0,141
GG	GC	26 (11,8)	23 (10,0)	1,272 (0,529 – 3,055)	0,658
GG	CC	14 (6,4)	10 (4,3)	1,575 (0,549 – 4,521)	0,435

Nhận xét:

- Bảng tổ hợp các kiểu gen của 2 đa hình gen *TP53* SNP R72P và *MDM2* 309T>G, được sắp xếp theo trình tự tăng dần nguy cơ mắc ung thư phổi theo lý thuyết. Hai kiểu gen nguyên thủy là GG của *TP53* SNP R72P và TT của *MDM2* 309T>G được coi là không có nguy cơ. Kết quả phân tích cho thấy chưa tìm được mối liên quan tăng nguy cơ mắc ung thư phổi khi kết hợp 2 kiểu gen này với nhau.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

4.1.1. Đặc điểm về tuổi mắc bệnh của nhóm bệnh nhân ung thư phổi

Nghiên cứu trên 220 BN, chúng tôi ghi nhận BN trẻ nhất là 33 tuổi và lớn tuổi nhất là 86 tuổi, tuổi trung bình là $59,89 \pm 9,432$ tuổi. Kết quả này cũng phù hợp với ghi nhận của một số nghiên cứu trong nước. Theo Trần Nguyên Phú (2007), tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là 58 ± 10 tuổi, BN trẻ nhất là 18 tuổi và lớn tuổi nhất là 78 tuổi [96]. Ngô Quý Châu và cộng sự năm 2012 khi nghiên cứu về ung thư phổi tại Trung tâm Hô hấp bệnh viện Bạch mai cũng công bố tuổi trung bình mắc ung thư phổi trong nhóm nghiên cứu là $58,9 \pm 8,6$ [97]. Các nghiên cứu về ung thư phổi trên thế giới cũng có kết quả gần tương đồng về độ tuổi mắc bệnh với nghiên cứu của chúng tôi. Yang P. và CS (2005) nghiên cứu các đặc điểm lâm sàng trên 5628 BN được chẩn đoán là ung thư phổi từ 1997 đến 2003 tại Mayo Clinic ghi nhận, tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là $65,4 \pm 11,0$ tuổi [98]. Một nghiên cứu về ung thư phổi ở Tây Ban Nha năm 2008 công bố tuổi trung bình mắc ung thư phổi là 64,3 [61]. Theo Xiang-Yang Chu (2011), tuổi trung bình của nhóm ung thư phổi là $59,1 \pm 11,1$ [99]. Nghiên cứu phân tích cộng gộp của Xuzai Lu và cộng sự năm 2013 ghi nhận tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân ung thư phổi là 60,9 tuổi [100]. Một số kết quả nghiên cứu khác về ung thư phổi ở Trung Quốc cũng nhận thấy tuổi trung bình của nhóm ung thư phổi tương tự như công bố của Dazhong Liu năm 2013 với tuổi trung bình là 60,8 hay nghiên cứu của Datong Zheng năm 2014 với tuổi trung bình là 57 [101], [102]. Một nghiên cứu khác ở dân cư Bangladesh năm 2014 cũng cho kết quả là 57,9 tuổi [83].

Chúng tôi cũng ghi nhận, độ tuổi thường gặp nhất là 50-70 tuổi (72,7%), phần lớn các BN có độ tuổi từ 45 trở lên (93,6%) và BN ung thư phổi trẻ tuổi (dưới 40 tuổi) chỉ ghi nhận 5 trường hợp (2,7%). Kết quả này cũng phù hợp với ghi nhận của một số tác giả khác. Theo Nguyễn Hải Anh (2006), độ tuổi 60- 69 chiếm 34,96% và BN có độ tuổi từ 50 trở lên là 77,2% [103]. Tác giả Gadgeel SM. và CS. (1999) nghiên cứu trên 1012 BN ung thư phổi tại Viện ung thư quốc gia Detroit (Hoa Kỳ) ghi nhận 87,5% BN từ 50 tuổi trở lên [104].

Nghiên cứu về ung thư phổi nói chung cũng nhận thấy tuổi của ung thư phổi đang trẻ hóa. Theo ghi nhận của Yang P. và các cộng sự (2005) nghiên cứu trên 5628 bệnh nhân ung thư phổi tại Mayo Clinic từ 1997 tới 2003 ghi nhận tuổi trung bình của những người mắc ung thư phổi là 65,4 [98]. Nghiên cứu của F. Yang và các CS (2010) trên 917 BN ung thư phổi ở Trung Quốc thấy độ tuổi trung bình chỉ là 60 tuổi và tuổi thấp nhất là 20 tuổi [105]. Đến năm 2013, 2014 các tác giả Dazhong Liu, Datong Zheng công bố tuổi trung bình mắc ung thư phổi lần lượt là 60,8 và 57 tuổi [101], [102]. Như vậy có thể thấy, xã hội càng phát triển kéo theo đó là sự xuất hiện ngày càng nhiều các yếu tố nguy cơ cho bệnh ung thư trong đó có ung thư phổi khiến cho độ tuổi mắc ung thư ngày càng trẻ hóa. Đó cũng là yếu tố khiến các nghiên cứu về ung thư ngày càng được quan tâm sâu sắc trên toàn thế giới nhằm phát hiện ra các nguy cơ cũng như các biện pháp dự phòng, ngăn ngừa sự phát sinh, phát triển của ung thư trong đó yếu tố di truyền ngày càng được nghiên cứu sâu và toàn diện.

4.1.2. Đặc điểm về giới của nhóm nghiên cứu

Các nghiên cứu về dịch tễ học trên thế giới cũng như ở Việt Nam đều khẳng định ung thư phổi phổ biến hơn ở nam giới. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã góp phần khẳng định lại sự phổ biến của ung thư phổi ở nam giới

hơn so với nữ giới. Nghiên cứu được thực hiện trên 220 bệnh nhân ung thư phổi trong đó có 163 nam (74,1%) và 57 nữ (25,9%), tỷ lệ nam/nữ là 2,86/1. Kết quả thu được phù hợp với công bố của các tác giả trong nước cũng như trên thế giới. Chung Giang Đông và CS. năm 2007 ghi nhận tỷ lệ nam/nữ là 2,67/1 [106]. Theo Ngô Quý Châu và CS. nghiên cứu năm 2012 tại Trung tâm Hô hấp Bệnh viện Bạch Mai, bệnh nhân nam giới chiếm 73,3%, tỷ lệ nam/nữ là 2,75/1 [97]. Theo nghiên cứu thống kê của Nguyễn Bá Đức và cộng sự ghi nhận ung thư mới mắc tại Việt Nam, sau 10 năm từ 2000 đến 2010, tỷ lệ mắc ung thư phổi ở nữ đã tăng hơn 200% (6,4/100.000 năm 2000 đến 13,9/100.000 dân năm 2010), là một trong 5 loại ung thư có tốc độ tăng nhanh nhất [107]. Các nghiên cứu trên thế giới cũng đưa ra một con số tương tự như các nghiên cứu ở Việt Nam với tỷ lệ nam mắc ung thư phổi nhiều hơn nữ giới. Sun Ha Park và cộng sự năm 2006 ghi nhận tỷ lệ nam/nữ trong nhóm ung thư phổi khoảng 4/1 [89]. Công bố của Eung Bae Lee và cộng sự năm 2010 trên nhóm bệnh nhân UTBMKTBN tỷ lệ nam/nữ khoảng 1,9/1 [95]. Theo Xiang-Yang Chu (2011), tỷ lệ nam/nữ là 3/1 đối với nhóm được chẩn đoán ung thư phổi [99]. Nghiên cứu cộng gộp của Wenlei Zhuo và cộng sự năm 2012 đưa ra tỷ lệ nam/nữ khoảng 1,85/1 trong đó tỷ lệ này cao hơn ở nhóm người châu Á và gần xấp xỉ nhau ở người da trắng [85]. Cũng tại Trung Quốc Dazhong Liu và Datong Zheng công bố tỷ lệ nam/nữ trong các nghiên cứu của mình là 2,3/1 và 2,6/1 [101], [102]. Ghi nhận về tình hình ung thư năm 2012, ước tính có khoảng 1,8 triệu trường hợp ung thư phổi mới phát hiện trên toàn thế giới, chiếm 13% trong tổng số các loại hình ung thư. Tỷ lệ mắc bệnh ung thư phổi ở nam giới cao nhất vẫn tập trung ở Bắc Mỹ, Châu Âu, Đông Á. Đối với nữ giới, tỷ lệ ung thư phổi cao nhất là ở Bắc Mỹ, Châu Âu, Úc, New Zealand, Bắc Triều Tiên và Trung Quốc. Qua 2 số liệu thống kê Globocan 2008 và 2012 cho thấy xu hướng phát triển của bệnh ung thư phổi

có sự thay đổi theo giới. Số ca mới mắc ung thư phổi ở các nước phát triển theo thống kê năm 2008 ở nam giới là 529.176 người, ở nữ giới là 209.707 người (nam/nữ là 2,5/1), đến năm 2012 số liệu mới công bố có sự giảm ung thư phổi ở nam giới và tăng ở nữ giới với con số lần lượt là 490.300 và 267.900 người (nam/nữ là 1,83/1). Số lượng này có sự khác biệt ở các nước đang phát triển với thống kê số ca mới mắc năm 2008 ở nam giới và nữ giới lần lượt là 564.306 và 224.580 người (nam/nữ là 2,5/1). Đến năm 2012, con số này lần lượt là 751.300 và 315.200 người (nam/nữ 2,38/1) [108], [1]. Như vậy chúng ta có thể thấy ung thư phổi nam giới đang có xu hướng giảm đi ở các nước phát triển trong khi ở các nước đang phát triển số ca mới mắc ung thư phổi vẫn không ngừng tăng lên ở cả hai giới. Đặc biệt, nữ giới ở các nước phát triển mắc ung thư phổi cũng ngày càng tăng. Điều đó có thể được giải thích do thói quen hút thuốc lá ở phụ nữ các nước phát triển phổ biến hơn so với các nước đang phát triển. Tuy nhiên Trung Quốc lại là một quốc gia có tỷ lệ nữ giới mắc ung thư phổi cao hơn một số nước Châu Âu dù tỷ lệ nữ giới hút thuốc lá ít hơn. Người ta cho rằng yếu tố ô nhiễm môi trường ở Trung Quốc là một trong những nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ mắc ung thư phổi ngày càng cao ở cả 2 giới. Do đó chúng ta có thể thấy, ngoài yếu tố thuốc lá còn có rất nhiều các yếu tố khác tác động đến quá trình hình thành và phát triển ung thư phổi.

4.1.3. Tiền sử hút thuốc lá

Hút thuốc đã được khẳng định là một trong những nguyên nhân chính gây nên ung thư phổi, không chỉ hút thuốc chủ động mà cả hút thuốc thụ động. Hút thuốc càng lâu, càng nhiều, càng sớm thì nguy cơ mắc ung thư phổi càng cao [109], [110]. Mặc dù rất nhiều các yếu tố như tiếp xúc với tia radon, amiăng, arsenic và các hóa chất khác nhau, chế độ ăn uống, các yếu tố di truyền, các yếu tố hoocmon và nhiễm trùng, các quá trình viêm đều góp phần

gây nguy cơ, khoảng 95% ung thư phổi ở nam giới và 90% phụ nữ ở Hoa Kỳ là do hút thuốc lá [111], [112], [113].

Xu hướng và tỷ lệ mắc ung thư phổi thay đổi chủ yếu ảnh hưởng của tỷ lệ hút thuốc lá trong cộng đồng dân cư. Nghiên cứu gần đây của Bilano và cộng sự cho thấy tỷ lệ hút thuốc ở các khu vực và các quốc gia là khác nhau. Trong khi tỷ lệ hút thuốc lá giảm mạnh ở các nước Châu Mỹ và các nước thu nhập cao ở Châu Âu, tỷ lệ này vẫn cao ở các nước Châu Phi, khu vực Địa Trung Hải và các nước Châu Âu có thu nhập thấp. Như vậy sự bất bình đẳng trong thu nhập là yếu tố ảnh hưởng đến sự kiểm soát hút thuốc lá ở các khu vực là khác nhau, điều này dẫn đến tỷ lệ mắc và tử vong do ung thư phổi cũng khác nhau theo khu vực [114], [115]. Thói quen hút thuốc là khác nhau giữa các nền văn hóa và vùng lãnh thổ. Nghiên cứu của Hee Sun P. và CS tại Hàn Quốc (2007) ghi nhận 928/1341 (69,9%) BN có sử dụng thuốc lá [116]. Nghiên cứu của Sekine I. và CS (1999) trên 3312 BN ung thư phổi tại Nhật Bản thấy tỷ lệ hút thuốc là 79,2% [117]. Trong khi đó, Yang P. và CS (2005) nghiên cứu trên 5628 BN được chẩn đoán là ung thư phổi từ 1997 đến 2003 tại Mayo Clinic, ghi nhận tỷ lệ hút thuốc là 86,6% [98]. Trung Quốc và các nước Đông Nam Á có tỷ lệ hút thuốc lá cao ở nam giới và thấp ở nữ giới [118].

Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận 94/220 (42,7%) trường hợp có hút thuốc (Bảng 3.2). Có thể thấy trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ hút thuốc lá trong nhóm bệnh nhân ung thư phổi đã giảm hơn nhiều so với các nghiên cứu trước đây. Nguyễn Việt Cồ (1996), ghi nhận tỷ lệ này là 76% [119]. Trần Nguyên Phú (2007) ghi nhận 64,2% BN có hút thuốc [96]. Theo Nguyễn Hải Anh (2006), trong 125 BN nghiên cứu có 94 BN hút thuốc (75,2%) [103]. Như vậy có thể thấy, hiện nay ý thức về tác hại của thuốc lá với sức khỏe được nâng cao hơn so với trước nên tỷ lệ người hút thuốc giảm đi. Tuy nhiên vẫn có sự khác biệt giữa tỷ lệ bệnh nhân ung thư phổi có hút thuốc lá với

nhóm chúng và sự khác biệt này cho thấy hút thuốc lá vẫn là nguyên nhân chính gây ung thư phổi trong nhóm nghiên cứu. Bảng 3.20 đã chỉ ra nguy cơ mắc ung thư phổi ở nhóm người hút thuốc lá cao gấp 1,78 lần so với người không hút thuốc (95% CI = 1,20 – 2,62). Tỷ lệ ung thư phổi phần lớn phản ánh tỷ lệ hút thuốc lá với thời gian trễ vài thập kỷ [120]. Hút thuốc lá và tiếp xúc với khói thuốc lá là một nguyên nhân đã được chứng minh của ung thư phổi. Nhiều nghiên cứu ghi nhận hút thuốc lá gặp trong khoảng 80% trường hợp ung thư phổi ở nam giới và 50% trường hợp ung thư phổi ở phụ nữ trên toàn thế giới [121]. Không chỉ hút thuốc lá chủ động mà tác hại còn gặp cả những người hút thuốc lá thụ động với ước tính có khoảng 21.400 ca tử vong do ung thư phổi ở những người không hút thuốc hàng năm [122].

Trong nghiên cứu này chúng tôi không gặp BN nữ giới nào hút thuốc. Nghiên cứu của Trần Nguyên Phú ghi nhận 1/14 BN nữ hút thuốc (7,1%)[96]. Trong khi đó, nghiên cứu của Sekine I. và CS trên 3312 BN ung thư phổi tại Nhật Bản ghi nhận 367/943 BN nữ (38,9%) trong tiền sử hoặc hiện tại có hút thuốc [117]. Như vậy, thói quen hút thuốc là khác nhau giữa hai giới. Điều này phần nào giải thích tại sao tỷ lệ ung thư phổi cao hơn ở nam giới. Tuy nhiên, cũng cần lưu ý rằng, ở đây mới chỉ xét đến vấn đề hút thuốc lá chủ động. Hút thuốc lá thụ động cũng đã được khẳng định là yếu tố nguy cơ cao của ung thư phổi. Người hít phải khói thuốc lá lâu ngày có nguy cơ cao hơn 1,5 lần so với người không hoặc ít tiếp xúc với khói thuốc lá. Đó là chưa kể đến bên cạnh khói thuốc lá còn nhiều nguyên nhân khác đã được chứng minh gây nên ung thư phổi [3], [123].

4.1.4. Kết quả mô bệnh học của nhóm bệnh nhân ung thư phổi

Ung thư phổi được chia làm 2 thể: thể không tế bào nhỏ chiếm khoảng 85% và thể tế bào nhỏ chiếm khoảng 15%. Theo phân loại mô bệnh học, UTPKTBN lại được chia thành ba loại: UTBM tuyến (adenocarcinoma),

UTBM tế bào vảy (squamous cell carcinoma) và UTBM tế bào lớn (large cell carcinoma) với tỷ lệ trong tổng số các trường hợp ung thư phổi lần lượt là 35-40%, 25-30% và 10 - 15% [43]. Nghiên cứu trên 220 bệnh nhân ung thư phổi chúng tôi gặp 90,5% bệnh nhân UTPKTBN. Kết quả này cũng phù hợp với các ghi nhận trong các nghiên cứu khác. Theo Ngô Quý Châu và CS., tỷ lệ UTPKTBN gặp 93,3% các bệnh nhân ung thư phổi [97]. Nghiên cứu của Lê Tuấn Anh trên 1.158 bệnh nhân ung thư phổi, tỷ lệ UTPKTBN chiếm tới 95,1% [124]. Trong nhóm UTPKTBN, UTBM tuyến là type ung thư chiếm tỷ lệ cao nhất. Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận 73,2% các trường hợp là UTBM tuyến, tiếp đến là UTBM TB nhỏ (9,5%), UTBM vảy (5,9%) (bảng 3.2). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả trong nước đều ghi nhận UTBM tuyến là dạng ung thư phổ biến nhất. Theo công bố của Nguyễn Hải Anh (2006) tỷ lệ UTBM tuyến là 42,27% và UTBM vảy là 30,08% [103]. Nghiên cứu của Lê Tuấn Anh ghi nhận UTBM tuyến là 64,3% và UTBM vảy là 11,3% [124].

Tham khảo các nghiên cứu trên thế giới, chúng tôi cũng thấy rằng UTBM tuyến và UTBM vảy là 2 dạng tổn thương hay gặp nhất. Yang P. và CS. (2005) nghiên cứu trên 5.628 BN ung thư phổi ghi nhận tỷ lệ UTBM tuyến chiếm 45,3%, UTBM vảy là 23,7%, ung thư tế bào nhỏ chiếm 11,3% [98]. Funakoshi Y. và CS. (2008) nghiên cứu trên 4.556 BN ung thư phổi tại Nhật Bản cũng ghi nhận UTBM tuyến chiếm 52,7%, UTBM vảy chiếm 32,3%, UT tế bào nhỏ là 10% [125]. Xiang-Yang Chu và CS. (2011) nhận thấy UTBM tuyến có tỷ lệ 53,6%, UTBM vảy chiếm 29,9% và có 8,2% BN thuộc typ UTBM TB nhỏ [99]. Một nghiên cứu trên quần thể dân cư Hàn Quốc cũng đưa ra một con số tương đương về tỷ lệ mắc UTBM tuyến với UTBM tế bào vảy lần lượt là 38,7% và 38,6% [126]. So với trước đây tỷ lệ UTBM tuyến đã tăng lên so với UTBM tế bào vảy, điều này có thể được giải

thích bởi 2 lý do. Thứ nhất, UTBM tế bào vảy thường có nguyên nhân do thuốc lá nhưng hiện nay ý thức về tác hại của hút thuốc lá được nâng lên, tỷ lệ người hút thuốc lá đã giảm đi đáng kể so với trước kia. Thứ hai là do tiến bộ trong các kỹ thuật chẩn đoán, thường trước đây chỉ sinh thiết những khối u qua nội soi phế quản nhưng hiện nay có thể sinh thiết xuyên thành ngực để chẩn đoán được các khối u ở ngoại vi và nhu phổi làm tăng tỷ lệ phát hiện các type ung thư khác trong đó có UTBM tuyến.

4.2. Đa hình gen *TP53* ở nhóm nghiên cứu

Mặc dù thuốc lá rõ ràng chứa chất gây ung thư nhưng không phải tất cả những người hút thuốc lá đều bị ung thư phổi, ngược lại có những người dù không hút thuốc lá vẫn bị mắc ung thư phổi. Thực tế này gợi ý một số các yếu tố khác bao gồm tính đa hình của gen có thể có vai trò trong quá trình sinh bệnh học của ung thư phổi. Các kết quả nghiên cứu ghi nhận có sự khác biệt về tính nhạy cảm với ung thư giữa các cá thể khác nhau dù tiếp xúc với cùng một điều kiện môi trường. Các đặc điểm của cá thể bao gồm cả tính đa hình của các gen liên quan đến ung thư có thể là nguyên nhân gây ra sự khác biệt này. Trên cơ sở đó, nhiều nghiên cứu về tính đa hình gen đã được tiến hành trên thế giới với mục đích tìm hiểu mối liên quan giữa các yếu tố đa hình gen với nguy cơ hình thành và phát triển ung thư phổi. Một số đa hình di truyền đã được chứng minh là nguy cơ của căn bệnh chết người này một cách độc lập hoặc kết hợp với nhau hay kết hợp với các yếu tố môi trường [127], [128], [129]. Các nghiên cứu trên thế giới hiện nay đang tập trung vào nghiên cứu tính đa hình của gen liên quan đến ung thư. Gen *TP53* là gen được tập trung nghiên cứu nhiều nhất do đóng vai trò trung tâm ức chế sự hình thành và phát triển ung thư. Nhiều nghiên cứu gợi ý tính đa hình của gen *TP53* có thể ảnh hưởng đến chức năng ức chế ung thư của con đường tín hiệu p53, dẫn đến làm thay đổi tính nhạy cảm với ung thư ở người. Nhiều đa hình của gen *TP53*

đã được nghiên cứu trên thế giới tuy nhiên các kết quả vẫn còn chưa thống nhất. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành khảo sát một số SNP của gen *TP53*: đa hình thêm 16bp tại vùng intron 3, SNP21, SNP34, SNP36, SNP47, SNP R72P, SNP217, SNP360 ở bệnh nhân ung thư phổi và so sánh với nhóm chứng nhằm tìm hiểu mối liên quan giữa tính đa hình gen *TP53* với nguy cơ mắc ung thư phổi.

4.2.1. Đa hình gen thêm 16bp tại vùng intron 3 của gen *TP53*

Mối liên quan giữa đa hình gen thêm 16bp tại intron 3 gen *TP53* và ung thư đã có một số tác giả nghiên cứu, tuy nhiên vì là một đa hình hiếm và chưa có nhiều công bố nên chưa cho thấy được mối liên quan giữa đa hình thêm 16bp tại intron 3 với nguy cơ ung thư phổi. Trong nghiên cứu này, kết quả khuếch đại gen cho phép xác định được kiểu gen tại vị trí intron 3. Đa hình gen thêm 16bp tại vùng intron 3 của gen *TP53* được công bố lần đầu tiên năm 2002 có liên quan đến ung thư vú ở phụ nữ Đức. Kết quả nghiên cứu cho thấy kiểu gen nguyên thủy A1A1 ít có khả năng mắc ung thư vú hơn kiểu gen A1A2 (OR = 1,3; 95% CI = 1,0-1,7) và kiểu gen A2A2 (OR = 1,7; 95% CI = 0,8-3,4) [130]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận có 8/220 bệnh nhân ung thư phổi có kiểu gen A1A2 thêm 16bp tại vùng intron 3 gen *TP53*, chiếm tỷ lệ 3,6% cao hơn nhóm chứng với tỷ lệ gặp là 1,7% (4/230 trường hợp). Tuy nhiên sự khác biệt trên không có ý nghĩa thống kê với OR = 2,13; 95% CI = 0,633 - 7,184. Trong nghiên cứu này chúng tôi không phát hiện được trường hợp nào mang kiểu gen A2A2 là kiểu gen có sự thêm 16bp tại vùng intron 3 ở cả 2 alen như nghiên cứu trên bệnh nhân ung thư vú ở phụ nữ Đức năm 2002. Về lý thuyết những người mang kiểu gen có thêm đoạn 16bp (alen A2) thì sự biểu hiện protein p53 trong tế bào ở mức thấp và có nguy cơ cao mắc ung thư. Điều này gợi ý rằng SNPs có khả năng thay đổi quá trình hoàn thiện mRNA. Gần đây, một phân tích cộng gộp từ kết quả 25 nghiên cứu

đã công bố, kết quả cho thấy kiểu gen A2A2 tăng nguy cơ mắc ung thư so với kiểu gen A1A1 (OR = 1,45; 95% CI = 1,22 - 1,74). Tuy nhiên, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng không có sự giống nhau ở kết quả trên giữa các chủng tộc. Những số liệu nghiên cứu được công bố cũng cho thấy đa hình thêm 16 bp vùng intron 3 gen *TP53* không giống nhau giữa các loại hình ung thư. Kiểu gen A2A2 là yếu tố nguy cơ cho ung thư vú, ung thư đại tràng nhưng không có ý nghĩa trong ung thư phổi [131]. Từ nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng tôi tiến hành phân tích đa hình thêm 16bp vùng intron 3 gen *TP53* trên bệnh nhân ung thư phổi tại Việt Nam. Kết quả của chúng tôi đã góp phần làm sáng tỏ hơn sự liên quan giữa yếu tố chủng tộc và loại hình ung thư phải được tính đến tính đa hình của gen *TP53*.

4.2.2. SNP R72P của gen TP53

Gen *TP53* với sự thay thế nucleotid G (guanine) bởi C (cytosine) ở vị trí thứ 2 của codon 72 dẫn đến thay đổi acid amin Arg thành Pro làm thay đổi cấu trúc và chức năng sinh học. Vì vậy, sự đa hình của *TP53* SNP R72P R/P có thể gây ra những tác động khác nhau đối với đa dạng các loại ung thư hoặc thậm chí là cùng trong cùng một loại ung thư ở các quần thể dân cư khác nhau [132]. Với sự thay đổi này tạo ra 3 kiểu gen khác nhau gồm: GG (SNP R72P R/R), GC (SNP R72P R/P) và CC (SNP R72P P/P) [133]. Một phân tích tổng hợp từ 32 nghiên cứu bệnh chứng liên quan đến 19.255 đối tượng nghiên cứu cho thấy sự đa hình gen *TP53* codon 72 có liên quan đến ung thư phổi [134]. Tuy nhiên, một phân tích cộng gộp khác lại không tìm thấy bằng chứng về nguy cơ liên quan đến đa hình gen *TP53* codon 72 và nguy cơ ung thư phổi ở quần thể người da trắng và người Mỹ gốc Phi [78]. Phải chăng sự khác biệt có liên quan đến đặc điểm chủng tộc mà chúng ta hiện vẫn chưa tìm ra. Trong phạm vi nghiên cứu của mình, chúng tôi mong muốn tìm hiểu về tỷ lệ các

kiểu gen đa hình của *TP53* ở codon 72 và mối liên quan của đa hình gen *TP53* codon 72 với nguy cơ ung thư phổi tại Việt Nam

Trong các SNP của gen *TP53*, R72P là SNP đã được nghiên cứu nhiều nhất. Codon 72 nằm trên vùng giàu prolin thuộc exon 4, liên quan đến chức năng apoptosis của protein p53. Sự thay thế nucleotid tại codon 72 dẫn đến bộ ba CGC mã hóa cho arginin bị thay đổi thành bộ ba CCC mã hóa cho prolin [132]. Chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật enzym cắt giới hạn (PCR-RFLP) để phân tích condon này. Đây là một kỹ thuật đã được thực hiện thường quy tại trung tâm gen-protein trường đại học Y Hà Nội. Với các máy phân tích hiện đại và quy trình đã được chuẩn hoá, các kết quả còn được đối chiếu bằng giải trình tự trực tiếp exon 4 nên các số liệu đưa ra là đáng tin cậy. Trong nghiên cứu này chúng tôi quan sát thấy một tỷ lệ cao hơn không đáng kể kiểu gen SNP R72P P/P trên bệnh nhân ung thư phổi 26,4% so với 25,6% ở nhóm chứng. Khi phân tích tỷ suất chênh OR giữa các kiểu gen SNP R72P P/P và SNP R72P R/P giữa nhóm bệnh và nhóm chứng chúng tôi thấy có sự gia tăng nguy cơ mắc ung thư phổi với OR lần lượt là 1,51 và 1,33. Tuy nhiên sự gia tăng này không có ý nghĩa thống kê. Mặc dù nghiên cứu về SNP R72P trong mối liên quan với ung thư phổi được đề cập nhiều trên thế giới nhưng kết quả chưa có sự thống nhất giữa các tác giả. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với một số nghiên cứu không tìm thấy mối liên quan này như: Chua và cộng sự (2010) nghiên cứu trên bệnh nhân ung thư phổi người Singapore gốc Trung Quốc, nghiên cứu cộng gộp của Xin Wang và cộng sự năm 2015 trên dân cư Trung Quốc [66], [135]. Gần đây, một nghiên cứu ở Iran năm 2016 cũng không ghi nhận được mối liên quan giữa SNP R72P với nguy cơ mắc ung thư phổi [136]. Cho đến nay chỉ có một số báo cáo với cỡ mẫu lớn tìm ra được sự kết hợp giữa SNP R72P với nguy cơ mắc ung thư phổi. Nghiên cứu của Zhang và CS. ở quần thể người châu Á năm 2006 công bố OR của SNP

R72P P/P so với R/R là 1,47 (95% CI = 1,17 - 1,85) [88]. Nghiên cứu của Piao và CS. (2011) ở dân cư Hàn quốc ghi nhận một tỷ lệ cao hơn của các kiểu gen SNP R72P P/P ở bệnh nhân ung thư phổi (16,7%) so với nhóm chứng (11,2%). Nghiên cứu này cho thấy kiểu gen SNP R72P P/P làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi hơn so với kiểu gen SNP R72P R/R với tỷ suất chênh OR là 1,83 (95% CI = 1,48 - 2,26) [126]. Ghi nhận của Mostaid MS và cộng sự năm 2014 cho thấy kiểu gen SNP R72P P/P và R/P làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi với OR = 4,62; 95 % CI = 2,31 - 9,52 và OR = 2,51; 95% CI = 1,38 - 4,82 [83]. Về quần thể người da trắng, các công bố của Liu và CS., Hung và CS., Wang và CS. ghi nhận OR của SNP R72P P/P so với R/R lần lượt là 1,37 (95% CI = 1,0 - 1,9); 1,18 (95% CI = 0,92-1,51) và 0,93 (95% CI = 0,68-1,27) [137], [138], [139]. Một nghiên cứu cộng gộp khác năm 2014 khi nghiên cứu trên một số lượng lớn nghiên cứu đã công bố mối liên quan của kiểu gen codon 72 SNP R72P P/P gây tăng nguy cơ ung thư phổi trên tất cả các mô hình di truyền (mô hình trội: OR = 1,13; 95 % CI = 1,05-1,21; mô hình lặn: OR = 1,14; 95% CI = 1,02–1,27; mô hình cộng gộp: OR = 1,19; 95% CI = 1,05-1,33) [140]. Các kết quả nghiên cứu cho thấy tần số kiểu gen đa hình khác nhau theo chủng tộc và môi trường. Có thể thấy một xu hướng nguy cơ mắc ung thư phổi ở Châu Á của kiểu gen SNP R72P P/P cao hơn so với người da trắng. Một phân tích cộng gộp khác năm 2009 cũng đưa góp phần khẳng định nguy cơ mắc ung thư phổi tăng trong kiểu gen SNP R72P P/P lớn hơn ở người Châu Á (OR = 1,37; 95% CI = 1,20-1,57) theo mô hình gen lặn, không tìm thấy mối liên quan này ở người da trắng (OR = 0,96; 95%; CI = 0,84-1,10) [141]. Trong cùng một quần thể địa lý, các nghiên cứu cũng ghi nhận được sự khác biệt về phân bố kiểu gen của SNP R72P gen *TP53* giữa các chủng tộc khác nhau. Theo nghiên cứu của Wu và cộng sự (2002), sự phân bố các kiểu gen của SNP Arg72Pro khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa

3 quần thể người da trắng, Mỹ gốc Mexico và Mỹ gốc Phi với $p = 0,16$ [142]. Như vậy, tính chủng tộc cần được xem xét như một yếu tố quan trọng trong việc xác định ảnh hưởng của các kiểu gen khác nhau đến sự nhạy cảm ung thư ở người và cần có những nghiên cứu rộng trên toàn thế giới để tìm hiểu được sự khác biệt này.

Bên cạnh mối liên quan đến ung thư phổi, đa hình gen TP53 codon 72 còn được nghiên cứu và công bố có liên quan đến các loại ung thư khác. Một số nghiên cứu cộng gộp và nghiên cứu bệnh chứng đã chỉ ra đa hình gen TP53 tại codon 72 có thể liên quan đến ung thư dạ dày ở người Châu Á [143], [144], [145], [146]. Nghiên cứu bệnh chứng của Zhang và cộng sự năm 2011 ghi nhận kiểu gen SNP R72P R/R và alen Arg làm giảm nguy cơ mắc ung thư bàng quang ở người Trung Quốc [147]. Một phân tích cộng gộp dựa trên kết quả của 6 nghiên cứu bệnh chứng cho thấy đa hình gen TP53 codon 72 có liên quan đến ung thư bàng quang và sự phân bố kiểu gen của đa hình này thay đổi theo giai đoạn của bệnh [148]. Gui và cộng sự phân tích cộng gộp 10 nghiên cứu bệnh chứng đưa ra kết luận alen Pro của codon 72 gen TP53 là một yếu tố nguy cơ tiềm ẩn của ung thư nội mạc tử cung [149]. Một phân tích khác dựa trên kết quả của 39 nghiên cứu bệnh chứng cho thấy đa hình gen TP53 tại codon 72 có thể góp phần làm tăng tính nhạy cảm đối với bệnh ung thư vú, đặc biệt ở người Châu Âu [150]. Đối với bệnh ung thư đại trực tràng, Liu và cộng sự phân tích kết quả 7 nghiên cứu dịch tễ học chỉ ra có thể liên quan đến đa hình này ở người châu Á [151].

4.2.3. Một số SNP không có vị trí cắt enzym giới hạn của gen TP53

Đa hình tại vị trí codon 47: Kiểu đa hình này được Felley- Bosco và cộng sự tìm thấy lần đầu tiên vào năm 1993, với sự thay thế acid amin prolin thành serin do biến đổi nucleotid C>T [62]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận một kiểu gen giống nhau tại vị trí codon 47 (CCG) ở tất cả các mẫu

nghiên cứu. Theo các số liệu đã được công bố, tỷ lệ gặp đa hình gen này rất thấp, chỉ từ 0,5-5% trong các nghiên cứu khác nhau. ME Murphy công bố tỷ lệ gặp là 1% ở người Mỹ gốc Phi [9]. Đa hình này gần vị trí Serin 46, một vị trí có vai trò quan trọng trong quá trình đáp ứng gây chết tế bào theo chương trình của p53. Bình thường, dưới tác động của protein p38 và homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2), p53 được phosphoryl hoá tại vị trí Serin 46 dẫn đến sự tăng cường sao chép các gen liên quan đến quá trình apoptosis. Khi alen TP53-Pro47 được thay thế bởi alen TP53-Serin47, sự phosphoryl hoá tại vị trí Ser 46 bị giảm sút làm giảm hoạt tính tác động lên các gen đích của quá trình apoptosis và tăng khả năng mắc ung thư [152]. Nghiên cứu của chúng tôi không ghi nhận được trường hợp nào mang kiểu gen P47S P/S hay P47S S/S. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Auer và cộng sự năm 1999 khi toàn bộ 64 bệnh nhân ung thư phổi nghiên cứu đều có kiểu gen đồng hợp tử SNP P47S P/P [153]. Nghiên cứu của Felley-Bosco và cộng sự năm 1993 tỷ lệ gặp kiểu gen đột biến thay thế nucleotid của SNP P47S *TP53* là 4,7% ở người Mỹ gốc Phi và không tìm thấy trên người da trắng [62]. Nhiều nghiên cứu về tính đa hình đơn codon 47 cũng được tiến hành trên các đối tượng nghiên cứu khác nhau tuy nhiên tần suất gặp alen Ser47 rất thấp. Năm 2008, Siraj và cộng sự tiến hành nghiên cứu trên 223 bệnh nhân ung thư tuyến giáp và 229 đối chứng người Ả Rập nhưng không ghi nhận được alen Ser47 [154]. Tương tự, nghiên cứu trên 100 bệnh nhân ung thư vú và 100 đối chứng người Ả Rập của Al-Qasem thấy 100% đối tượng nghiên cứu đều có kiểu gen đồng hợp tử SNP P47S P/P [155]. Sameer và cộng sự nghiên cứu trên 226 bệnh nhân ung thư đại trực tràng và 156 người đối chứng người Kashmir. Kết quả nghiên cứu này ghi nhận được 5 trường hợp bệnh nhân, 4 trường hợp đối chứng có kiểu gen đồng hợp tử Ser/Ser, tuy nhiên không thấy mối liên quan giữa tính đa hình đơn codon 47 với bệnh ung thư đại trực tràng [156]. Nghiên

cứu của Jaiswal năm 2011 ở Bắc Ấn độ trên 181 bệnh nhân ung thư bàng quang và 176 đối chứng ghi nhận được 6% nhóm bệnh, 3,5% nhóm chứng có kiểu gen dị hợp tử Pro/Ser; 3,5% nhóm bệnh và 8,5% nhóm chứng có kiểu gen đồng hợp tử Ser/Ser [157]. Sự xuất hiện của alen Ser47 ở các nghiên cứu này có thể do đặc điểm chủng tộc.

Đa hình tại vị trí codon 34, 36: Hơn 90% đa hình gen TP53 xuất hiện ở vùng không mã hóa. Tuy nhiên có nhiều đa hình mặc dù xuất hiện ở vùng mã hóa nhưng lại không làm thay đổi acid amin như đa hình gen tại các vị trí codon 34 và 36. Trên lý thuyết, việc thay đổi trình tự nucleotid trên bộ ba mã hóa có thể thay đổi cấu trúc gấp khúc, chức năng hay mức độ biểu hiện của protein. Hai đa hình đồng nghĩa P34P (CCC→CCA), P36P (CCG→CCT) nằm trong vùng có vai trò quan trọng đối với tương tác MDM2 với mARN của TP53 do đó có thể ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của p53. Tính đa hình tại các vị trí codon này đã được phát hiện ở một số nghiên cứu trên thế giới và sự thay đổi nucleotid từ C→A ở codon 34 và từ G→T ở codon 36 không làm thay đổi acid amin mã hoá. Đa hình P36P (CCG→CCT) làm giảm ái lực của mARN gen TP53 đối với MDM2, do đó làm giảm nồng độ p53 dẫn đến giảm khả năng của p53 trong quá trình apoptosis, làm xuất hiện sự bất thường của tế bào [158]. Trong nghiên cứu này chúng tôi không ghi nhận được đa hình nucleotid đơn tại 2 codon này. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy chỉ có một kiểu gen giống nhau ở các vị trí codon 34 (CCC) và 36 (CCG). Thực tế có rất ít nghiên cứu đánh giá sự liên quan giữa các SNPs tại codon 34, 36 của gen TP53 với nguy cơ ung thư. Đây là đa hình hiếm gặp có thể không gặp ở quần thể chúng tôi nghiên cứu, cũng có thể do cỡ mẫu còn hạn chế nên chưa phát hiện được các kiểu gen đột biến. Trong một nghiên cứu khác trên nhóm bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát năm 2016 tại Việt Nam ghi nhận được 2 trường hợp có kiểu gen dị hợp C/A tại codon 34 và

1 trường hợp có kiểu gen dị hợp G/A ở codon 36 [159]. Như vậy có thể thấy đây là đa hình rất hiếm gặp ở quần thể người Việt Nam do đó rất khó để có thể tìm được mối liên quan với ung thư phổi. Để có thể phân tích được sự liên quan giữa codon 34 và 36 với ung thư phổi, cần phân tích trên một lượng mẫu lớn như trong các nghiên cứu dịch tễ gen trong cộng đồng thì mới có đủ số liệu để tính toán nguy cơ ung thư.

Đa hình SNP V217M và SNP G360A gen TP53: Qua kết quả phân tích đa hình tại vị trí codon 217 và 360, chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt trong kiểu gen giữa nhóm bệnh ung thư phổi và nhóm chứng. Tất cả mẫu nghiên cứu đều mang kiểu gen nguyên thủy. Codon V217M nằm ở vị trí DBD của gen *TP53*, do đó về nguyên tắc bất kỳ sự biến đổi nào tại vị trí codon 217 sẽ ảnh hưởng đáng kể đến chức năng của p53. Biến thể *TP53-217M* được chỉ ra tăng cường sự biểu hiện p53 hơn biến thể *TP53-217V*, do đó biến thể này có thể là yếu tố bảo vệ chống lại quá trình phát sinh ung thư của cơ thể. G360A nằm trong khu vực tiếp giáp với miền tetramerization của p53, nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra biến thể đa hình này gây giảm nhẹ sao chép của BAX, MDM2 và P53AIP, rõ rệt hơn ở stratifin (SFN, còn được gọi là 14- 3-3 sigma) và GADD45 ở nấm men. Những kết quả này có thể cho thấy sự suy yếu trong đáp ứng với các thương tổn DNA. Do làm thay đổi acid amin nên các biến thể này về mặt lý thuyết đều có thể ảnh hưởng đến khả năng bám của p53 đối với các đoạn trình tự đặc hiệu tại gen đích, thay đổi quá trình hoàn thiện, tính ổn định của protein cũng như thay đổi khả năng tương tác của p53 với các protein nội bào. Tuy nhiên các nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở trong phòng thí nghiệm nghiên cứu trên nấm men, do đó cần phải có các nghiên cứu trên mô hình động vật có vú để khẳng định những kết luận trên [160].

4.3. Đa hình gen *MDM2* ở nhóm nghiên cứu

MDM2 đóng vai trò là nhân tố điều chỉnh chính của con đường tín hiệu p53 thông qua khả năng điều hòa ngược âm tính hoạt động của p53. Sự biểu hiện quá mức của MDM2 làm ức chế khả năng kiểm soát tế bào của p53 dẫn đến mất kiểm soát các chu trình phân bào, khả năng tự sửa chữa DNA và chết theo chu trình của tế bào. Đồng thời MDM2 còn thúc đẩy quá trình giáng hóa của p53 thông qua quá trình ubiquitin hóa [161], [162]. Với vai trò điều hòa ngược âm tính rất quan trọng trong con đường tín hiệu p53, sự biểu hiện quá mức của MDM2 có thể là nguyên nhân hình thành các tế bào ung thư. Do đó, chỉ cần một sự thay đổi nhỏ mức protein MDM2 cũng có thể ảnh hưởng đến sự phát triển ung thư bằng cách ảnh hưởng đến con đường tín hiệu p53 [163]. Một đa hình nucleotid đơn của gen MDM2 ở vị trí nucleotid 309 trong intron đầu tiên nằm trong vùng promoter (rs2279744), với sự thay đổi từ T sang G, có thể làm tăng ái lực với protein kích thích 1 (Sp1) dẫn đến làm tăng biểu hiện MDM2 và sự suy giảm của con đường tín hiệu p53. Nghiên cứu của Bond và cộng sự năm 2004 đã chỉ ra MDM2 SNP 309 T>G có thể làm tăng cường tổng hợp protein MDM2 ở những kiểu gen đột biến. Cụ thể kiểu gen G/G tăng hơn T/T 4 lần và T/G tăng hơn 1.9 lần so với kiểu gen T/T [163]. Nhiều phân tích cộng gộp trước đây đã được tiến hành trên sự kết hợp các đa hình của MDM2 309T>G với nguy cơ một số ung thư khác. Các báo cáo cho thấy sự biến đổi của MDM2 SNP 309T>G có thể làm tăng nguy cơ mắc bệnh sarcom, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tế bào gan và ung thư vú [164], [165], [166], [71]. Ngược lại, alen G có thể đóng một vai trò dự phòng đối với ung thư vùng đầu cổ ở người da trắng [167]. Do đó, vai trò của đa hình nucleotid đơn gen MDM2 309T>G có thể khác nhau trong các loại ung thư khác nhau và cần được tìm hiểu sâu hơn theo từng loại ung thư cụ thể.

Trong nghiên cứu này, để xác định được kiểu gen tại vị trí SNP309 gen MDM2 chúng tôi sử dụng phương pháp PCR-RFLP với enzym cắt giới hạn *MspA1i* có trình tự nhận biết nằm trong đoạn gen chứa SNP309. Thay đổi nucleotid tại vị trí SNP309 gen MDM2 sẽ làm thay đổi trình tự nhận biết của enzym *MspA1i* tạo ra các đoạn gen có độ dài khác nhau và được phát hiện trên băng điện di. Quy trình kỹ thuật đã được chuẩn hóa bởi các chuyên gia tại Trung tâm Gen – Protein thuộc Trường Đại học Y Hà Nội. Kiểu gen sau khi xác định bằng phương pháp PCR-RFLP sẽ được lấy ngẫu nhiên để kiểm tra lại bằng phương pháp giải trình tự gen và kết quả cho thấy sự đồng nhất khi xác định kiểu gen bằng 2 phương pháp. Chúng tôi đã tiến hành xác định kiểu gen tại SNP 309T>G gen MDM2 trên 220 bệnh nhân ung thư phổi và 230 đối chứng. Từ số liệu thu được chúng tôi tiến hành phân tích các tỷ lệ kiểu gen và alen, so sánh giữa nhóm bệnh và nhóm chứng căn cứ vào tỷ suất chênh OR với 95% CI. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy tỷ lệ các alen biến đổi G gần tương đương tỷ lệ alen nguyên thủy T (49,1% so với 50,8%). Tỷ lệ % các kiểu gen TT, TG và GG lần lượt trong nhóm ung thư phổi là 27,3%; 44,1%; 28,6%; trong nhóm chứng là: 23,9%; 57,0%; 29,1%. Như vậy ở cả 2 nhóm ung thư phổi và nhóm chứng tỷ lệ kiểu gen dị hợp tử TG chiếm đa số. Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như các kết quả nghiên cứu khác về tỷ lệ các kiểu gen SNP 309T>G MDM2 ở người châu Á. Các kết quả nghiên cứu đưa ra các tỷ lệ kiểu gen SNP 309T>G MDM2 khác nhau theo chủng tộc được tổng hợp ở bảng 4.1.

Bảng 4.1: Tỷ lệ các kiểu gen SNP 309T>G MDM2 trên bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng trong một số nghiên cứu trên thế giới

Tác giả	Năm công bố	Chủng tộc	Nhóm chứng			Nhóm bệnh		
			GG (n)	TG (n)	TT (n)	GG (n)	TG (n)	TT (n)
Hu [168]	2006	Người châu Á	178	373	166	271	538	274
Li [90]	2006	Người Mỹ da trắng	135	472	419	164	573	408
Lind [169]	2006	Người da trắng	55	156	130	44	207	161
Park [89]	2006	Người Châu Á	189	280	113	161	299	122
Pine [170]	2006	Người Mỹ gốc Phi	2	20	111	5	47	203
Pine [170]	2006	Người mỹ da trắng	54	167	150	52	187	182
Zhang [88]	2006	Người Châu Á	296	561	249	291	711	418
Liu [171]	2008	Người da trắng	283	802	702	199	631	530
Mittelstrass [172]	2008	Người da trắng	70	293	270	149	598	547
Chua [66]	2010	Người Châu Á	29	65	29	51	83	25
Kohno [173]	2011	Người Châu Á	126	183	68	95	151	79
Gansmo[87]	2015	Người da trắng	183	581	567	502	1783	1464
Enokida [174]	2016	Người Châu Á	230	379	153	213	335	152

Qua bảng tổng hợp ở trên chúng ta có thể nhận thấy các nghiên cứu mới đang tập trung ở nhóm người da trắng và người châu Á, còn người gốc Phi số liệu nghiên cứu vẫn còn rất hạn chế. Nhìn chung các nghiên cứu đều không ghi nhận được sự chênh lệch về tỷ lệ kiểu gen TT và GG ở người châu Á. Kết quả này có sự khác biệt với các nghiên cứu tiến hành trên người da trắng. Ở nhóm người này các kết quả nghiên cứu ghi nhận một tỷ lệ thấp hơn của kiểu gen SNP 309GG so với kiểu gen SNP 309TT ở cả hai nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng. Các kết quả này phần nào thể hiện sự khác biệt về phân bố kiểu gen theo chủng tộc. Tuy nhiên để khẳng định được điều này chắc chắn cần có các nghiên cứu dịch tễ gen theo chủng tộc sâu rộng hơn nữa.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy kiểu gen đồng hợp tử SNP 309GG làm gia tăng nguy cơ mắc ung thư phổi 1,7 lần so với kiểu gen kết hợp SNP 309TT và TG theo mô hình gen lặn ($OR=1,7$; $95\%CI=1,09-2,63$). Tương đồng với kết quả nghiên cứu này là nghiên cứu cộng gộp của Gui và cộng sự năm 2009 phân tích số liệu tổng hợp từ kết quả của 8 nghiên cứu với tổng số 6.603 bệnh nhân ung thư phổi và 6678 đối chứng ghi nhận kiểu gen MDM2 SNP 309GG làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi theo mô hình gen lặn với $OR=1,17$, $95\% CI=1,02-1,34$. Khi phân tích theo chủng tộc tác giả nhận thấy sự gia tăng nguy cơ mắc ung thư phổi gặp ở người châu Á như sau: Kiểu gen TG so với TT ($OR=1,2$; $95\% CI=1,05-1,37$), GG so với TT ($OR=1,26$; $95\% CI=1,01-1,79$) và theo mô hình gen trội ($OR=1,26$; $95\% CI=1,11-1,43$). Tuy nhiên nghiên cứu không tìm thấy mối liên quan giữa kiểu gen SNP 309 MDM2 ở người Châu Âu và Người Châu Phi theo tất cả các mô hình gen. Như vậy, vai trò của kiểu gen theo chủng tộc cũng như môi trường sống cần được làm rõ trong mối quan hệ với nguy cơ phát sinh ung thư phổi. Các kết quả cụ thể của nghiên cứu được thể hiện ở bảng 4.2 [75].

Bảng 4.2: Kết quả phân tích kiểu gen SNP 309T>G gen *MDM2* và nguy cơ mắc ung thư phổi theo chủng tộc trong nghiên cứu của Gui (2009)

Chủng tộc	OR _{GG/TT} (95%CI)	OR _{TG/TT} (95%CI)	OR _{GG/TG+TT} (95%CI)	OR _{TG+GG/TT} (95%CI)
Tổng hợp	1,20 (0,98-1,47)	1,01 (0,89-1,16)	1,17 (1,02-1,34)	1,05 (0,91-1,22)
Châu Âu	1,11 (0,85-1,44)	0,92 (0,83-1,02)	1,11 (0,97-1,28)	0,95 (0,86-1,05)
Châu Á	1,34 (1,01-1,79)	1,20 (1,05-1,37)	1,21 (0,97-1,51)	1,26 (1,11-1,43)
Châu Phi	0,73 (0,14-3,83)	0,78 (0,44-1,38)	0,76 (0,15-3,99)	0,77 (0,45-1,34)

Phân tích gần đây hơn của Wenwu He và cộng sự năm 2012 cũng đưa ra kết quả tương tự với nguy cơ phát triển ung thư phổi theo mô hình gen lặn của SNP 309GG gen *MDM2* là OR=1,144 (95% CI=1,037-1,262) và ở người Châu Á theo mô hình gen trội là OR= 1,379 (95% CI=1,142-1,665) [86]. Nghiên cứu của Gui và Wenwu He bên cạnh ưu điểm vượt trội là số lượng mẫu nghiên cứu rất lớn so với nghiên cứu của chúng tôi vẫn còn những hạn chế có thể ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu. Thứ nhất, sự lựa chọn đối chứng từ các nghiên cứu có thể không đồng nhất mặc dù hầu hết được lựa chọn từ những quần thể khỏe mạnh nhưng chưa loại trừ được hết các nguy cơ phát triển ung thư phổi khác nhau. Thứ hai, số người châu Phi được nghiên cứu tương đối nhỏ, không có đủ sức mạnh thống kê để có thể phát hiện được mối liên quan có ý nghĩa thống kê. Thứ ba, kết quả của Gui dựa trên các ước tính chưa được điều chỉnh, trong khi

phân tích chính xác hơn nên được thực hiện nếu dữ liệu cá nhân có sẵn, điều này sẽ cho phép điều chỉnh bằng các biến số khác bao gồm tuổi, dân tộc, tình trạng hút thuốc, yếu tố môi trường và lối sống. Do vậy việc lựa chọn được các nhóm bệnh cũng như nhóm chứng tốt đồng thời xét các ước tính hiệu chỉnh theo các đặc điểm cá nhân sẽ đưa ra các kết quả chính xác đáng tin cậy hơn. Nghiên cứu của chúng tôi đã thực hiện tốt vấn đề này bằng cách lựa chọn nhóm ung thư phổi chặt chẽ theo tiêu chuẩn xét nghiệm giải phẫu bệnh. Nhóm chứng được lựa chọn trong những người đến khám sức khỏe, có sàng lọc ung thư và tương ứng về tuổi giới với nhóm bệnh. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng được hiệu chỉnh theo đặc điểm tuổi giới nhằm tìm ra mối liên quan chặt chẽ hơn. Tuy nhiên, hạn chế của nghiên cứu của chúng tôi vẫn là số lượng mẫu còn nhỏ nên khó tìm được mối liên quan có ý nghĩa thống kê. Hơn nữa, sự xem xét sự liên quan giữa gen - gen và gen-môi trường trong phân tích vẫn chưa được đề cập đến. Do đó, để có những hiểu biết tốt hơn và toàn diện về mối liên quan giữa đa hình gen MDM2 SNP309T>G với nguy cơ ung thư phổi cần phải được phân tích các yếu tố kể trên trong nghiên cứu.

4.4. Mối liên quan giữa đa hình gen *TP53* và gen *MDM2* với nguy cơ mắc ung thư phổi

Ung thư phổi là hậu quả của một quá trình phức tạp có sự tương tác giữa nhiều yếu tố bao gồm cả kiểu gen và môi trường. Do đó, một đa hình gen hay một yếu tố môi trường chỉ có thể có tác động khiêm tốn tới sự phát triển của bệnh. Vì vậy, các kết quả nghiên cứu đa hình gen cần được đánh giá trong mối liên quan đến đặc điểm sinh học cũng như yếu tố môi trường để có một cách đánh giá nguy cơ mắc bệnh một cách chính xác hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tìm hiểu mối liên quan giữa các đa hình gen *TP53*, gen *MDM2* và nguy cơ mắc ung thư phổi theo một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân ung thư phổi.

4.4.1. Mối liên quan giữa đa hình gen TP53 và nguy cơ mắc ung thư phổi theo một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trong ung thư phổi

Tuổi mắc bệnh: Chúng tôi tiến hành so sánh độ tuổi trung bình giữa các kiểu gen trong nhóm bệnh nhân ung thư phổi. Kết quả thu được chúng tôi nhận thấy kiểu gen SNP R72P P/P có tuổi trung bình thấp hơn kiểu gen SNP R72P R/R, tuy nhiên sự khác biệt về tuổi mắc bệnh giữa các kiểu gen *TP53* SNP R72P không có ý nghĩa thống kê. Theo công bố của tác giả Trịnh Quốc Đạt và cộng sự năm 2017 khi nghiên cứu trên bệnh nhân ung thư gan, kiểu gen đồng hợp SNP R72P P/P có độ tuổi trung bình thấp hơn kiểu gan nguyên thủy SNP R72P R/R là 7,7 năm ($p=0,01$). Đây là một kết quả rất đáng chú ý gợi ý sự thay đổi kiểu gen là nguyên nhân khiến cơ thể trở nên nhạy cảm và dễ mắc ung thư hơn. Tuy nhiên ung thư gan cũng là một loại ung thư chịu ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố nguy cơ như nghiện rượu, xơ gan, viêm gan virus..., vì vậy sự nhạy cảm với ung thư cần phải được nghiên cứu trong sự tương tác giữa kiểu gen với môi trường.

Giới: Khi phân tích mối liên quan theo giới chúng tôi không ghi nhận được mối liên quan có ý nghĩa thống kê mặc dù xu hướng thể hiện kiểu gen SNP R72P P/P có thể làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi ở nữ giới hơn là nam giới. Rất ít các nghiên cứu đi sâu vào tìm hiểu mối liên quan giữa SNP R72P gen *TP53* theo giới và các kết quả cũng còn nhiều mâu thuẫn. Một số nghiên cứu nhận thấy kiểu gen SNP R72P P/P gen *TP53* làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi ở nam giới hơn nữ giới như nghiên cứu của Piao và CS. hay kết quả nghiên cứu của Irraraza và CS. (2003) công bố alen P làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi ở nam giới hơn ở nữ giới [126], [175]. Ngược lại, một số nghiên cứu khác trên thế giới lại chỉ ra SNP R72P P/P làm gia tăng nguy cơ mắc ung thư phổi ở nữ giới hơn ở nam giới [61], [176]. Sự khác biệt về cỡ mẫu có thể dẫn tới khác biệt về tính nhạy cảm với ung thư phổi giữa nam và

nữ. Nghiên cứu của Piao với số lượng mẫu rất lớn, được thu thập trong 10 năm từ 2000 đến năm 2010 với 3.939 bệnh nhân ung thư phổi và 1.700 đối chứng tại Hàn Quốc có thể đưa ra một gợi ý khá chính xác về kiểu gen SNP R72P P/P làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi ở nam giới [126].

Mô bệnh học: Ảnh hưởng của tính đa hình gen *TP53* có thể khác nhau trên các type mô bệnh học khác nhau. Trong nghiên cứu của chúng tôi với đặc điểm bệnh nhân ung thư phổi phần lớn thuộc loại ung thư biểu mô tuyến (73,2%), tiếp đến là ung thư tế bào nhỏ chiếm 9,5% và ung thư biểu mô vảy chiếm 5,9%; chúng tôi đã tiến hành phân tích tìm hiểu mối liên quan giữa các kiểu gen SNP R72P với các typ ung thư. Các kết quả phân tích cho thấy xu hướng làm tăng nguy cơ mắc các typ mô bệnh học trong UTBMKTBN ở kiểu gen chứa alen Pro nhưng đều không có ý nghĩa thống kê (bảng 3.5). Như vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi chưa ghi nhận được một mối liên quan nào có ý nghĩa thống kê giữa SNP R72P gen *TP53* với nguy cơ mắc ung thư phổi theo typ mô bệnh học. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu ghi nhận được mối liên quan của đa hình gen *TP53* SNP R72P với sự phát triển các typ mô bệnh học của ung thư phổi. Nghiên cứu của Piao tại Hàn Quốc nhận thấy kiểu gen SNP R72P P/P làm tăng nguy cơ mắc tất cả các typ mô bệnh học của ung thư phổi hơn so với kiểu gen SNP R72P R/R một cách có ý nghĩa, trong đó nguy cơ mắc ung thư tế bào nhỏ và ung thư tế bào vảy là cao nhất (OR lần lượt là 2,38 và 2,15) [126]. Nhiều nghiên cứu đã phân tích mối liên quan của SNP R72P gen *TP53* theo typ mô bệnh học của ung thư phổi nhưng kết quả cũng chưa được thống nhất. Liu và cộng sự công bố kiểu gen SNP R72P P/P làm tăng nguy cơ gây ung thư biểu mô tuyến hơn ung thư biểu mô vảy [137]. Một số nghiên cứu khác lại công bố kiểu gen SNP R72P P/P làm tăng nguy cơ ung thư biểu mô vảy hơn ung thư biểu mô tuyến như nghiên cứu của Sakiyama và CS. năm 2005, Zhang và CS. năm 2006, Popanda năm 2007,

Fernandez-Rubio và CS. năm 2008 [177], [88], [178], [61]. Các kết quả này gợi ý kiểu gen P/P codon 72 gen *TP53* làm tăng nguy cơ mắc ung thư biểu mô vảy hơn ung thư biểu mô tuyến.

Hút thuốc lá: Mặc dù hút thuốc làm tăng nguy cơ nhiều loại khối u nhưng có lẽ không có khối u ác tính nào liên quan mật thiết với hút thuốc lá hơn ung thư phổi. Hút thuốc lá có thể ảnh hưởng đến quá trình phát sinh ung thư thông qua tương tác với các đa hình của gen. Nó có thể tác động trực tiếp đến DNA gây biến đổi gen đặc biệt là gen *TP53* [179]. Mức độ nguy cơ sẽ tăng lên cùng với số năm hút thuốc lá, số lượng thuốc lá tiêu thụ hàng ngày và lứa tuổi lúc bắt đầu hút thuốc lá càng sớm càng nguy hiểm. Hút bao nhiêu thuốc thì tăng nguy cơ bị ung thư phổi? Người ta thấy rằng với bất kỳ lượng thuốc hút nào cũng gây tăng nguy cơ mắc ung thư phổi. Nói cách khác không có giới hạn dưới của của lượng thuốc hút cần thiết để gây ung thư phổi. Thời gian hút thuốc lá cũng rất quan trọng, thời gian hút càng dài thì tác hại càng lớn [17].

Hút thuốc thụ động cũng làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi với chỉ số nguy cơ tương đối khoảng từ 1,2 đến 1,5. Hút thuốc thụ động, khói thuốc lá trong môi trường, cũng được coi là nguyên nhân của khoảng 50.000 ca tử vong hàng năm. Hút thuốc thụ động là hít phải một hỗn hợp của hai loại khói từ thuốc lá đang cháy: dòng khói phụ xuất phát từ điếu thuốc lá hay xì gà, chứa các hạt nhỏ hơn dễ dàng xâm nhập vào tế bào, rất giàu các chất gây ung thư và dòng khói do chính mà người hút thuốc thở ra [17].

Khi đồng thời hút thuốc và có tiếp xúc với yếu tố độc hại khác trong môi trường hay trên những cá thể mang kiểu gen nhạy cảm thì nguy cơ gây ung thư phổi sẽ tăng lên gấp nhiều lần. Vì vậy, rất cần có các nghiên cứu tìm hiểu mối liên quan giữa hút thuốc lá đa hình kiểu gen với nguy cơ mắc ung thư phổi nhằm nâng cao công tác dự phòng cũng như chẩn đoán, theo dõi điều trị ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đặt ra mục tiêu tìm hiểu mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *TP53*,

gen MDM2 và thói quen hút thuốc lá với nguy cơ mắc ung thư phổi. Tất cả các đối tượng nghiên cứu đều được phỏng vấn về tình trạng hút thuốc và phân tích cùng với kiểu gen đa hình nhằm phát hiện mối liên quan có ý nghĩa.

Nghiên cứu về ung thư phổi, hầu hết các nghiên cứu đều đề cập đến yếu tố hút thuốc lá, tuy nhiên đây lại là một yếu tố khó lượng giá và tách rời khỏi những ảnh hưởng của môi trường. Qua phân tích tỷ lệ hút thuốc lá ở cả 2 nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng, kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã khẳng định lại một lần nữa hút thuốc lá làm tăng nguy cơ ung thư phổi gấp 1,78 lần so với không hút thuốc. Không những vậy, mức độ nguy cơ còn tăng theo số bao – năm. Với những người hút < 20 bao-năm, nguy cơ mắc ung thư phổi tăng 1,68 lần trong khi những người hút > 20 bao-năm, mức nguy cơ tăng lên gấp 1,87 lần (bảng 3.20). Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi không ghi nhận được mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa tình trạng hút thuốc và sự phân bố kiểu gen *TP53* codon 72 cũng như mối liên quan với nguy cơ mắc ung thư phổi theo các mô hình gen (bảng 3.16). Phân tích mối liên quan giữa mức độ hút thuốc với nguy cơ mắc ung thư phổi theo các mô hình gen chúng tôi cũng không phát hiện được mối liên quan có ý nghĩa (bảng 3.16). Mặc dù vậy, khi phân tích kết hợp kiểu gen đa hình nucleotid đơn R72P R/P gen *TP53* với tình trạng hút thuốc lá, chúng tôi nhận thấy những người có kiểu gen SNP R72P P/P mà hút thuốc lá thì nguy cơ mắc ung thư phổi cao hơn 3,06 lần (OR=3,06; 95% CI=1,37 – 6,84) thể hiện ở bảng 3.20. Kết quả này gợi ý trên những người mang kiểu gen nhạy cảm, khi có tiếp xúc với các yếu tố nguy cơ khác sẽ gây cộng hưởng làm tăng nguy cơ mắc bệnh cao hơn. Như vậy, nếu nắm rõ kiểu gen của mỗi các thể cũng như tính nhạy cảm với ung thư phổi trong sự tương tác với các yếu tố nguy cơ khác sẽ giúp cho chúng ta có những biện pháp dự phòng, ngăn chặn sự xuất hiện của bệnh được tốt hơn. Nhiều nghiên cứu đã được tiến hành nhằm đánh giá sự tương tác giữa đa hình codon 72 gen *TP53*, hút thuốc lá và nguy cơ ung thư phổi nhưng tác động của việc hút thuốc trên những người mang kiểu gen khác nhau của SNP R72P gen

TP53 với nguy cơ ung thư phổi còn chưa nhất quán [77], [88], [61], [177]. Một số nghiên cứu báo cáo rằng hút thuốc lá có thể điều chỉnh đáp ứng của đa hình tại codon 72 gen *TP53* tới ung thư phổi như các nghiên cứu của Fan và CS. năm 2000, Zhang và CS. năm 2006, Fernandez-Rubio năm 2008 [77], [88], [61]. Fernandez-Rubio và cộng sự ghi nhận đa hình kiểu gen *TP53* tại codon 72 làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi theo mô hình gen trội trong đó nguy cơ tăng cao hơn ở người hút thuốc so với người không hút thuốc với OR lần lượt là 1,48 và 1,34 (95% CI lần lượt là 1,01-2,16 và 1,04-1,73) [61]. Nghiên cứu của Dazhong Liu và cộng sự đã chỉ ra đa hình gen *TP53* tại codon 72 làm thay đổi nguy cơ ung thư phổi liên quan đến hút thuốc lá, cho thấy tương tác giữa hút thuốc và đa hình gen ảnh hưởng đến sự phát sinh ung thư [101]. Một số kết quả nghiên cứu khác lại ghi nhận tương tự như chúng tôi về mối liên quan của hút thuốc lá và kiểu gen đa hình tại codon 72 gen *TP53*. Nghiên cứu của Sakiyama năm 2005 và Piao năm 2011 gợi ý rằng hút thuốc không làm thay đổi mối liên hệ giữa đa hình codon 72 gen *TP53* và nguy cơ ung thư phổi [177], [126]. Nghiên cứu Siyang và cộng sự năm 2013 nhận thấy đa hình nucleotid đơn gen *TP53* R72P R/P không liên quan đáng kể đến nguy cơ ung thư phổi dù người bệnh có hút thuốc hay không. Nghiên cứu tại Iran năm 2016 cũng không ghi nhận được mối liên quan giữa tình trạng hút thuốc tương tác với đa hình gen codon 72 *TP53* với nguy cơ ung thư phổi [136]. Sự khác biệt trong các kết quả có thể là do khác nhau về cỡ mẫu, hay sự khác nhau các tần số gen trên các chủng tộc khác nhau và tình trạng phơi nhiễm với các yếu tố trong môi trường sống.

4.4.2. Mối liên quan giữa đa hình gen MDM2 SNP 309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trong ung thư phổi

Tuổi mắc bệnh: về mặt cơ chế đã được chứng minh, kiểu gen GG làm gia tăng sự tổng hợp MDM2 cao gấp 2,5 lần so với kiểu gen nguyên thủy TT, điều này dẫn đến người mang kiểu gen này tăng nguy cơ mắc ung thư và tuổi mắc bệnh sớm hơn nhiều năm so với người không mang kiểu gen đột biến [49].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng tiến hành phân tích tuổi mắc bệnh giữa các kiểu gen trong nhóm bệnh tuy nhiên không ghi nhận được sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Với số lượng mẫu là 220 bệnh nhân ung thư phổi có thể không đủ độ lớn để tìm ra sự khác biệt này.

Giới: Chúng tôi cũng tiến hành phân tích tìm mối liên quan của SNP 309T>G gen *MDM2* theo giới và ghi nhận sự gia tăng nguy cơ mắc ung thư phổi có ý nghĩa ở nhóm nam giới theo mô hình gen lặn (OR=1,66; 95% CI=1,01-2,76). Kết quả này ngược với nghiên cứu của Wenwu He và cộng sự năm 2012 ghi nhận nguy cơ mắc ung thư phổi tăng ở nữ giới mang kiểu gen GG (OR=1,282; 95% CI= 1,062-1,548). Tuy nhiên, bên cạnh nghiên cứu của Wenwu He, công bố của Chua và cộng sự năm 2010 cho thấy kiểu gen SNP 309TT lại làm tăng nguy cơ ung thư phổi ở nữ giới không hút thuốc lá mà không phải là kiểu gen SNP 309GG. Cơ chế để giải thích sự khác biệt này hiện vẫn chưa rõ ràng, nhưng có khả năng liên quan đến các receptor của estrogen ảnh hưởng đến điều hoà biểu hiện gen *MDM2*. Thụ thể estrogen đã được phát hiện rộng rãi trong các tế bào ung thư phổi, cho thấy rằng hormone steroid sinh dục có thể đóng một vai trò quan trọng trong sinh bệnh học của bệnh ung thư phổi [180], [181]. Bên cạnh đó, *MDM2* có thể đóng vai trò trong quá trình tăng sinh estrogen mạnh mẽ trong tế bào độc lập với con đường tín hiệu p53 [182]. *MDM2* có thể gây tăng biểu hiện của tiểu đơn vị p65 của NF- κ B, một yếu tố chống lại quá trình chết theo chương trình được biểu hiện trong các tế bào ung thư [183]. Ngoài ra, SNP 309T>G của *MDM2* làm tăng gắn kết đối với Sp1, yếu tố hoạt hóa thụ thể của nhiều hormon trong đó có estrogen. Do đó, nó có thể có khả năng ảnh hưởng đến sự điều hòa sao chép *MDM2* phụ thuộc hormon dẫn đến làm tăng protein *MDM2* trong tế bào [184], [185]. Với các cơ chế kể trên, biến thể di truyền *MDM2* 309T>G có thể làm gia tăng sự hình thành ung thư phổi theo một cách đặc hiệu về giới [186]. Tuy nhiên, kết quả nên được giải thích cẩn thận vì tăng nguy cơ ung thư phổi đã không được tìm thấy trong các mô hình cộng gộp và mô hình gen trội. Trong nghiên cứu

của chúng tôi, việc không tìm thấy mối liên quan với nguy cơ ung thư phổi ở nữ giới có thể được giải thích do cỡ mẫu nghiên cứu còn nhỏ. Số lượng bệnh nhân ung thư phổi là nam giới chiếm đa số nên có chi phối kết quả phân tích một cách khá rõ ràng. Do đó, cần có các nghiên cứu tiếp theo về phân tầng cho giới có thể làm tăng sức mạnh cho ước tính mối liên quan theo các cơ chế kể trên.

Mô bệnh học: Phân tích mối liên quan của SNP 309T>G gen *MDM2* với typ mô bệnh học, nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận kiểu gen GG làm tăng khả năng mắc ung thư phổi không tế bào nhỏ 1,71 lần theo mô hình gen lặn (OR=1,71; 95%CI=1,09 – 2,68), UTBM tuyến là 1,69 lần (OR=1,69; 95%CI=1,05 – 2,72). Lý do chúng tôi chưa ghi nhận được mối liên quan với các typ mô bệnh học khác của ung thư phổi có thể do số lượng bệnh nhân ung thư phổi trong nghiên cứu này chủ yếu là UTBM tuyến. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự như Sun Ha Park và cộng sự năm 2006 công bố kiểu gen SNP 309GG gen *MDM2* làm tăng nguy cơ ung thư biểu mô tuyến 1,91 lần (OR=1,91; 95% CI =1,16-3,14) [89]. Lind và cộng sự năm 2006 cũng ghi nhận sự gia tăng nguy cơ mắc UTKTBN lên 1,62 lần theo mô hình gen lặn (OR=1,62; 95% CI=1,06–2,50) [169]. Yang-Wu R. và cộng sự (2013) nghiên cứu trên 764 bệnh nhân ung thư phổi và 983 đối chứng cho thấy tính đa hình đơn tại vị trí 309 gen *MDM2* gia tăng nguy cơ gây ung thư biểu mô tuyến ở nữ giới không hút thuốc lá [187]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu cộng gộp của Wenlei Zhou và cộng sự mặc dù nghiên cứu trên 1 số lượng mẫu rất lớn tổng hợp từ 10 nghiên cứu trên các quần thể khác nhau nhưng không tìm được sự tăng nguy cơ của kiểu gen đến ung thư phổi theo các type mô bệnh học [85]. Hạn chế của các nghiên cứu cộng gộp là sự không đồng nhất trong lựa chọn mẫu đối chứng cũng như thông tin thu thập không thống nhất giữa các nghiên cứu dẫn đến các kết quả có những mâu thuẫn và ảnh hưởng đến kết quả phân tích chung.

Hút thuốc lá: Phân tích mối liên quan giữa SNP 309T>G gen *MDM2* với thói quen hút thuốc lá cho thấy một sự gia tăng khả năng mắc ung thư phổi 2,09 lần

(95% CI= 1,01 – 4,31) ở những người có hút thuốc lá theo mô hình gen lặn. Khi so sánh những người có kiểu gen GG có hút thuốc lá với những người có kiểu gen TT không hút thuốc lá, nguy cơ mắc ung thư phổi tăng cao lên 2,3 lần (95% CI= 1,07 – 4,93). Ghi nhận này của chúng tôi phù hợp với những nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh hút thuốc lá là yếu tố nguy cơ chính dẫn đến ung thư phổi và người có kiểu gen SNP 309 GG hút thuốc lá làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi. Nghiên cứu của Sun Ha Park năm 2006 trên 582 bệnh nhân ung thư phổi và 582 đối chứng ghi nhận nguy cơ mắc ung thư phổi của những người mang kiểu gen GG có hút thuốc lá tăng gấp 1,9 lần so với những người mang kiểu gen TT [89]. Tuy nhiên, các công bố của Wenwu He và Wenlei Zhou năm 2012 ghi nhận nguy cơ mắc ung thư phổi tăng ở người không hút thuốc lá mang kiểu gen GG với OR lần lượt là 1,76; 95% CI= 1,36 - 2,29 và 1,12; 95% CI= 0,992 - 1,27) [86], [85]. Cơ chế chính xác vẫn chưa được hiểu một cách đầy đủ. Để giải thích cho kết quả dường như đi ngược với suy luận trước đây, tác giả đã viện dẫn một số kết quả nghiên cứu về vai trò của *MDM2* trong ung thư. Nghiên cứu của Manfredi năm 2010 đã chỉ ra vai trò của *MDM2* có thể là một gen sinh ung thư cũng có thể là một gen áp chế ung thư tùy thuộc vào hoàn cảnh cụ thể [69]. *MDM2* có thể gắn với p53 và thúc đẩy quá trình giáng hóa p53 ở điều kiện tế bào bình thường nhưng lại hoạt hóa quá trình sao chép p53 dưới các stress tế bào [188]. Do đó, vì hút thuốc lá có thể gây ra các stress tế bào dẫn đến các thương tổn nghiêm trọng DNA làm cho 2 quá trình có thể xảy ra trong tế bào. Một mặt, dưới điều kiện tế bào bị stress, *MDM2* có thể làm tăng sao chép *TP53* dẫn đến làm tăng nồng độ p53 trong tế bào dẫn đến ức chế hình thành khối u trong mô phổi [189], [190]. Mặt khác, tổn thương DNA nghiêm trọng có thể kích hoạt trực tiếp quá trình chết theo chương trình trong tế bào mô phổi độc lập với con đường tín hiệu p53 [191]. Điều này có thể giúp giải thích một số kết quả nghiên cứu phân tích tương tác của *MDM2* với hút thuốc lá lại thấy hút thuốc lá làm giảm nguy cơ. Điều này gợi ý một sự tương tác phức tạp giữa kiểu gen nhạy cảm ung thư với các yếu tố nguy cơ

khác trong quá trình phát sinh phát triển ung thư và cần được nghiên cứu sâu hơn về cơ chế bệnh học phân tử.

4.4.3. Kết hợp đa hình kiểu gen SNP R72P và SNP309 MDM2 với nguy cơ ung thư phổi

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phân tích xem có mối liên quan tồn tại giữa các kiểu đa hình gen *TP53* và *MDM2* hay không? Chúng tôi sử dụng những cá thể mang kiểu gen nguyên thủy *TP53* SNP R72P R/R và *MDM2* 309TT là cá thể tham chiếu. So sánh nguy cơ mắc ung thư phổi theo mức độ tăng dần trên lý thuyết của tổ hợp các kiểu gen tại SNP R72P gen *TP53* và 309T>G gen *MDM2*, kết quả phân tích được tập hợp ở bảng 3.21. Như vậy, kết quả này chưa ghi nhận được sự liên quan có ý nghĩa thống kê khi kết hợp hai đa hình gen nghiên cứu với nguy cơ mắc ung thư phổi. Một số nghiên cứu trên thế giới đã tìm được mối liên quan này, tuy nhiên các nghiên cứu được thực hiện trên các đối tượng nghiên cứu khác nhau. Yang-Wu Ren (2013) nghiên cứu trên các bệnh nhân nữ ung thư biểu mô tuyến không hút thuốc lá ghi nhận những người mang kiểu gen *TP53* SNP R72P P/P và *MDM2* 309GG có nguy cơ mắc ung thư phổi cao hơn 2,66 lần so với những người mang kiểu gen nguyên thủy [187]. Nghiên cứu của Young Joon Yoon (2008) trên bệnh nhân ung thư gan cho kết quả rất ấn tượng về mối liên quan này. Theo công bố của nhóm tác giả trên, những người mang kiểu gen *TP53* SNP R72P P/P và *MDM2* 309GG có nguy cơ mắc ung thư gan cao gấp 9,35 lần so với người mang kiểu gen nguyên thủy [192].

Nghiên cứu của chúng tôi vẫn còn nhiều hạn chế có thể ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu. Thứ nhất, cỡ mẫu vẫn còn tương đối nhỏ vì vậy sức mạnh thống kê còn thấp. Thứ hai, nhiều trường hợp bệnh nhân khi đến với chúng tôi không còn hút thuốc lá nhiều năm nên thông tin chi tiết về tình trạng hút thuốc lá có thể có những sai số. Mặt khác, kết quả nghiên cứu có thể bị nhiễu bởi tình trạng hút thuốc lá thụ động chưa được đánh giá ở đây. Một yếu tố nữa dẫn đến hạn chế trong kết quả nghiên cứu

của chúng tôi đó là đối tượng nghiên cứu trong các phân nhóm để phân tích còn ít như các typ mô bệnh học ung thư, nữ giới bị ung thư phổi hay chúng tôi không gặp được trường hợp nữ hút thuốc lá nào trong nghiên cứu. Cuối cùng, đây là một nghiên cứu lựa chọn nhóm nghiên cứu tại bệnh viện nên các đối tượng có thể không đại diện cho dân số nói chung. Các nghiên cứu trong tương lai cần được thiết kế tốt hơn với cỡ mẫu lớn có thể khám phá thêm các vai trò tiềm ẩn của tương tác gen và môi trường trong nguy cơ của bệnh ung thư phổi.

KẾT LUẬN

1. Tỷ lệ kiểu gen của một số đa hình gen *TP53* và gen *MDM2* ở nhóm nghiên cứu

1.1. Gen *TP53*

❖ SNP dup16

- Tần số kiểu gen A1A2 ở nhóm bệnh và nhóm chứng lần lượt là 3,6% và 1,7%, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

❖ **SNP R72P:**

- Tần số alen biến đổi C ở nhóm bệnh và nhóm chứng lần lượt là 50,2% và 46,1%.
- Tần số kiểu gen SNP R72P R/R, R/P và P/P ở nhóm bệnh và nhóm chứng lần lượt là: 25,9%, 47,7%, 26,4% và 33,5%, 40,9%, 25,7%.
- Kiểu gen dị hợp tử SNP R72P R/P chiếm đa số trong cả nhóm bệnh và nhóm chứng.

❖ **Các SNP: P34P, P36P, P47S, V217M, G360A**

- Không phát hiện được sự khác biệt kiểu gen tại các vị trí SNP P34P (CCC → CCA) và P36P (CCG → CCT), P47S, V217M, G360A ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng.

1.2. SNP 309T>G gen *MDM2*

- Tần số alen biến đổi G ở nhóm bệnh và nhóm chứng lần lượt là 50,7% và 47,6%.
- Tần số kiểu gen TT, TG và GG ở nhóm bệnh và nhóm chứng lần lượt là: 27,3%, 44,1%, 28,6% và 23,9%, 57,0%, 19,1%.
- Kiểu gen dị hợp tử TG chiếm đa số trong cả nhóm bệnh và nhóm chứng.

2. Mối liên quan giữa một số đa hình gen *TP53* và gen *MDM2* và nguy cơ ung thư phổi

2.1. Gen *TP53*

- Không có mối liên quan giữa SNP dup16 với nguy cơ mắc ung thư phổi.
- Không có mối liên quan có ý nghĩa giữa đa hình đơn gen R72P gen *TP53* với nguy cơ mắc ung thư phổi theo tất cả các mô hình di truyền.
- Người mang kiểu gen SNP R72P P/P gen *TP53* có hút thuốc lá: nguy cơ mắc ung thư phổi cao hơn người mang kiểu gen SNP R72P R/R không hút thuốc lá 3,06 lần (OR = 3,06; 95% CI = 1,37 – 6,84).

2.2. Gen *MDM2*

- Kiểu gen *MDM2* SNP 309T>G làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi 1,7 lần theo mô hình gen lặn (OR_{GG/TG+TT} = 1,7; 95% CI = 1,09 – 2,63), tăng nguy cơ mắc ung thư phổi ở nam giới và nguy cơ mắc UTBM tuyến theo mô hình gen lặn với OR_{GG/TG+TT} lần lượt là 1,66 lần (95% CI = 1,01 – 2,76); 1,69 lần (95% CI = 1,05 – 2,72).
- Kiểu gen *MDM2* SNP 309T>G làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi ở những người hút thuốc lá 2,09 lần theo mô hình gen lặn (OR = 2,09; 95% CI = 1,01 – 4,31).
- Người mang kiểu gen GG có hút thuốc lá nguy cơ mắc ung thư phổi cao hơn người mang kiểu gen TT không hút thuốc lá 2,3 lần (OR = 2,30; 95% CI = 1,07 – 4,93).

KIẾN NGHỊ

1. Cần triển khai nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để có thể phát hiện các mối liên quan giữa đa hình gen *TP53* và gen *MDM2* với nguy cơ mắc ung thư phổi cũng như một số loại hình ung thư khác ở Việt Nam.
2. Cần phải nghiên cứu kiểu gen *TP53* và *MDM2* trong sự tương tác với các yếu tố nguy cơ ung thư phổi bằng mô hình tiến cứu, bằng việc theo dõi các đối tượng phơi nhiễm theo thời gian sẽ có tỷ lệ phát bệnh cho mỗi kiểu gen *TP53* và *MDM2*.

CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Trần Khánh Chi, Trần Văn Khánh, Nguyễn Đức Hình, Nguyễn Thị Hà, Lê Văn Hưng, Tạ Thành Văn, Trần Huy Thịnh (2014). Xác định tính đa hình đơn Pro47Ser p53 trên bệnh nhân ung thư phổi bằng kỹ thuật giải trình tự gen. *Tạp chí nghiên cứu y học*. Tập 91, số 5, trang 1-5.
2. Trần Khánh Chi, Trần Văn Khánh, Nguyễn Đức Hình, Nguyễn Thị Hà, Trần Thị Oanh, Tạ Thành Văn, Trần Huy Thịnh (2014). Xác định tính đa hình đơn tại vị trí 309 của gen MDM2 ở bệnh nhân ung thư phổi bằng phương pháp PCR-RFLP. *Tạp chí nghiên cứu y học*. Tập. 90, số 5, trang 35-42.
3. Trần Khánh Chi, Trần Huy Thịnh, Nguyễn Thị Hà và Trần Văn Khánh (2015). Đa hình đơn Nucleotid 309 gen MDM2 và nguy cơ ung thư phổi. *Tạp chí Y học Việt Nam*. Tập 433, số đặc biệt, trang 50-54
4. Trần Khánh Chi, Trần Huy Thịnh (2017). Xác định tính đa hình thêm 16 base pairs ở vùng intron 3 gen TP53 trên bệnh nhân ung thư phổi bằng phương pháp PCR. *Tạp chí nghiên cứu y học*. Tập 107, số 2, trang 1-6.
5. Trần Khánh Chi, Trần Huy Thịnh (2017). Mối liên quan giữa SNP72 gen p53 và SNP 309 gen MDM2 với nguy cơ ung thư phổi. *Tạp chí nghiên cứu y học*. Tập 106, số 1, trang 1-8.
6. Trần Khánh Chi, Lê Hoàn, Trần Huy Thịnh (2017). Xác định một số đa hình gen TP53 trong ung thư phổi. *Tạp chí Y học Việt Nam*. Số đặc biệt, trang 176-182.

PHỤ LỤC 1
PHIẾU THÔNG TIN BỆNH NHÂN

I. Thông tin chung

- Họ và tên : Nam Nữ
- Năm sinh :
- Địa chỉ :
- Điện thoại :
- Mã số hồ sơ :
- Chiều cao:..... cân nặng :.....

II. Tiền căn

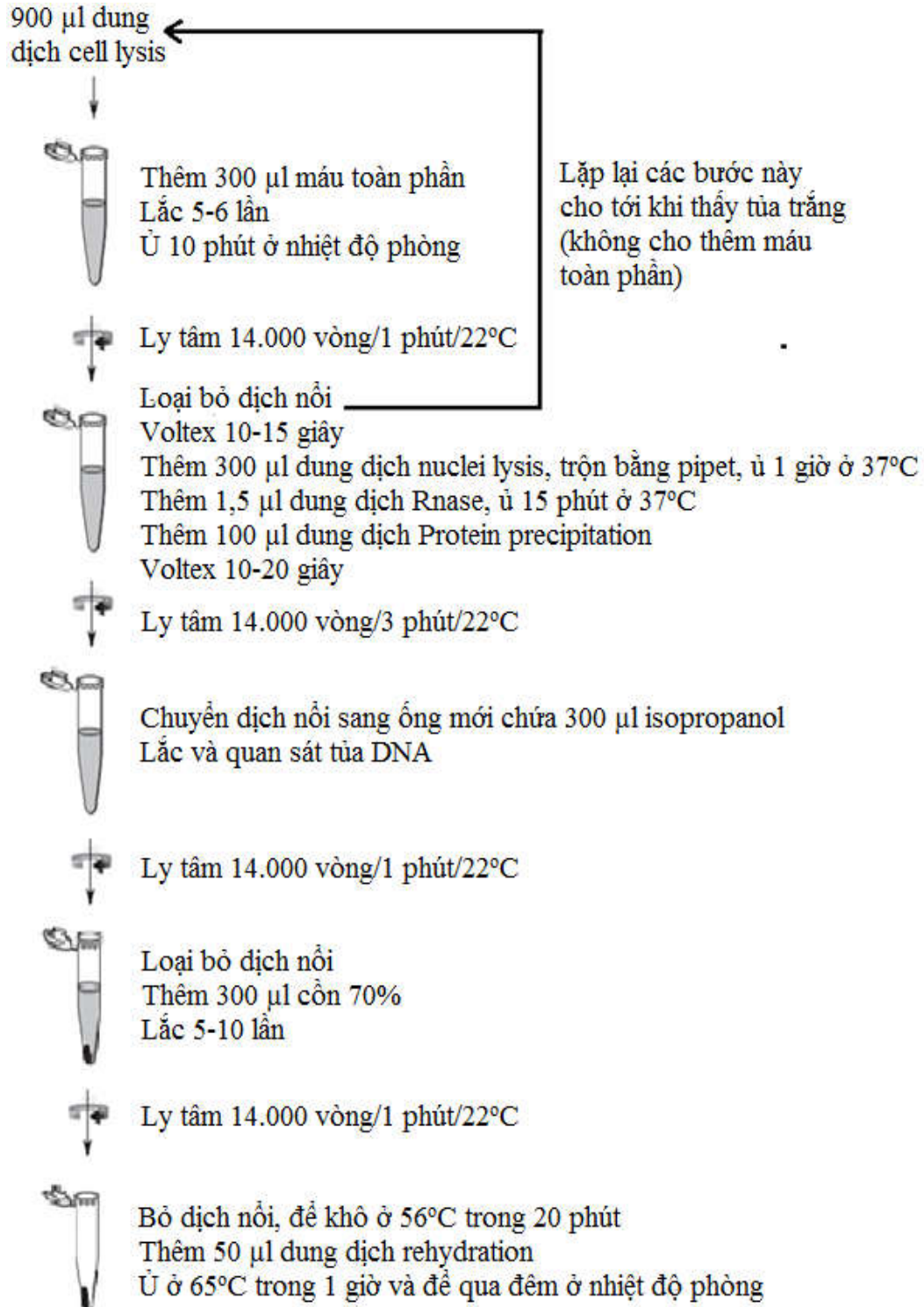
- 1.Hút thuốc lá : có không Số bao-năm:
- 2.Tiếp xúc với hóa chất :
- 3.Các bệnh lý khác đã mắc trước đây :

III. Tình trạng bệnh ung thư phổi hiện tại (thời điểm vào nghiên cứu)

- 4.Thời điểm phát hiện ung thư phổi :
- 5.Phân độ ung thư phổi : (T...M...N...)
- 6.Loại mô bệnh học K phổi : carcinoma tế bào tuyến
- carcinoma tế bào vảy
- carcinoma tế bào lớn

PHỤ LỤC 2

QUY TRÌNH TÁCH DNA TỪ MÁU TOÀN PHẦN THEO KIT PROMEGA



PHỤ LỤC 3

QUY TRÌNH KỸ THUẬT PCR

❖ *Thành phần của phản ứng:*

- 10 x buffer: 2 μ l
- dNTP: 2 μ l
- Taq polymerase: 0,2 μ l
- Môi xuôi/Môi ngược: 1 μ l
- DNA: 150 ng
- Nước cất: 12.8 μ l

❖ *Tổng thể tích của phản ứng: 20 μ l.*

❖ *Chu trình của phản ứng PCR như sau:*

94°C trong 5 phút

94°C trong 30 giây

56°C trong 30 giây

72°C trong 30 giây

72°C trong 5 phút

} 25 chu kỳ

PHỤ LỤC 4

QUY TRÌNH ĐIỆN DI SẢN PHẨM PCR

❖ *Cách làm gel agarose 1,5% (3%)*

- Cân 1,5g (3g) agarose hòa tan trong 10ml boric acid EDTA (TBE) (sử dụng lò vi sóng). Sau khi agarose tan hết, để nguội 55- 60°C, đổ vào khuôn gel, tùy thuộc vào số lượng giếng cần cho điện di mà cài lược làm giếng từ 4- 6- 8- 12 răng.

❖ *Cách pha dung dịch TBE 10X (Tris; acid boric; EDTA):*

Tris 0,89M; acid boric 0,89M; EDTA 0,02M

❖ *Tiến hành kỹ thuật điện di*

Thành phần	Ống chuẩn	Ống bệnh nhân
Dung dịch TLPT chuẩn (Hae III)	10 μ l	
cDNA	-	9 μ l
Loading buffer 10X	-	1 μ l
Tổng số	10 μ l	10 μ l

- Đưa gel agarose vào máy điện di, cho TBE đến ngập gel
- Dùng pipet và đầu côn nhỏ hút lần lượt dung dịch ở mỗi ống đưa vào giếng (10 μ l/giếng)
- Máy điện di 80- 100v (Mupid- Nhật Bản), điện di trong khoảng 30 phút.
- Sau điện di, gel được ngâm vào Edithilium bromide 20 phút, rửa qua nước cất và đưa vào soi dưới đèn UV, chụp ảnh

PHỤ LỤC 5
QUY TRÌNH KỸ THUẬT PCR-RELP

- Khuếch đại gen với cặp mồi đặc hiệu (quy trình PCR)
- Điện di kiểm tra.
- Thực hiện cắt sản phẩm PCR với enzym đặc hiệu tương ứng.

Thành phần phản ứng cắt enzym:

STT	Thành phần	Thể tích
1	Sản phẩm PCR	10 μ l
2	Đệm 10x	1.5 μ l
3	Nước	2.5 μ l
4	Enzym	1 μ l
5	Tổng thể tích	15 μ l

- Hỗn hợp được ủ ở 37⁰C trong 18-22 giờ. Sản phẩm cắt được điện di trên gel 2-3%.
- Phản ứng cắt enzym đạt yêu cầu khi các băng điện di rõ nét, không có băng phụ.

PHỤ LỤC 6
QUY TRÌNH TINH SẠCH SẢN PHẨM PCR
TRÊN GEL AGAROSE

Sử dụng Promega Wizard SV gel clean-up system (Promega, USA).

1. Chuẩn bị dung dịch rửa màng (membrane wash solution). Thêm ethanol 95% vào lọ dung dịch rửa màng. Lượng ethanol cho thêm vào phụ thuộc vào thể tích của lọ dung dịch rửa màng (được quy định sẵn trong mỗi kit).
2. Cắt phần gel agarose có chứa sản phẩm PCR mong muốn (hiển thị dưới đèn chiếu UV). Ước lượng trọng lượng miếng gel.
3. Cho miếng gel vào ống có dung tích 1,5 ml, thêm vào 10 µl dung dịch bám màng (membrane binding solution) cho mỗi 10 mg trọng lượng miếng gel.
4. Nhẹ nhàng trộn đều hỗn hợp trong ống và ủ ống ở 50-60°C trong 10 phút hoặc cho đến khi quan sát thấy miếng gel tan hoàn toàn. Ly tâm ống để toàn bộ DNA tập trung xuống đáy ống.
5. Đặt cột lọc (SV Minicolumn) vào một ống thu thập. Chuyển toàn bộ hỗn hợp gel đã hòa tan vào cột lọc và ủ 1 phút ở nhiệt độ phòng.
6. Ly tâm phức hợp cột lọc-ống thu thập ở tốc độ 14 000 vòng/phút.
7. Gỡ cột lọc ra, đổ bỏ phần dung dịch trong ống thu thập. Sau đó đặt cột lọc lại trong ống thu thập.
8. Thêm vào cột lọc 700 µl dung dịch giữa màng và ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 1 phút. Lặp lại bước 7.
9. Thêm vào cột lọc 500 µl dung dịch rửa màng và ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút.
10. Chuyển cột lọc sang một ống 1,5 ml mới. Thêm vào cột 50 µl Nuclease-Free Water. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút, sau đó ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút, trong 1 phút.
11. Bỏ cột lọc, dung dịch trong ống chứa DNA đích đã được tinh sạch. Tiếp tục thực hiện các kỹ thuật hoặc cất giữ ống ở -20°.

PHỤ LỤC 7

QUY TRÌNH GIẢI TRÌNH TỰ GEN TRỰC TIẾP

Giải trình tự gen: theo qui trình và sử dụng phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).

Quy trình thực hiện:

1. Cho vào ống dung tích 200 μ l các thành phần sau.

Thành phần	Thể tích (μ l)
DNA đích đã được tinh sạch	2
BigDye Terminator v3.0	2
Môi xuôi (hoặc môi ngược) 1 μ M	3,2
BigDye seq. buffer 5X	4
Nước cất	8,8

(Thực hiện 2 ống cho một mẫu: một ống cho môi xuôi, một ống cho môi ngược)

2. Chu trình nhiệt: 5 phút đầu tiên ở 98⁰C, tiếp theo sau 15 giây ở 98⁰C, sau đó 10 giây ở 60⁰C, 2 phút ở 60⁰C trong 30 chu kỳ.

3. Sau khi phản ứng kết thúc, tiến hành tinh sạch sản phẩm bằng Wizard PCR Clean-up System (promega).

4. Tiến hành phân tích trình tự gen bằng hệ thống ABI Prism 310 (Applied Biosystems): Cho vào mỗi giếng 5 μ l DNA và 15 μ l formandedide. Đặt các giếng vào máy giải trình tự và chạy chương trình.

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Ung thư phổi	3
1.1.1. Dịch tễ học ung thư phổi.....	3
1.1.2. Bệnh nguyên, bệnh sinh ung thư phổi.....	5
1.1.3. Chẩn đoán ung thư phổi.....	18
1.1.4. Điều trị ung thư phổi.....	19
1.2. Tổng quan về SNP	20
1.2.1. Định nghĩa SNP.....	20
1.2.2. Các loại SNPs.....	22
1.2.3. Vai trò và ứng dụng của SNPs trong Y học.....	22
1.2.4. SNPs và ung thư phổi.....	23
1.3. Gen <i>TP53</i> và gen <i>MDM2</i>	25
1.3.1. Gen <i>TP53</i>	25
1.3.2. Gen <i>MDM2</i>	31
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	39
2.1. Đối tượng nghiên cứu	39
2.1.1. Nhóm bệnh.....	39
2.1.2. Nhóm chứng.....	39
2.2. Phương pháp nghiên cứu	39
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	39
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu.....	40
2.2.3. Các chỉ số nghiên cứu.....	40
2.2.4. Trang thiết bị, hóa chất.....	41
2.2.5. Quy trình nghiên cứu.....	42
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	48
2.3.1. Địa điểm nghiên cứu.....	48

2.3.2. Thời gian nghiên cứu	48
2.4. Xử lý số liệu	48
2.5. Đạo đức trong nghiên cứu của đề tài	48
2.6. Kinh phí thực hiện đề tài	49
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	51
3.1. Đặc điểm của nhóm đối tượng nghiên cứu	51
3.1.1. Đặc điểm về tuổi của nhóm nghiên cứu.....	51
3.1.2. Đặc điểm về giới của nhóm nghiên cứu.....	52
3.1.3. Tình trạng hút thuốc lá của nhóm nghiên cứu.....	53
3.1.4. Đặc điểm mô bệnh học của nhóm ung thư phổi	53
3.2. Kết quả phân tích đa hình kiểu gen <i>TP53</i>.....	54
3.2.1. Đa hình thêm 16bp tại vùng intron 3 gen <i>TP53</i>	54
3.2.2. Đa hình kiểu gen tại SNP R72P gen <i>TP53</i>	55
3.2.3. Xác định một số SNP không có vị trí cắt enzym giới hạn.....	62
3.3. Kết quả phân tích đa hình kiểu gen SNP 309T>G gen <i>MDM2</i>	68
3.3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại đoạn gen mang SNP 309T>G của gen <i>MDM2</i>	68
3.3.2. Kết quả xác định kiểu gen tại SNP 309T>G gen <i>MDM2</i> bằng phương pháp PCR-RFLP	68
3.3.3. Kết quả kiểm tra kiểu gen tại vị trí SNP 309T>G gen <i>MDM2</i> bằng phương pháp giải trình tự gen.....	69
3.3.4. Kết quả phân tích kiểu gen SNP 309T>G gen <i>MDM2</i> ở nhóm nghiên cứu.....	71
3.3.5. Các kiểu gen SNP 309T>G của gen <i>MDM2</i> và nguy cơ mắc ung thư phổi..	73
3.4. Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen <i>TP53</i> và gen <i>MDM2</i> với nguy cơ mắc ung thư phổi	74
3.4.1. Mối liên quan giữa đa hình gen <i>TP53</i> và nguy cơ mắc ung thư phổi theo một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trong ung thư phổi.....	74

3.4.2. Mối liên quan giữa đa hình gen <i>MDM2</i> SNP 309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trong ung thư phổi	76
3.4.3. Nguy cơ mắc ung thư phổi khi kết hợp đa hình gen <i>TP53</i> SNP R72P và gen <i>MDM2</i> SNP 309T>G	79
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	82
4.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu	82
4.1.1. Đặc điểm về tuổi mắc bệnh của nhóm bệnh nhân ung thư phổi	82
4.1.2. Đặc điểm về giới của nhóm nghiên cứu.....	83
4.1.3. Tiền sử hút thuốc lá.....	85
4.1.4. Kết quả mô bệnh học của nhóm bệnh nhân ung thư phổi.....	87
4.2. Đa hình gen <i>TP53</i> ở nhóm nghiên cứu	89
4.2.1. Đa hình gen thêm 16bp tại vùng intron 3 của gen <i>TP53</i>	90
4.2.2. SNP R72P của gen <i>TP53</i>	91
4.2.3. Một số SNP không có vị trí cắt enzym giới hạn của gen <i>TP53</i>	94
4.3. Đa hình gen <i>MDM2</i> ở nhóm nghiên cứu.....	98
4.4. Mối liên quan giữa đa hình gen <i>TP53</i> và gen <i>MDM2</i> với nguy cơ mắc ung thư phổi.....	103
4.4.1. Mối liên quan giữa đa hình gen <i>TP53</i> và nguy cơ mắc ung thư phổi theo một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trong ung thư phổi.....	104
4.4.2. Mối liên quan giữa đa hình gen <i>MDM2</i> SNP 309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trong ung thư phổi	108
4.4.3. Kết hợp đa hình kiểu gen SNP R72P và SNP309 <i>MDM2</i> với nguy cơ ung thư phổi.....	112
KẾT LUẬN.....	114
KIẾN NGHỊ.....	116
CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Trình tự môi cho phản ứng PCR khuếch đại các SNP.....	47
Bảng 3.1: Đặc điểm về tuổi của nhóm nghiên cứu.....	51
Bảng 3.2: Tình trạng hút thuốc lá của nhóm nghiên cứu.....	53
Bảng 3.3: Đặc điểm mô bệnh học của nhóm ung thư phổi.....	53
Bảng 3.4: Kết quả phân tích đa hình do thêm 16bp tại vùng intron 3 của gen <i>TP53</i> ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng	55
Bảng 3.5: Tỷ lệ các kiểu gen SNP R72P của gen <i>TP53</i> ở nhóm nghiên cứu .	59
Bảng 3.6: Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của SNP <i>TP53</i> -R72P giữa nhóm bệnh và chứng	59
Bảng 3.7: Các kiểu gen SNP R72P của gen <i>TP53</i> và nguy cơ mắc ung thư phổi.....	61
Bảng 3.8: Độ tuổi trung bình của bệnh nhân ung thư phổi mang các kiểu gen <i>TP53</i> SNP R72P.....	62
Bảng 3.9: Tỷ lệ kiểu gen của một số SNP không có vị trí cắt enzym giới hạn P34P (CCC → CCA), P36P (CCG → CCT), P47S (CCG → CTG)	64
Bảng 3.10: Tần số các kiểu gen tại codon 360 gen <i>TP53</i>	66
Bảng 3.11: Tỷ lệ các kiểu gen tại codon 217 gen <i>TP53</i>	67
Bảng 3.12: Tỷ lệ các kiểu gen SNP 309T>G của gen <i>MDM2</i> ở nhóm nghiên cứu...	71
Bảng 3.13: Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của SNP <i>MDM2</i> -309T>G giữa nhóm bệnh và chứng.....	71
Bảng 3.14: Độ tuổi trung bình của bệnh nhân ung thư phổi mang kiểu các kiểu gen của SNP <i>MDM2</i> -309T>G	72
Bảng 3.15: Các kiểu gen SNP 309T>G của gen <i>MDM2</i> và nguy cơ mắc ung thư phổi.....	73

Bảng 3.16: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen <i>TP53</i> SNP R72P và nguy cơ mắc ung thư phổi theo giới.....	74
Bảng 3.17: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen <i>TP53</i> SNP R72P và nguy cơ mắc ung thư phổi theo mô bệnh học.....	75
Bảng 3.18: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen <i>TP53</i> SNP R72P và nguy cơ mắc ung thư phổi theo trình trạng hút thuốc lá	76
Bảng 3.19: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen <i>MDM2</i> SNP 309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo giới	76
Bảng 3.20: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen <i>MDM2</i> SNP309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo mô bệnh học	77
Bảng 3.21: Mối liên quan giữa đa hình kiểu gen <i>MDM2</i> SNP 309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo tình trạng hút thuốc lá.....	78
Bảng 3.22: Nguy cơ mắc ung thư phổi khi kết hợp đa hình gen <i>TP53</i> SNP R72P và gen <i>MDM2</i> SNP 309T>G với hút thuốc lá.....	79
Bảng 3.23: Kết hợp đa hình kiểu gen <i>TP53</i> SNP R72P và SNP 309T>G <i>MDM2</i> với nguy cơ ung thư phổi	80
Bảng 4.1: Tỷ lệ các kiểu gen SNP 309T>G <i>MDM2</i> trên bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng trong một số nghiên cứu trên thế giới.....	100
Bảng 4.2: Kết quả phân tích kiểu gen SNP 309T>G gen <i>MDM2</i> và nguy cơ mắc ung thư phổi theo chủng tộc trong nghiên cứu của Gui....	102

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Tỷ lệ mới mắc ung thư phổi ở nam giới chuẩn hóa theo tuổi	3
Hình 1.2: Tỷ lệ mới mắc ung thư phổi ở nữ giới chuẩn hóa theo tuổi	4
Hình 1.3: Các con đường tín hiệu phân tử trong bệnh sinh ung thư phổi	9
Hình 1.4: Con đường tín hiệu phát triển ung thư phổi thông qua RTKs.....	10
Hình 1.5: Các con đường gây apoptosis của gen <i>TP53</i>	11
Hình 1.6: Các con đường hoạt hóa thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô.....	12
Hình 1.7: Dung hợp gen <i>EML4-ALK</i> do đảo đoạn trên NST 2.....	14
Hình 1.8: Cấu tạo của ALK-TK và con đường hoạt hóa thụ thể ALK-TK....	14
Hình 1.9: Hiện tượng đa hình nucleotid đơn.....	22
Hình 1.10: Cấu trúc phân tử protein p53.....	26
Hình 1.11: Cơ chế kiểm soát chu kỳ tế bào của p53 qua trung gian p21	28
Hình 1.12: Các SNPs trên các vùng mã hóa và không mã hóa của gen <i>TP53</i>	29
Hình 1.13: Cấu trúc phân tử protein MDM2.....	31
Hình 1.14: Vai trò điều hòa p53 của MDM2	32
Hình 1.15: Đa hình SNP 309 T/G.....	34
Hình 2.1. Mô tả hình ảnh điện di xác định đa hình gen do thêm 16bp tại vùng intron 3 của gen <i>TP53</i>	43
Hình 2.2: Xác định kiểu gen R72P bằng kỹ thuật PCR-RFLP	45
Hình 2.3: Xác định kiểu gen <i>SNP309</i> gen <i>MDM2</i> bằng kỹ thuật PCR-RFLP	46
Hình 3.1: Tỷ lệ bệnh nhân ung thư phổi theo nhóm tuổi.....	52
Hình 3.2: Đặc điểm về giới của nhóm nghiên cứu	52
Hình 3.3: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen vùng intron 3 gen <i>TP53</i> trên gel agarose 3%.....	54
Hình 3.4: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen chứa SNP R72P gen <i>TP53</i> trên gel agarose 1,5%.	56

Hình 3.5: Hình ảnh điện di sản phẩm cắt đoạn gen <i>TP53</i> mang SNP R72P bằng enzym BstUI trên các mẫu nghiên cứu.	57
Hình 3.6: Kết quả giải trình tự exon 4 gen <i>TP53</i> chứa SNP R72P tương ứng với các kiểu gen <i>GC (R72P R/P)</i> , <i>CC (R72P P/P)</i> , <i>GG (R72P R/R)</i>	58
Hình 3.7: Phân bố các kiểu gen của SNP <i>TP53-R72P</i> giữa nhóm bệnh và chứng.....	60
Hình 3.8: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 4 gen <i>TP53</i> mang SNP: P34P, P36P, P47S.....	62
Hình 3.9: Hình ảnh kết quả giải trình tự exon 4 gen <i>TP53</i> mang SNP: P34P, P36P, P47S tương ứng với các kiểu gen <i>C/C</i> , <i>G/G</i> , <i>C/C</i>	63
Hình 3.10: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 10 gen <i>TP53</i> chứa SNP G360A trên gel agarose 1,5%	64
Hình 3.11: Kết quả giải trình tự exon 10 xác định kiểu gen tại SNP G360A gen <i>TP53</i>	65
Hình 3.12: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 6 gen <i>TP53</i> chứa SNP V217M trên gel agarose 2%.....	66
Hình 3.13: Kết quả giải trình tự exon 6 xác định kiểu gen tại SNP V217M gen <i>TP53</i>	67
Hình 3.14: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn gen mang SNP 309T>G của gen <i>MDM2</i>	68
Hình 3.15: Hình ảnh điện di sản phẩm cắt đoạn gen <i>MDM2</i> mang SNP 309T>G bằng enzym MspA1i trên các mẫu nghiên cứu.....	69
Hình 3.16: Kết quả giải trình tự đoạn gen chứa SNP 309T>G gen <i>MDM2</i> tương ứng kiểu gen <i>T/T</i> , <i>T/G</i> , <i>G/G</i>	70
Hình 3.17: Phân bố các kiểu gen của SNP <i>MDM2-309T>G</i> giữa nhóm bệnh và chứng	72