

**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 Y HỌC
MÃ SỐ : 62720112**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2019

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS. TS. Trần Huy Thịnh
2. PGS.TS. Nguyễn Thị Hà**

Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Nghiêm Luật

Phản biện 2: PGS.TS. Phan Quốc Hoàn

Phản biện 3: TS. Trần Thị Chi Mai

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án Tiến sỹ cấp Trường họp tại Trường Đại học Y Hà Nội.

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2019

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Ung thư phổi là loại ung thư thường gặp nhất và có tỷ lệ tử vong cao nhất trong các loại ung thư hiện nay. Việt Nam là nước có tỷ lệ ung thư phổi đứng đầu trong các ung thư ở nam giới và đứng thứ 3 trong các ung thư ở nữ giới. 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.

Các gen *TP53* và *MDM2* là nhóm gen nằm trong con đường tín hiệu TP53 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 *TP53* hay *MDM2* đều có thể làm thay đổi quá trình sinh lý tế bào và dẫn đến nguy cơ phát sinh, phát triển ung thư. *TP53* và *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. 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 *MDM2* có vai trò quan trọng trong bệnh sinh một số loại ung thư, trong đó có ung thư phổi. 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.

2. Mục tiêu của đề tài

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.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

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. Tuy nhiên, vai trò quan trọng nhất của chúng trong các nghiên cứu y học là 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). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tìm hiểu tỷ lệ các kiểu gen đa hình ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm đối chứng, so sánh giữa 2 nhóm và tính toán tỷ suất chênh để xác định nguy cơ mắc ung thư phổi trên cá đối tượng này. Các kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng để xác định các kiểu gen tại các đa hình nucleotid đơn của gen *TP53* và *MDM2*. Các kiểu gen nguy cơ sẽ có thể phát triển thành các phương tiện sàng lọc sớm và tư vấn cho cộng đồng, để phòng tránh, ngăn ngừa sự hình thành và phát triển ung thư phổi. Đây được xem như một hướng tiếp cận mới đầy triển vọng, góp phần làm giảm tỷ lệ mắc ung thư phổi.

4. Cấu trúc luận án

- Luận án được trình bày trong 116 trang (không kể tài liệu tham khảo và phần phụ lục). Luận án được chia làm 7 phần:

- + Đặt vấn đề: 2 trang
- + Chương 1: Tổng quan tài liệu 36 trang
- + Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 12 trang
- + Chương 3: Kết quả nghiên cứu 31 trang
- + Chương 4: Bàn luận 32 trang
- + Kết luận: 2 trang
- + Khuyến nghị: 1 trang

Luận án gồm 26 bảng, 35 hình. Sử dụng 192 tài liệu tham khảo gồm tiếng Việt và tiếng Anh. Phần phụ lục gồm bệnh án nghiên cứu, danh sách 220 bệnh nhân ung thư phổi nguyên phát và 230 người đối chứng, các quy trình kỹ thuật.

Chương 1 TỔNG QUAN

1. Ung thư phổi

1.1. Dịch tễ học ung thư phổi

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 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. 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.

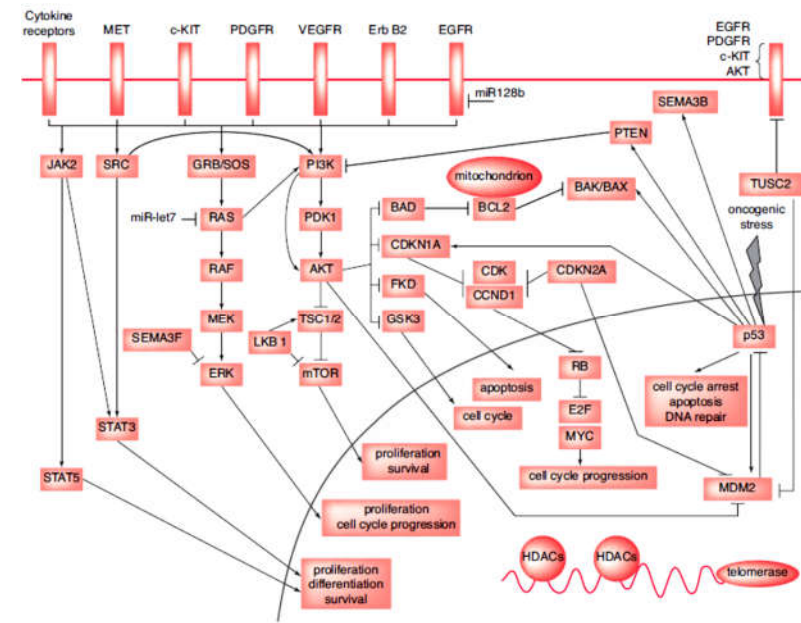
Các thống kê cho thấy, ung thư phổi phổ biến hơn ở nam giới. Tại các nước đang phát triển, tỷ lệ nam/nữ là 2,4/1 trong khi tại các nước phát triển, tỷ lệ nam/nữ là 1,8/1. Số ca mới mắc ở nữ giới đứng thứ 3 trong các loại hình ung thư (sau ung thư vú và đại trực tràng) nhưng số ca tử vong chỉ đứng sau số ca tử vong do ung thư vú.

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.

1.2. Bệnh nguyên, bệnh sinh ung thư phổi

Hút thuốc lá được coi là yếu tố nguy cơ chính gây nên ung thư phổi, khoảng 80- 85% ca 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 càng dài (nguy cơ mắc bệnh càng lớn), nguy cơ ung thư phổi ở người hút thuốc lá cao gấp 10 lần so với người không hút thuốc. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, ngay cả 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. Ngoài ra còn rất nhiều yếu tố được coi là yếu tố nguy cơ cho ung thư phổi như 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.

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 khi bị rối loạn sẽ dẫn tới sự tăng cường hay ức chế bất thường các gen chức năng.



Hình 1.1: Các con đường tín hiệu phân tử trong bệnh sinh ung thư phổi. (Theo Pass và cộng sự).

2. Gen TP53 và MDM2

2.1 Gen áp chế ung thư TP53

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 TP53 người là một phosphoprotein có trọng lượng phân tử 53 kDa bao gồm 393 acid amin với 3 vùng chức năng khác nhau.

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), TP53 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, *TP53* được xem như trạm gác của bộ gen tế bào (guardian genome). Ngoài ra, TP53 còn có khả năng hoạt hóa hoặc ức chế một số gen khác.

2.2 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.

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 TP53. Ở điều kiện bình thường, *MDM2* gắn kết vào vùng kích hoạt sao chép của *TP53*, kiểm soát sự phân bố và giáng hóa của protein TP53. Ngược lại, *TP53* hoạt hóa sẽ thúc đẩy quá trình sao chép *MDM2* do đó sự biểu hiện của *TP53* và *MDM2* trong tế bào luôn được giữ ở trạng thái cân bằng thông qua quá trình điều hòa ngược giữa *MDM2* và *TP53*. Khi xuất hiện các yếu tố kích thích (tổn thương DNA, stress tế bào, thiếu oxy, sự biểu hiện quá mức oncogene), *MDM2* sẽ được phosphoryl hóa và bộc lộ vùng hoạt hóa của *TP53*, khởi phát các chức năng của *TP53*.

3. Đa hình gen *TP53*, *MDM2* và ung thư phổi

Hiện tượng đa hình nucleotid đơn (SNP) là sự khác nhau về trình tự DNA ở trong bộ gen giữa các cá thể của một loài hay giữa các cặp nhiễm sắc thể của một người. Đây là một hiện tượng phổ biến, được coi là hậu quả của những đột biến diêm thay thế một cặp nucleotid. 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* và gen *MDM2*. Các SNPs này đã tạo ra các kiểu gen (genotype) khác nhau của *TP53* và *MDM2* 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.

Các SNP được phân tích trong nghiên cứu này có thể làm thay đổi trình tự mã hoá hoặc không nhưng chúng đều nằm ở các vùng chức năng quan trọng của *TP53*. Những vùng trên lý thuyết có thể ảnh hưởng đến khả năng kiểm soát sự hình thành khối u. Đầu tiên phải kể đến là hiện tượng đa hình thái do sự thêm 16 base pair tại vùng không mã hóa thứ 3 (intron-3) của *TP53*. Những người mang kiểu gen này thì sự biểu hiện protein TP53 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. Điều này chứng tỏ rằng SNPs có khả năng thay đổi quá trình hoàn thiện mRNA. Bên cạnh đó các SNPs trên vùng mã hóa của *TP53* 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 TP53. 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. 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 TP53 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) *TP53* 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.

Tương tự như vậy, tính đa hình thái tại bộ ba mã hóa 72 (R72P) đã tạo ra 2 kiểu gen đối với vị trí này là TP53-R72 và TP53-P72. Nghiên cứu của Boldrine và cộng sự cho thấy kiểu gen đồng hợp tử TP53-P72 có nguy cơ cao mắc ung thư phổi [48]. 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. Đối với 2 dạng SNPs còn lại, V217M nằm trên vùng bám vào DNA của TP53 (DNA binding domain), SNPs này có khả năng làm giảm hoạt động của TP53 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 TP53.

Đa hình thái nucleotid đơn của gen *MDM2* 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.

Nhiều nghiên cứu dịch tễ gen trên thế giới đã được tiến hành nhằm tìm kiếm sự liên quan giữa các đa hình nucleotid đơn của gen *TP53* và

MDM2 và ung thư phổi. các kết quả công bố vẫn còn chưa được thống nhất nhưng có một điểm chung các nghiên cứu đều ghi nhận đa hình R72P gen *TP53* và 309T>G gen *MDM2* là hai SNP liên quan nhiều nhất với ung thư phổi. Khác biệt của các nghiên cứu có thể được giải thích do sự khác biệt về cỡ mẫu hay các yếu tố về chủng tộc và môi trường sống của quần thể nghiên cứu là khác nhau.

Thực tế ung thư là kết quả của một quá trình phức tạp trong đó có sự tương tác của nhiều yếu tố như kiểu gen, đặc điểm sinh học cũng như môi trường sống. Vì vậy, khi nghiên cứu về các SNP trong ung thư phổi cần có những phân tích liên quan với các đặc điểm sinh học hay tình trạng hút thuốc lá, ô nhiễm môi trường sống để có thể đánh giá một cách toàn diện, đem lại những thông tin giá trị cho chiến lược dự phòng ung thư phổi.

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. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân

- 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.

2.1.2. 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.

2.1.3. 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.

2.1.4. Các đa hình gen được phân tích

- Gen *TP53*

+ Thêm đoạn 16 cặp base pair 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 Methionine.

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

- Gen *MDM2*: đa hình nucleotid đơn tại vị trí nucleotid 309, intron 1 vùng promoter của gen.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang có đối chứng.

2.3. Thời gian địa điểm nghiên cứu

Thời gian từ tháng 10 năm 2013 đến tháng 10 năm 2017.

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 và Protein, trường Đại Học Y Hà Nội.

2.4. Đạo đức trong nghiên cứu

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

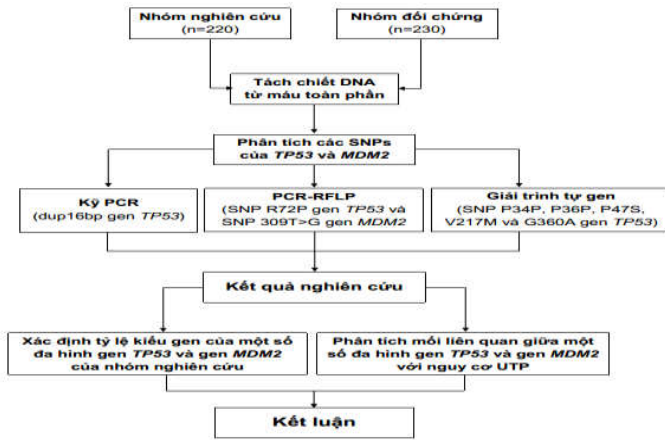
2.5. Kinh phí thực hiện đề tài

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**”.

2.6. Quy trình và các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Thu thập thông tin bệnh nhân theo bệnh án nghiên cứu. Kỹ thuật tách chiết DNA từ các mẫu máu ngoại vi. Phản ứng PCR xác định kiểu gen của đa hình Dup16 gen *TP53*. Kỹ thuật enzym cắt giới hạn (RFLP) để xác định kiểu gen tại đa hình R72P gen *TP53* và 309T>G gen *MDM2*. Kỹ thuật giải trình tự trực tiếp để xác định kiểu gen tại các đa hình P34P, P36P, P47S, V217M, G360A của gen *TP53*. Quy trình nghiên cứu theo sơ đồ.

SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



**Chương 3
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Bảng 3.1: Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Đặc điểm		Bệnh nhân ung thư phổi (220)		Nhóm chứng (230)		p
		n	%	n	%	
Tuổi (năm)	$\bar{X} \pm SD$	59,89	± 9,432	60,67	± 9,335	0,379
Giới	Nam	163	74,1	157	68,3	0,173
	Nữ	57	25,9	73	31,7	
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	
Mô bệnh học	UTBM KTBN	UTBM tuyến	161	73,2		
		UTBM vảy	13	5,9		
		UTBM loại khác	25	11,4		
	UTBMTBN	21	9,5			

Nhận xét:

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

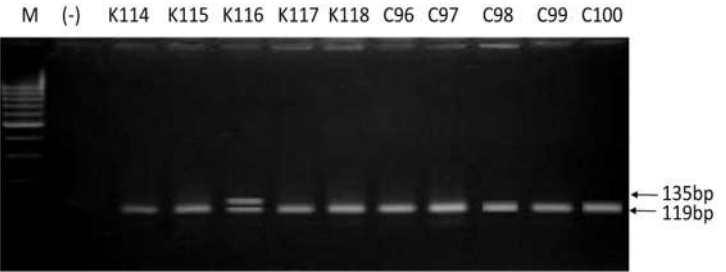
- Tỷ lệ hút thuốc lá ở nhóm bệnh là 42,7% cao hơn và có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (p=0,004). Tỷ lệ bệnh nhân ung thư phổi hút thuốc lá > 20 bao-năm là 54,3% không có sự khác biệt với tỷ lệ bệnh nhân ung thư phổi hút thuốc lá < 20 bao-năm là 45,7% (p=0,726).

- Không gặp nữ giới hút thuốc lá trong nghiên cứu.

3.2 Kết quả phân tích kiểu gen TP53

3.2.1. Thêm đoạn 16 base pairs tại intron 3 (dup16)

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 3.1. 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.

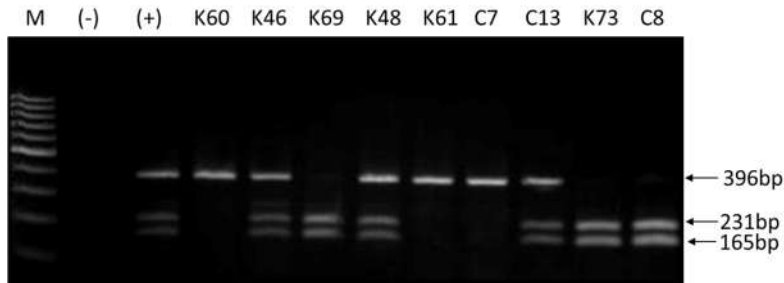
Bảng 3.2: Kết quả phân tích đa hình thái do thêm 16bp tại vùng intron 3 của gen TP53 ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng

Đa hình thái	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

Kết quả xác định kiểu gen tại SNP R72P bằng phương pháp PCR-RFLP.

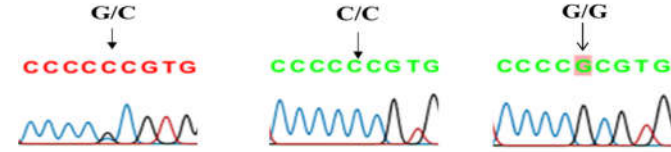


Hình 3.2: Hình ảnh điện di sản phẩm cắt đoạn gen TP53 mang SNP R72P bằng enzym BstUI trên các mẫu nghiên cứu.

M: Thang chuẩn 100bp; (-): Chứng âm; (+): Chứng dương. Mẫu K60, K61, C7: Kiểu gen CC (P/P). Mẫu K69, K73, C8: Kiểu gen GG (R/R). Mẫu K46, K48, C13: Kiểu gen GC (R/P).

Nhận xét: Sản phẩm cắt đoạn gen chứa SNP R72P gen TP53 bởi enzym BstUI gồm các đoạn DNA có kích thước khác nhau, phù hợp với tính toán lý thuyết. Kiểu gen đồng hợp GG (R/R) gồm 2 đoạn DNA có kích thước tương ứng là 165 bp và 231 bp (mẫu K69, K73, C8). Kiểu gen đồng hợp CC (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 từ GC (R/P) gồm 3 băng với các kích thước tương ứng: 396bp, 231bp và 165bp (mẫu K46, K48, C13).

Kiểm tra lại kết quả xác định kiểu gen SNP R72P bằng phương pháp giải trình tự gen.



Hình 3.3: Kết quả giải trình tự exon 4 gen TP53 chứa SNP R72P tương ứng với các kiểu gen GC (R/P), CC (P/P), GG (R/R).

Nhận xét: Kết quả giải trình tự DNA của mẫu nghiên cứu cho thấy hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích PCR-RFLP.

Bảng 3.3: Các kiểu gen SNP R72P của gen TP53 và nguy cơ mắc ung thư phổi

Đa hình thái	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 từ 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.

3.2.3. Đa hình kiểu gen tại SNP P34P, P36P, P47S, V217M, G360A

Sử dụng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp để phân tích kiểu gen tại các SNP trên của gen TP53.

Bảng 3.4: Bảng tổng hợp kiểu gen của các SNP P34P, P36P, P47S, V217M, G360A gen TP53

Kiểu gen	Kiểu gen đồng hợp nguyên thủy		Kiểu gen dị hợp		Kiểu gen đồng hợp đột biến	
	n	%	n	%	n	%
P34P(C>A)	C/C		C/A		A/A	
	450	100	0	0	0	0
P36P(G>A)	G/G		G/A		A/A	
	450	100	0	0	0	0
P47S(C>T)	C/C (P47P)*		C/T (P47S)*		T/T (S47S)*	
	450	100	0	0	0	0
V217M(G>A)	G/G (V217V)*		G/A (V217M)*		A/A (M217M)*	
	450	100	0	0	0	0
G360A(G>C)	G/G (G360G)*		G/C (G360A)*		C/C (A360A)*	
	450	100	0	0	0	0

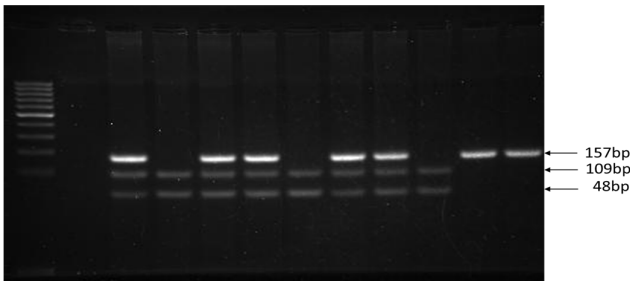
(*) Kiểu gen theo acid amin được mã hoá ở những SNP có thay đổi trình tự acid amin.

Nhận xét: Không phát hiện được kiểu gen đột biến ở nhóm nghiên cứu

3.3. Kết quả phân tích đa hình kiểu gen SNP309 gen MDM2

Kết quả xác định kiểu gen SNP309T>G gen MDM2 bằng phương pháp PCR-RFLP.

M (-) (+) K16 K7 K13 K23 C18 C21 C16 K17 C7



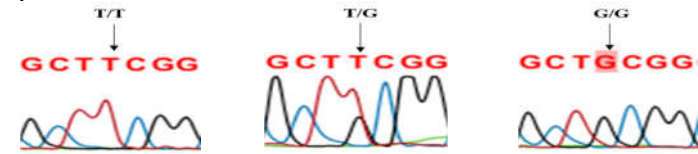
Hình 3.4: Hình ảnh điện di sản phẩm cắt đoạn gen MDM2 mang SNP309 bằng enzym MspA1i trên các mẫu nghiên cứu.

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).

Kiểm tra lại kết quả xác định kiểu gen SNP 309T>G gen MDM2 bằng phương pháp giải trình tự gen.



Hình 3.5: Kết quả giải trình tự đoạn gen chứa SNP 309 T>G gen MDM2 tương ứng kiểu gen T/T, T/G, G/G

Nhận xét: Kết quả giải trình tự DNA của mẫu nghiên cứu cho thấy hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích PCR-RFLP.

Bảng 3.5: Các kiểu gen SNP309T>G của gen MDM2 và nguy cơ mắc ung thư phổi

Đa hình thái		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	72,7	55	23,9	1,0	1,0
	TG+GG	160	27,3	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 309TG 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 Mỗi liên quan giữa đa hình kiểu gen TP53 và gen MDM2 với nguy cơ mắc ung thư phổi

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

Bảng 3.6: Mỗi liên quan giữa đa hình kiểu gen MDM2 SNP309T>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. Mỗi liên quan giữa đa hình kiểu gen MDM2 SNP309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo mô bệnh học

Bảng 3.7: Mỗi 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. Mỗi liên quan giữa đa hình kiểu gen MDM2 SNP309T>G và nguy cơ mắc ung thư phổi theo tình trạng hút thuốc lá

Bảng 3.8: Mỗi liên quan giữa đa hình kiểu gen MDM2 SNP309T>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 SNP309T>G

3.4.3.1. Nguy cơ mắc ung thư phổi khi kết hợp đa hình gen TP53 SNP R72P và gen MDM2 SNP309T>G với hút thuốc lá

Bảng 3.9: Nguy cơ mắc ung thư phổi khi kết hợp đa hình gen TP53 SNP R72P và gen MDM2 SNP309T>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 SNP309T>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).

Chương 4 BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Tuổi: BN trẻ nhất là 33 tuổi và lớn tuổi nhất là 86 tuổi, tuổi trung bình là $59,89 \pm 9,432$ tuổi. 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 nghiên cứu trong nước và quốc tế. 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 $58,9 \pm 8,6$. Yang P. và CS (2005) ghi nhận, tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là $65,4 \pm 11,0$ tuổi.

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 với tỷ lệ nam/nữ là 2,86/1. 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.

Hút thuốc lá: 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. Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận 94/220 (42,7%) trường hợp có hút thuốc và không có bệnh nhân nữ có hút thuốc lá. 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.

Mô bệnh học: Trong nghiên cứu này chúng tôi gặp 90,5% bệnh nhân UTBMKTBN. 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.

4.2. Đa hình gen TP53 ở nhóm nghiên cứu

Trong nghiên cứu này chúng tôi không tìm thấy tính đa hình gen tại các SNP P34P, SNP P36P, SNP P47S, SNP V217M, SNP G360A ở nhóm nghiên cứu. Riêng đa hình dup16 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% $CI = 0,633 - 7,184$. Từ nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng tôi tiến hành phân tích đa hình 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 phổi được tính đến tính đa hình của gen *TP53*.

SNP R72P gen *TP53*: là SNP được nghiên cứu nhiều nhất trong các nghiên cứu trên thế giới. Trong nghiên cứu này chúng tôi ghi nhận một tỷ lệ cao hơn không đáng kể kiểu gen P/P trên bệnh nhân ung thư phổi 26,4% so với 25,6% ở nhóm chứng. Các nghiên cứu về SNP R72P trong mối liên quan với ung thư phổi được đề cập nhiều trên thế giới nhưng chưa có sự thống nhất giữa các tác giả. Một số nghiên cứu công bố không có mối liên quan giữa SNP R72P với nguy cơ mắc ung thư phổi tương tự như chúng tôi. Một số nghiên cứu với cỡ mẫu lớn ghi nhận sự tăng nguy cơ mắc ung thư phổi ở những người mang kiểu gen P/P so với kiểu gen R/R và chủ yếu gặp ở người Châu Á.

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

Chúng tôi đã tiến hành xác định kiểu gen tại SNP309 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 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 SNP309 *MDM2* ở người châu Á.

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* SNP309GG 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 SNP309 *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.

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 SNP309GG 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% $CI=1,142-1,665$). 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 khiếm 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.

Đa hình gen *TP53*: nghiên cứu này không tìm được mối liên quan với nguy cơ mắc ung thư phổi theo các đặc điểm lâm sàng như tuổi mắc bệnh không có sự khác biệt giữa các kiểu gen, không khác biệt theo giới hay theo mô bệnh học. Với tình trạng hút thuốc lá, mặc dù số liệu nghiên cứu cho thấy hút thuốc lá làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi, 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. Mặc dù vậy, khi phân tích kết hợp kiểu gen đa hình codon 72 R/P gen *TP53* với tình trạng hút thuốc lá, chúng tôi nhận thấy những người có kiểu gen 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). 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 cá 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

SNP 309T>G gen *MDM2*:

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.

Khi 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 SNP309TT lại làm tăng nguy cơ ung thư phổi ở nữ giới không hút thuốc lá mà không phải là kiểu gen SNP309GG. 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. 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 TP53. *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. Ngoài ra, SNP309 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. Với các cơ chế kể trên, biến thể di truyền MD302 T309G có thể làm gia tăng sự hình thành ung thư phổi theo một cách đặc hiệu về giới. 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.

Kết quả nghiên cứu cho thấy 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).

Phân tích mối liên quan giữa SNP 309T>G gen *MDM2* với tình trạng 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 như nghiên cứu của Sun Ha Park năm 2006.

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 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 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. SNP309T>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 P/P codon 72 gen *TP53* có hút thuốc lá: nguy cơ mắc ung thư phổi cao hơn người mang kiểu gen 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* SNP309T>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 (95% CI = 1,01 – 2,76); 1,69 (95% CI = 1,05 – 2,72).
- Kiểu gen *MDM2* SNP309T>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 ĐÃ CÔNG BỐ
TRONG KHUÔN KHỔ ĐỀ TÀI**

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 TP53 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 TP53 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.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



TRAN KHANH CHI

**DETERMINATION OF *TP53* GENE AND *MDM2* GENE
POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH LUNG CANCER**

Major : Biochemistry

Code: 62720112

MEDICAL DOCTOR DISSERTATION SUMMARY

HA NOI - 2019

**THE DISSERTATION IS COMPLETED AT
HANOI MEDICAL UNIVERSITY**

Scientific guidance: 1. **Assoc.Prof.PhD. Tran Huy Think**
2. **Assoc.Prof.PhD. Nguyen Thi Ha**

Reviewer 1: Assoc.Prof.PhD. Nguyen Nghiem Luat

Reviewer 2: Assoc.Prof.PhD. Phan Quoc Hoan

Reviewer 3: PhD. Tran Thi Chi Mai

The dissertation will be presented to the Board of Ph.D
dissertation at University level at Hanoi Medical University.

At th, , 2019

The dissertation can be found at:

- National Library of Vietnam
- Library of Hanoi Medical University

BACKGROUND

1. Urgency of topics

Lung cancer (LC) is one of the most common cancers and has the highest mortality rate among the current types of cancer. Vietnam is the country with the highest LC rate among cancers in men and the third leading cause of cancer among women. Early detection of risk factors for early diagnosis, follow-up and timely intervention will play a particularly important role in preventing the onset and development of cancer while enhancing the effectiveness of medical examination and treatment.

TP53 and *MDM2* are a group of genes in the p53 signaling pathway that play an important role in maintaining the stability of the genome under the influence of harmful factors such as DNA damage, hypoxia, metabolism disorder or enhancement of the activity of carcinogenic genes. With each change occurring on *TP53* or *MDM2* can affect the cell physiological processes and lead to the risk of developing cancer. *TP53* and *MDM2* are both polymorphic, many single nucleotide polymorphisms (SNPs) of these two genes have been found to produce different genotypes in the community. However, not all SNPs are capable of promoting the onset and progression of cancer. In fact, some SNPs of the *TP53* and *MDM2* have been identified to play a role in the pathogenesis of some types of cancer, including LC. Identification of these SNPs plays an important role in assessing the risk of disease and the ability to respond to treatment individually. Recent years in Vietnam, there have been a number of studies on the role of *TP53* in LC, but no one have evaluated the polymorphism of *TP53* as well as the role SNPs of *MDM2* related to LC.

2. Objectives of the research:

1. *Determine the rate the polymorphism of TP53 and MDM2 genotype distribution in patients with lung cancer and the control group.*
2. *Evaluate the correlation between TP53, MDM2 genotype and some risk factors of lung cancer.*

3. The meaning of scientific and practical subjects:

Variations in human DNA sequence may affect how the body develops the disease and responds to pathogens, chemicals, drugs, vaccines and other agents. SNPs are thought to be potential keys in the implementation of personalized medicine. Their most important role in

medical research, however, is to compare regions of the genome among groups (possibly between patients and healthy people) in genome-wide association studies (GWAS). In this study, we investigated the rate of polymorphic genotypes in patients with LC and control group, compared two groups and calculated odds ratios to determine the risk of LC on the subjects. Molecular biology techniques were used to identify genotypes at single nucleotide polymorphisms of *TP53* and *MDM2*. Risky genotypes will be able to develop into early screening and counseling tools for the community, in order to prevent the formation and development of LC. This is considered a promising new approach, contributing to the reduction of LC incidence.

4. Thesis structure

The thesis is presented in 116 pages (excluding references and appendices). The thesis is divided into 7 parts.

- + Introduction: 2 pages
- + Chapter 1: Overview document 36 pages
- + Chapter 2: Objects and methodology 12 pages
- + Chapter 3: Research Results 31 pages
- + Chapter 4: Discussion 32 pages
- + Conclusion: 2 page
- + Propose: 1 page

The thesis consists of 26 tables, 35 figure. Using 192 references, including Vietnamese, English and some Web pages. The appendix includes medical studies, lists 220 patients with LC and 230 control and technical processes.

Chapter 1 OVERVIEW

1. Lung cancer

1.1. Epidemiology

Current epidemiological studies have documented that LC is the most common cancer and has the highest mortality rates in all types of cancer. According to global cancer statistics (Globocan 2012), there are an estimated 1.82 million newly acquired LC and about 1.59 million deaths related to LC. In the U.S.A, upturned in 2016, LC is the cancer with the highest mortality and the second highest incidence in both

sexes. By 2016, the United States had about 224,390 new LC cases and about 158,080 deaths, which accounted for 26.5% of all cancer deaths.

Statistics show that LC is more common in men. In developing countries, male / female ratio is 2.4 / 1 while in developed countries, male / female ratio is 1.8 / 1. The number of new LC cases for women is the third in the category of cancer (after breast and colorectal cancer), but the number of deaths just behind breast cancer.

According to the latest cancer records in Vietnam, after 10 years from 2000 to 2010, the incidence of LC in women increased by more than 200% (6.4 / 100,000 in 2000 to 13.9 / 100,000 in 2010), LC is also one of the five fastest growing types of cancer.

1.2. Molecular pathology of lung cancer

Smoking is considered a major risk factor for LC, approximately 80-85% of smoking cases are diagnosed with LC in the world. Risk level depends on factors such as: age of smoking (the sooner smoking is, the higher risk is), the number cigarette of years (smoking more, the risk higher), the duration of smoking (smoking longer, the risk higher). Smokers have a 10-fold increased risk of LC compare with non-smokers. Studies have also shown that even people who do not smoke directly, but often exposed to smokers (passive smoking), also have a high risk of LC. There are also many factors that are considered risk factors for LC such as air pollution, ionizing radiation, occupational exposure, virus, diet, history of bronchopulmonary disease.

Molecular studies show that the development and emergence of LC occurs over a number of stages, under the influence of risk factors, genetic susceptibility, and the accumulation of mutations that occur on oncogenes and tumor suppressor genes. Normally, the mechanisms of gene regulation that work smoothly and closely. In the presence of disorders will lead to an abnormal increase or inhibition of functional genes.

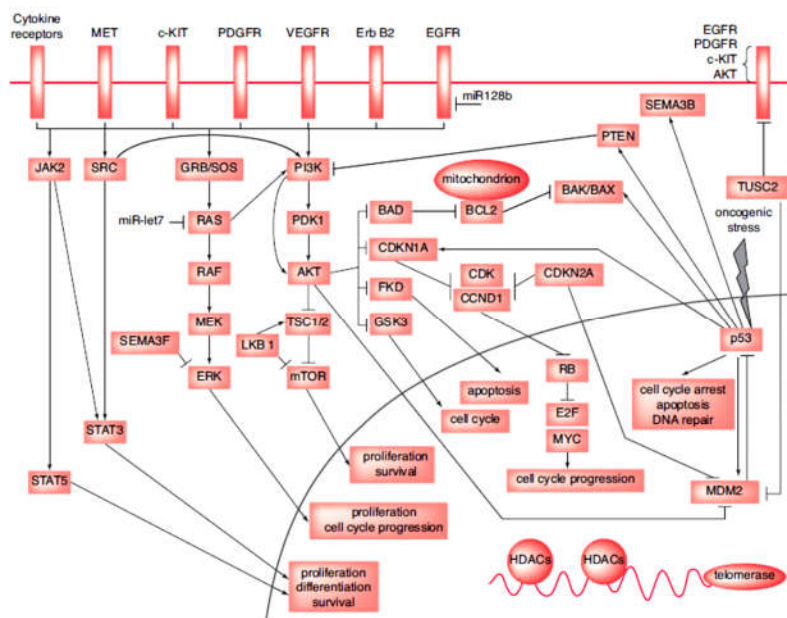


Figure 1.1: The molecular signaling pathways in lung cancer pathogenesis (Pass & et al.).

2. TP53 and MDM2 genes

2.1. TP53, cancer suppressor gene

The *TP53* gene is located on the short branch of chromosome 17 (17p13.1). The *TP53*'s length is 22,000 bp, including 11 exons (Encode area from E1 to E11, E1 does not encode) and 10 introns. It encodes for a protein molecules that weigh 53kDa with 393 acid amin and consisting of 3 functional domains.

The *TP53* gene plays an important role in DNA repair, controlling cell division, and apoptosis. The defective *TP53* gene allows abnormal cell proliferation and leads to cancer formation. When the body is affected by stimuli (damaged DNA, cellular stress, hypoxia, over expression of the oncogene), p53 is activated to stop the cell cycle until the DNA is repaired or induce apoptosis if the damaged DNA does not repair. Thus, p53 is considered as the guardian of the genome. In addition, p53 has the ability to activate or inhibit several other genes

2.2 MDM2

The *MDM2* gene (Murine double minute 2), also known as *HDM2* (Human double minute 2), consists of 12 exons and 1 intron on the long branch of the 12th chromosome, it was first identified in 1980. *MDM2* protein molecules are synthesized with 491 amino acids and consisting 5 functional structural domains.

To date, the most known important role of *MDM2* has been to regulate the activity of the *TP53* gene in the p53 signaling pathway. Under normal conditions, *MDM2* binds to the p53-activated region, which controls the distribution and degradation of the p53 protein. In contrast, activated p53 promotes *MDM2* replication so that the expression of p53 and *MDM2* in the cell is always maintained in equilibrium through the reversal of *MDM2* and p53. When stimulatory factors (damaged DNA, cellular stress, hypoxia, over expression of the oncogene) occur, *MDM2* will be phosphorylated and exposed to the p53 activation region, triggering the p53 function.

3. TP53 and MDM2 gene polymorphisms in lung cancer

Single nucleotide polymorphism (SNP) is the difference in DNA sequence in the genome between individual persons or between chromosomes of a person. This is a common phenomenon. It is the result of mutation points that replace a pair of nucleotides. According to the published studies, many SNPs were found in the *TP53* gene and dozens one on the *MDM2* gene. These single nucleotide polymorphisms create many different *TP53* and *MDM2* genotypes in the community. The genotypes of some of these SNPs are involved in the onset of development many type of cancers including LC. They are risk factors to be considered.

The SNPs we analyzed in this study may change coding sequences or not but they are all located in the key functional areas of *TP53*. Theoretically, these areas can affect to the control tumor ability of *TP53*. First of all, a polymorphism caused by the addition of 16 base pairs in the intron-3 region of *TP53*. Those who carry these genotypes express low levels of p53 in the cell and have increased risk for certain cancers including lung, breast and colorectal cancer. It proves that SNPs are capable of altering mRNA completion. In addition, although SNPs on p53 coding regions 21 (GAC → GAT), 34 (CCC → CCA) and 36 (CCG → CCT) not change the amino acid sequence but reducing the expression of p53 protein. Studies have shown that the SNPs in the

TP53 N-terminal activation region where contained an interactive position with *MDM2* and they can reduced the translation of *TP53*.

On the other hand, SNPs on the coding region altering the amino acid sequence can lead to a change in the p53 binding ability to the specific sequence in the target gene, in mRNA complement and stability of the protein as well as alter the interactions of p53 with intracellular proteins. These are SNPs located in codenamed 47 (P47S), 72 (R72P), 217 (V217M) and 360 (G360A). Under normal conditions, with the action of p38 and homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2), p53 is phosphorylated at position S46 leading to increased replication of genes involved in programmed death (apoptosis). And when the p53-P47 allele was replaced by the p53-S47 allele, the phosphorylation at site S46 reduced activity on the target genes of phagocytosis and increased the probability of cancer.

Similarly, polymorphism in the triple coding 72 (R72P) produced two genotypes: p53-R72 and p53-P72. Studies by Boldrine et al. Show that p53-P72 homozygotes have a higher risk of lung cancer [48]. At the same time, the p53-P72 genotype and *MDM2* G/G genotype are also common in patients with lung cancer who has smoked over the long term. For the other two forms of SNPs, V217M is located on the DNA binding domain of the p53, which may reduce p53 activity and directly affected genes including CDKN1A, BAX and PMAIP1. Functional studies have shown that the p53-M217 genotype have a higher expression of the p53-V217. Thus, the p53-M217 genotype is capable of protecting cells against carcinogens better than p53-V217. However, the molecular mechanism of this phenomenon is not yet clear. SNPs G360A is located at the junction of p53. These SNPs affect the expression of *BAX* and *MDM2*, which are important genes in the p53 signaling pathway.

The single nucleotide polymorphism of the *MDM2* gene is located at the first intron, rs2279744 (*MDM2* - SNP309), with the change from T to G (*MDM2* - SNP309 T>G) increased the affinity of SP1 (Stimulatory protein 1) with *MDM2*, results in increased expression of *MDM2* leading to inhibitory *TP53* gene as a condition for cancer formation and progression.

Many international epidemiological studies have been conducted to find a link between single nucleotide polymorphism of *TP53*, *MDM2* and lung cancer. The published results are still unanimous, but one thing in common is that all R72P gene polymorphism *TP53* and

309T>G *MDM2* genes are the two most commonly SNPs associated with lung cancer. The differences among studies that can be explained by the differences in sample size or racial and environmental factors of the study population.

The fact that cancer is the result of a complex process in which there are interactions of many factors such as genotype, biological characteristics as well as habitat. Therefore, when studying SNPs in lung cancer, relevant analyzes with biological characteristics or smoking status and environmental pollution should be conducted in order to assess in a comprehensive manner and recommend valuable information for lung cancer prevention strategies.

Chapter 2

SUBJECTS AND METHODS

2.1. Research Subjects

The study was conducted on 220 patients with primary lung cancer diagnosed at the Respiratory Center, the Nuclear Medicine and Oncology Center - Bach Mai Hospital and 230 controls from October 2013 to December 2017.

2.1.1. Criteria for selecting patients

- 220 patients were diagnosed with primary lung cancer at the Respiratory Center and the Nuclear Medicine and Oncology Center - Bach Mai Hospital with histopathological results.
- Agree to participate in research.

2.1.2. Exclusion criteria

- Secondary lung cancer.
- Lung cancer combine with other cancers.
- Do not agree to participate in research.

2.1.3. Control group

- 230 controls were selected from those who came to the medical examination at Bach Mai Hospital. Clinical examinations, laboratory tests, pulmonary X-rays, ultrasonography and conclusions without LC or any other cancer.
- Corresponding age and gender to lung cancer patients.

2.1.4. Genotypic polymorphisms were analyzed

- *TP53* gene
- + Add 16 pairs of base pairs at intron 3 (dup 16).

- + SNP P34P, at 34 codon, exon 4 (CCC → CCA), Prolin coding.
- + SNP P36P, at codon 36, exon 4 (CCG → CCA), Prolin coding.
- + SNP P47S, at codon 47, exon 4, (CCG or TCG), encoding Prolin or Serin.
- + SNP R72P at codon 72, exon 4, (CGC or CCC), encoding Arginine or Prolin.
- + SNP V217M, at codon 217, exon 6, (GTG or ATG), encoding Valin or Methionine.
- + SNP G360A at codon 360, exon 10, (GGG or GCG), encoding Glycin or Alanin.
- *MDM2* gene: SNP locates at nucleotide position 309, intron 1, promoter region.

2.2. Research Methodology:

Using cross-sectional descriptive study with control.

2.3. Study time and place

Time from 10/2013 to 10/2017.

Research site: the Respiratory Center, the Nuclear Medicine and Oncology Center - Bach Mai Hospital. Department of Biochemistry and Center for Gene Research - Protein, Hanoi Medical University.

2.4. Thread adhere research ethics in medicine

This study was approved by the ethics committee of Hanoi Medical University (Dicision no. 188/HĐĐĐĐHYHN, 31/1/2013).

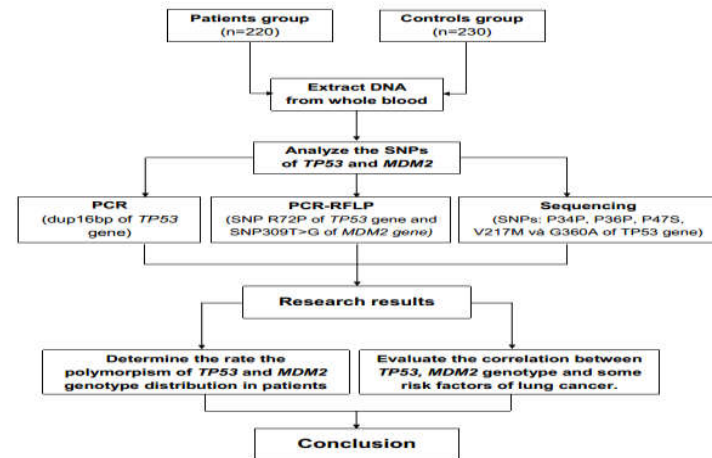
2.5. Funds for the study

Our study got the funding support of a national level project “Evaluate the genotype distribution of several genes involved in lung and liver cancer” belong to study "Evaluating Vietnamese Genetic Characteristics".

2.6. Procedures and techniques used in the study

The techniques used in the study included: Interview and turn up medical treatment documents to identify risk factors exposing. DNA extraction technique from peripheral blood samples. PCR technique detects the genotype of dup16 polymorphism of *TP53* gene. Using restriction fragment length polymorphism technique for genotyping R72P SNP of *TP53* gene and 309T>G SNP of *MDM2* gene. Sequencing technique to identify genotypes of SNPs: P34P, P36P, P47S, V217M, G360A of *TP53* gene. Research process follow as below diagram.

PROCESS DIAGRAM



Chapter 3

RESULTS

3.1. Characteristics of the study subjects

Table 3.1. Distribution of study subjects

Characteristic		Patients (220)		Controls (230)		p
		n	%	n	%	
Age (year)	$\bar{X} \pm SD$	59,89 9,432	±	60,67 9,335	±	0,379
Sex	Male	163	74,1	157	68,3	0,173
	Female	57	25,9	73	31,7	
Smoking history	Yes	94	42,7	68	29,6	0,004
	No	126	57,3	162	70,4	
	< 20 pack-year	43	45,7	33	48,5	0,726
	> 20 pack-year	51	54,3	35	51,5	
Histopa -thology	NSCLC	Adenocarcinoma	161	73,2		
		Carcinoma	13	5,9		
		Other carcinoma	25	11,4		
	SCLC	21	9,5			

Comment:

- Adenocarcinoma accounts for the highest proportion of histopathology.

- The smoking rate in the patients group was 42.7% higher and statistically significant than the control group ($p = 0.004$). The proportion of LC patients who have smoked > 20 pack-year was 54.3%, had no difference with the proportion of LC patients who have smoked < 20 pack-year (45.7% ($p = 0.726$)).

- No smoking in women was found in our study.

3.2 Results of *TP53* genotyping

3.2.1. Adding 16 base pairs at intron 3 (*dup16*)

The fragment carrying intron 3 of the *TP53* gene was amplified by PCR reaction with specific primers, PCR product was electrophoresed on 3% agarose gel.

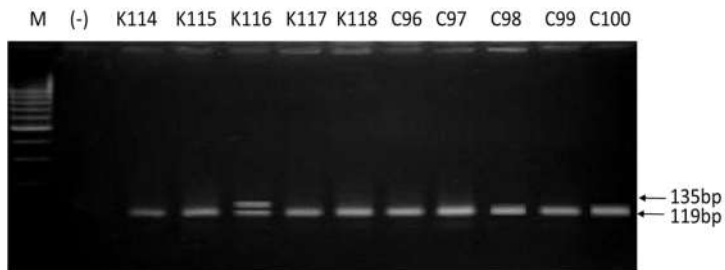


Figure 3.1. Electrophoresis of PCR product amplified the fragment carrying intron 3 of the *TP53* gene on agarose gel 3%

Samples K114, K115, K117, K118, C96÷C100: genotype A1A1; sample K116: genotype A1A2; M: Ladder 100bp, (-): Negative

Comment: A1A1 genotype had single band with 119bp size. A1A2 genotype had 2 band with 119bp and 135bp size. DNA band had clear without additional banding, ensure that 16bp polymorphic genotypes are identified at the intron 3 of the *TP53* gene.

Table 3.2 Genetic analysis results of dup16 SNP of *TP53* gene between patient and control group

SNP	Patient (n=220)		Control (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)

Comment: A1A2 genotype was 3.6% that the lung cancer group was higher than the control group (1.7%), but the difference was not statistically significant.

3.2.2. SNP R72P gen *TP53*

Results of genotyping at SNP R72P by PCR-RFLP method.

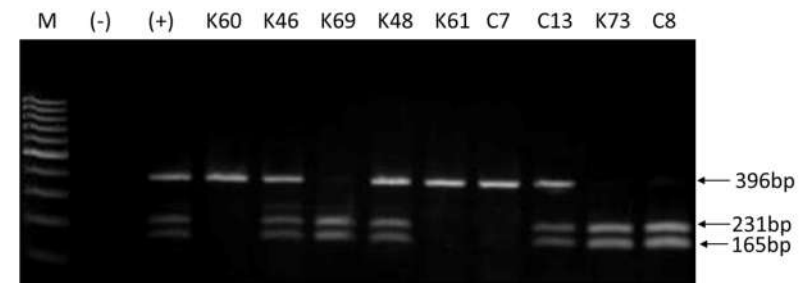


Figure 3.2: Electrophoresis of the cutting product of gene fragment contains R72P SNP by *BstUI* enzyme on research samples.

M: Ladder 100bp; (-): Negative; (+): Positive. Samples K60, K61, C7 : Genotype CC (Pro/Pro). Samples K69, K73, C8: Genotype GG (Arg/Arg). Samples K46, K48, C13: Genotype GC (Arg/Pro).

Comment:

The cutting product of gene fragment contains R72P SNP by *BstUI* enzyme including DNA fragment of different sizes, in accordance with the theoretical calculations. The GG (Arg / Arg) genotype consists of two DNA fragments of 165 bp and 231 bp (K69, K73, C8). CC (Pro / Pro) hybridization when only one DNA band of 396bp (K60, K61, C7) appears. The GC homology (Arg / Pro) consists of three bands with dimensions of 396bp, 231bp and 165bp (K46, K48, C13).

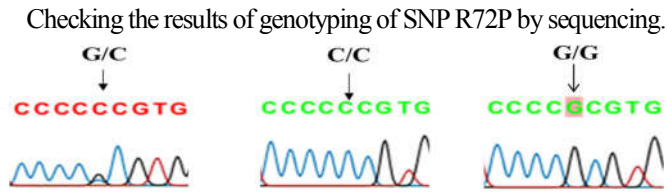


Figure 3.3: Sequencing results of exon 4 on *TP53* containing SNP R72P are corresponding to genotype: GC (Arg/Pro), CC (Pro/Pro), GG (Arg/Arg).
Comment: The DNA sequence of these sample was completely matched to its PCR-RFLP analysis.

Table 3.3: R72P SNP genotype of *TP53* gene and risk of lung cancer

SNP		Patient (n=220)		Control (n=230)		OR, 95% CI
		n	%	n	%	
Allel	G	219	49,8	248	53,9	1,0
	C	221	50,2	212	46,1	1,18 (0,91 - 1,53)
Genotype	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)
Combination of recessive genes	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)
Combination of recessive genes	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)

Comment: G/C genotype of codon 72 of *TP53* gene was the highest in both patient and control group. G/C and C/C genotype of codon 72 of *TP53* gene may be possible to increase the risk of lung cancer, but the association is not statistically significant.

3.2.3. Polymorphism in SNPs: P34P, P36P, P47S, V217M, G360A

Using the sequencing techniques to analyze genotypes at these SNPs of *TP53* gene.

Table 3.4: Genotypes of SNPs: P34P, P36P, P47S, V217M, G360A of *TP53* gene

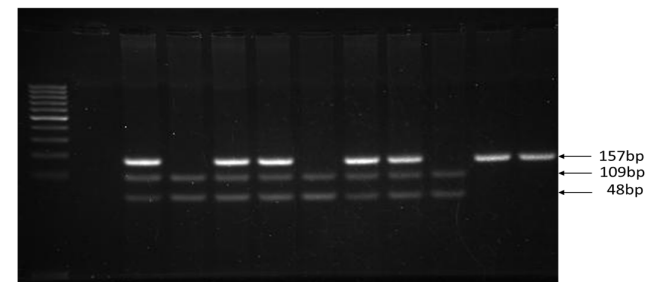
Genotype	Wild homozygous genotype		Heteropathic genotypes		Mutant homozygous genotypes	
	n	%	n	%	n	%
P34P(C>A)	C/C		C/A		A/A	
	450	100	0	0	0	0
P36P(G>A)	G/G		G/A		A/A	
	450	100	0	0	0	0
P47S(C>T)	C/C (P47P)*		C/T (P47S)*		T/T (S47S)*	
	450	100	0	0	0	0
V217M(G>A)	G/G (V217V)*		G/A (V217M)*		A/A (M217M)*	
	450	100	0	0	0	0
G360A(G>C)	G/G (G360G)*		G/C (G360A)*		C/C (A360A)*	
	450	100	0	0	0	0

(* The amino acids are encoded by that change the nucleotid sequence.
Comment: No mutation genotype was found in our study.

3.3. Results of SNP309 genotype of *MDM2* analysis

Using restriction fragment length polymorphism technique (RFLP) for genotyping 309T>G SNP of *MDM2* gene.

M (-) (+) K16 K7 K13 K23 C18 C21 C16 K17 C7



Hinh 3.4: Electrophoresis of the cutting product of gene fragment contains SNP309 of *MDM2* gene by *MspA1i* enzyme on research samples.

Samples K17, C7: Homozygous genotype T/T. Samples K16, K23, C16: Homozygous genotype G/G. Samples K7, K13, C18, C21: Heterozygous genotype T/G. M: Ladder 100bp; (-): Negative; (+): Positive.

Comment:

The cutting product of gene include DNA fragment of different sizes, in accordance with the theoretical calculations. The samples with T/T genotype consist of only one DNA band of 157 bp (K17, C7). The samples with G/G genotype consist of two DNA bands of 109 bp and 48 bp (K16, K23, C16) CC (Pro / Pro) hybridization when only one DNA band of 396bp (K60, K61, C7) appears. The samples with heterozygous TG consists of three bands with dimensions of 157bp, 109 bp và 48 bp (K7, K13, C18, C21).

Checking the results of genotyping of SNP 309T>G of *MDM2* gene by sequencing.

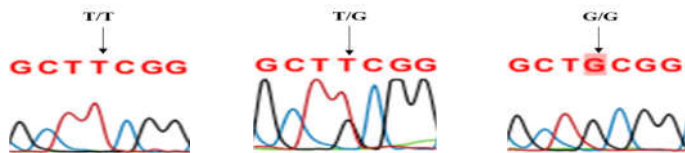


Figure 3.5: Sequencing results of gene fragment contains SNP 309T>G of *MDM2* corresponding to T/T, T/G, G/G genotypes

Comment: The DNA sequence of these sample was completely matched to its PCR-RFLP analysis.

Table 3.5: SNP309T>G genotype of *MDM2* gene and risk of lung cancer

SNP		Patient (n=220)		Control (n=230)		OR, 95%CI	OR*, 95%CI
		n	%	n	%		
Allel	T	217	49,3	241	52,4	1,0	
	G	223	50,7	219	47,6	1,13 (0,87 – 1,47)	
Genotype	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)
Combination of recessive genes	TT+TG	157	71,4	186	80,9	1,0	1,0
	GG	63	28,6	44	19,1	1,7	1,61

						(1,09 – 2,63)	(1,03 – 2,51)
Combination of recessive genes	TT	60	72,7	55	23,9	1,0	1,0
	TG + GG	160	27,3	175	76,1	0,84 (0,55 – 1,28)	0,78 (0,51 – 1,20)

*OR** is adjusted from the variables: age, gender, smoking habit by multivariate logistic regression model.

Nhận xét:

The heterozygosity of SNP 309TG was highest in both disease and control groups. The SNP 309GG homozygous genotype increased the risk of LC by 1,7-fold in the recessive gene model (OR = 1,7; 95% CI = 1,09-2,63). When corrected for the variables age, gender and smoking status in the multivariate logistic regression model still showed homozygous SNP 309GG genotype increased the risk of 1,61-fold as the model of recessive genes (OR = 1,61; 95% CI = 1,03 – 2,51).

3.4 Correlation between polymorphism of *TP53*, *MDM2* and risk of lung cancer.

3.4.2. Relationship between polymorphism SNP309T> G of *MDM2* gene and the risk of lung cancer by clinical and subclinical characteristics in lung cancer.

3.4.2.1. Relationship between polymorphism SNP309T> G of *MDM2* gene and the risk of lung cancer by gender.

Table 3.6: Relationship between polymorphism SNP309T> G of *MDM2* gene and the risk of lung cancer by gender

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

Comment: The homozygous SNP 309GG genotype increases the risk of LC in males by 1,66-fold as the model of recessive genes (OR-1,66; 95%CI=1,01-2,76).

3.4.2.2. Relationship between polymorphism SNP309T> G of MDM2 gene and the risk of lung cancer by histopathology.

Table 3.7: Relationship between polymorphism SNP309T> G of MDM2 gene and the risk of lung cancer by histopathology

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

Comment: The homozygous SNP 309GG genotype increases the risk of NSCLC by 1,71-fold (OR=1,71; 95% CI= 1,09-2,68) and Adenocarcinoma by 1,69-fold (OR=1,69; 95%CI= 1,05-2,72) as the model of recessive genes in smoking group.

3.4.2.3. Relationship between polymorphism SNP309T> G of MDM2 gene and the risk of lung cancer by smoking status

Table 3.8: Relationship between polymorphism SNP309T> G of MDM2 gene and the risk of lung cancer by smoking status

Group	OR _{GG/TT} (95%CI)	OR _{TG/TT} (95%CI)	OR _{GG/TG+TT} (95%CI)	OR _{TG+GG/TT} (95%CI)
Smoking	1,86 (0,74 – 4,68)	0,85 (0,38 – 1,90)	2,09 (1,01 – 4,31)	1,12 (0,52 – 2,40)
No smoking	0,98 (0,50 – 1,90)	0,58 (0,34 – 1,01)	1,38 (0,78 – 2,43)	0,68 (0,41 – 1,14)
Smoking <20 pack-year	1,86 (0,48 – 7,26)	0,92 (0,28 – 3,04)	1,99 (0,70 – 5,65)	1,18 (0,37 – 3,66)
Smoking >20 pack-year	1,87 (0,53 – 6,60)	0,80 (0,27 – 2,39)	2,18 (0,80 – 5,98)	1,08 (0,38 – 3,03)

Comment: The homozygous SNP 309GG genotype increases the risk of LC in smoker group by 2,09-fold as the recessive gene model (OR= 2,09; 95%CI= 1,01-4,31).

3.4.3. Risk of lung cancer in combination of R72P SNP of TP53 gene and SNP309T> G of MDM2 gene

3.4.3.1. Risk of lung cancer in combination of R72P SNP of TP53 gene and SNP309T> G of MDM2 gene with smoking

Table 3.9: Risk of lung cancer in combination of R72P SNP of TP53 gene and SNP309T> G of MDM2 gene with smoking

Characteristics	Patient		Control		OR
	n	%	n	%	
Smoking	126	57,3	162	70,4	1,00
No smoking	94	42,7	68	29,6	1,78 (1,20 - 2,62)
Smoking <20 pack-year	43	45,7	33	48,5	1,68 (1,01 – 2,79)
Smoking >20 pack-year	51	54,3	35	51,5	1,87 (1,15 – 3,06)
GG of SNP R72P of TP53 gene and no smoking	32	57,1	53	80,3	1,00
CC of SNP R72P of TP53 gene and smoking	24	42,9	13	19,7	3,06 (1,37 - 6,84)
TT of SNP309T>G of MDM2 gene and no smoking	41	55,4	40	74,1	1,00
GG of SNP309T>G of MDM2 gene and smoking	33	44,6	14	25,9	2,30 (1,07 - 4,93)

Comment:

- Smoking increased the risk of LC by 1,78-fold (OR = 1,78; 95% CI = 1,20-2,62).
- Smoking > 20 pack-year increased the risk of LC by 1,87-fold (OR = 1,87; 95% CI = 1,15-3,06) was higher than the risk of LC when smoking <20 pack-year (OR = 1.68, 95% CI= 1.01 - 2.79).

- Those with the CC genotype of R72P SNP of TP53 gene had a 3,06-fold increase in the risk of developing LC, compared to those with the GG and non-smokers (OR = 3,06, 95% CI = 1, 37-6,48).
- The GG genotype of SNP309T> G of MDM2 gene with smoking were 2,3-fold more likely to develop LC than those with TT genotype and did not smoke (OR = 1,07-4,93).

Chapter 4 DISCUSSION

4.1. Characteristics of the study subjects

Age: The youngest was 33 years old and the oldest was 86 years old, with an average age of 59.89 ± 9.432 years. The most common age group was 50-70 years old (72.7%), the majority of patients aged 45 years or older (93.6%) and young UTP patients (under 40 years) recorded only 5 cases (2.7%). This finding is consistent with the findings of several national and international studies. Ngo Quy Chau and et al. (2012) in the Respiratory Center of Bach Mai Hospital also reported a mean age of study group was 58.9 ± 8.6 years for patient with LC. Yang P. and et al. (2005) reported that the mean age of the study group was 65.4 ± 11.0 years

Gender: Results of our study has contributed reaffirmed that LC was more common in men than women, with the proportion of male / female is 2.86/1. According to study of Ngo Quy Chau and et al. (2012) at the Respiratory Center of Bach Mai Hospital, male patients accounted for 73.3%, the rate of male / female is 2.75 / 1.

Smoking: Most of the studies on lung cancer refer to the smoking factor, but this is a difficult to quantify and separate from the impact of the environment. Our study documented 94/220 (42.7%) cases of smoking and no-female-smoker. Analysis of smoking rates in both LC and control groups, our results confirmed once again that smoking increased the risk of lung cancer by 1,78-fold greater than no smoking. Not only that, the level of risk increased by the number of pack-year. The risk of patients with LC who smoked <20 pack-year, increases by 1,68-fold, while those who smoked > 20 pack-year can increase the risk by 1,87-fold.

Histopathology: In this study, we found 90.5% of patients with non small cell lung carcinoma (NSCLC). This finding is consistent with

the findings of other studies. According to Ngo Quy Chau and et al., the prevalence of patients with LC is 93.3%

4.2. Polymorphism of TP53 gene in study

In study we did not find polymorphism in the SNP P34P, SNP P36P, SNP P47S, SNP V217M , SNP G360A genotypes. For dup16 polymorphism, 8/220 lung cancer patients with A1A2 genotype added 16bp at the intron 3 of TP53 gene, accounting for 3.6% higher than the control group with a prevalence of 1.7% (4/230 cases). However, the difference was not statistically significant with OR = 2.13; 95% CI = 0.633 - 7.184. From this study, we conducted to analysis the TP53 gene polymorphism in lung cancer patients in Vietnam for the first time. Our results have contributed to the clarification of the relationship between race and type of cancer that must account for the polymorphism of TP53 gene.

R72P SNP of TP53 gene: is the most studied SNP in the world. In this study, we recorded a slightly higher rate of Pro/Pro genotype in patients with LC (26.4%) than control group (25.6%). Studies on R72P SNP in relationship with LC have been widely reported in the world but there is no agreement among authors. Some published studies have no relationship between SNP R72P and risk of LC similar to ours. Other studies with large sample sizes have been documented that people with the Pro/Pro genotype increased risk of developing LC compared to the Arg/Arg genotype, and are almost prevalent in Asian populations.

4.3. Polymorphism of MDM2 gene in study

We have identified SNP309 genotype of gene MDM2 on 220 lung cancer patients and 230 control. From our study data, we analyzed genotypic and allele frequencies and comparison between disease and control group based on the odds ratio OR with 95% CI. Our findings suggest that in both groups of patient and control groups, TG is the dominant type. Our study is similar to other studies on the incidence of Asian SNP309 genotype of MDM2 gene.

Our results indicated that the homozygous SNP 309GG genotype increases the risk of LC by 1.7-fold that of the combined genotypes of SNP 309TT and TG by recessive gene model (OR = 1.7, 95 % CI = 1.09-2.63). Similar to this study, Gui et al., (2009) analyzed aggregated data from the results of eight studies with a total of 6,603 LC patients and 6678 controls found that the MDM2 SNP309GG genotype increased the risk of LC with a recessive gene model with OR = 1.17, 95% CI = 1.02-1.34. In racial analysis, the authors found an increase in the risk of LC occurrence in Asians, as follows: type TG to TT

(OR = 1.2, 95% CI=1.05-1.37), GG to TT (OR = 1.26; 95% CI = 1.01-1.79) and dominant model (OR = 1.26; 95% CI = 1.11-1.43). However, the study found no association between the SNP309 *MDM2* genotype in Europeans and Africans in all genetic models. Thus, the role of genotype by race and habitat needs to be clarified in relationship to the risk of developing lung cancer.

A recent analysis by Wenwu He and et al. (2012) showed similar results with the risk of developing LC under the SNP309GG recessive gene model for the *MDM2*, OR = 1,144 (95% CI = 1,037-1,262) and the dominant gene model, OR = 1,379 (95% CI = 1,142-1,665) in Asian. Beside remarkable advantages in the study of Gui and Wenwu He (the large number of samples compared to our study) there are still have limitations that may affect the results of the study. Firstly, the control choice from the studies may be heterogeneous, although most are selected from healthy populations that do not completely eliminate the risk of developing lung cancer. Second, the number of Africans studied is relatively small, so it was insufficient statistical power to detect a statistically significant association. Third, Gui's results are based on unadjusted estimates, while more accurate analyses should be made if personal data are available, which would allow for adjustment by other variables including age, ethnicity, smoking status, environmental factors and lifestyle. Therefore, the selection of disease groups as well as the control group and the assessment of corrective measures based on individual characteristics will produce more accurate results. Our research has done well on this issue by choosing a strict LC group according to the anatomical pathology diagnostic criteria. The control group was selected among those who received a screening for cancer and the corresponding age for the patient group. The results of our study are also adjusted according to gender characteristics to find a more relevant relationship. However, the limitation of our study is that the number of samples is so small that it is difficult to find a statistically significant association. Furthermore, the consideration of the relationship between gene-gene and gene-environment in the analysis has not yet been addressed. Therefore, in order to have a better and more comprehensive understanding of the relationship between SNP309T> G polymorphism of *MDM2* gene and the risk of lung cancer, it is necessary to analyze the above factors in the study.

4.4. Relationship between polymorphism of *TP53* and *MDM2* gene with the risk of lung cancer

Lung cancer is the result of a complex process that involves the interaction of many factors including genotype and environment. Therefore, a genetic polymorphism or an environmental factor can only have a modest effect on the development of the disease. Therefore, the results of polymorphic studies

should be evaluated in relation to biological characteristics as well as environmental factors for a more accurate assessment of the risk of disease. In this study, we investigated the relationship between polymorphism of *TP53* and *MDM2* gene and the risk of LC in clinical and subclinical clinical characteristics of LC patients.

Plymorphism of *TP53* gene: This study did not find any association with the risk of LC by clinical characteristics such as age of disease, genotypes, gender or histopathology. With smoking status, although data show that smoking increased the risk of LC, we did not found any statistically significant association between smoking status and genotype distribution in codon 72 of *TP53* gene as well as its association with the risk of lung cancer following gene models. However, when analyzing the combination of Arg/Pro genotype in codon 72 of *TP 53* gen with smoking status, we found that those with Pro/Pro genotype and smoking had a 3,06-fold higher risk of lung cancer (OR = 3.06; 95% CI = 1.37 - 6.84). This finding suggests that susceptible genotypes, when exposed to other risk factors, may increase residual risk. Thus, knowing the genotype of each person as well as the sensitivity to lung cancer in interaction with other risk factors will help us to take better measures to prevent the occurrence of the disease.

SNP 309T>G of *MDM2* gene:

In this study, we analyzed the age-relate-disease between genotypes among patients but showed no statistically significant difference. With a sample size of 220 lung cancer patients may not be large enough to find the difference

When analyzing the relationship of SNP 309T> G of *MDM2* gene by gender and documenting that the risk of LC in men was significantly increased under the recessive gene model (OR = 1.66; 95% CI = 1 , 01-276). This results were in contrast to the study of Wenwu He & et al (2012) who reported an increased risk of developing LC in women with GG genotype (OR = 1,282; 95% CI = 1,062-1,548). However, besides study of Wenwu He, another published study by Chua & et al. (2010) showed that the SNP309TT genotype increased the risk of LC among non-smoking women (not the SNP309GG genotype). The mechanism for explaining this difference is still unclear, but it is likely related to estrogen receptors that affect the regulation of *MDM2* gene expression. The estrogen receptor has been widely discovered in lung cancer cells, suggesting that genital steroid hormones may play an important role in the pathogenesis of lung cancer. In addition, *MDM2* may play a role in the potent estrogen-boosting process in cells independent of the p53 signaling pathway. *MDM2* may increase the expression of the p65 subunit of NF-kB, a marker of apoptosis-free expression in cancer cells. In addition, SNP309 of *MDM2* promotes binding to Sp1, the

receptor activating factor of many hormones including estrogen. Hence, it may be possible to influence the hormone-dependent *MDM2* replication regulation leading to increased *MDM2* protein in the cell. With these mechanisms, the genetic variant *MDM2* T309G may increase the formation of lung cancer in a gender-specific way. However, the results should be interpreted with caution as the increased risk of lung cancer has not been found in the additive models and dominant gene model. In our study, no association with the risk of lung cancer in women could be explained by the small sample size. The majority of lung cancer patients were male could affect analytical results clearly. Gender stratification studies, therefore, may need to be strengthened to estimate the relevance of these mechanisms.

Results showed that the GG genotype increased 1,71-fold of non-small cell lung cancer (OR = 1,71; 95% CI = 1,09 to 2,68) under recessive gene model and adenocarcinoma was 1,69-fold (OR = 1,69; 95% CI = 1,05 – 2,72). The reason that we have not documented the association with other histopathologic types of LC may be due to almost histopathology of patients in our study was adenocarcinoma. Our results are similar to those reported by Sun Ha Park et al. (2006): the SNP 309GG genotype of *MDM2* increased the risk of 1,91-fold adenocarcinoma (OR = 1,91; 95% CI = 1,16-3,14)

An analysis of the association between SNP 309T>G of *MDM2* genes with smoking status showed that an increase in the incidence of LC 2,09 (95% CI = 1,01 - 4,31) in those who smoked cigarettes follow a recessive gene model. When comparing the smoking GG genotypes with non-smoking TT genotypes, the risk of developing lung cancer increased by 2,3 fold (95% CI = 1,07 – 4,93). Our findings are consistent with studies in the world that smoking is a major risk factor for LC and people with the SNP 309 GG genotype smoking increased the risk of developing LC as study of Sun Ha Park (2006).

Our study still has many limitations that may affect the results. First, the sample size is still small, so the statistical power is still low. Second, many patients who come to us are no longer smoking cigarettes for many years, so the details of smoking status can be misleading. On the other hand, research results may be disturbed by passive smoking status not assessed here. Another factor leading to limitation in our results is that the subjects in the subgroups for the analysis are as few as the tumor histopathologic types, the women with LC or we can not see any case of female smokers in the study. Ultimately, this is a research study group selection in the hospital so the subjects may not represent for the general population. Future studies need to be well designed with large sample sizes may explore additional potential roles of genetic and environmental interactions in the risk of lung cancer.

CONCLUSION

1. The genotype rate of polymorphisms of *TP53* and *MDM2* gene study group

1.1 *TP53* gene

❖ *Dup16* SNP

- The A1A2 genotype in the patient and control group was 3,6% and 1,7%, respectively, but the difference was not statistically significant.

❖ *R72P* SNP:

- The frequency of allele C in the patient and control group was 50,2% and 46,1%, respectively.
- Arg/Arg, Arg/Pro and Pro/Pro genotype in the patient and control group were 25,9%, 47,7%, 26,4% and 33,5%, 40,9%, 25,7%, respectively.
- Heterozygous Arg/Pro genotype was predominant in both patient and control group.

❖ SNPs: *P34P, P36P, P47S, V217M, G360A*

- No genotypic differences were detected at SNP: P34P (CCC → CCA) and P36P (CCG → CCT), P47S, V217M, G360A sites in both patient and control group.

1.2. *SNP309T>G* of *MDM2* gene

- The frequency of alleles G in the patient and control group was 50,7% and 47,6%, respectively.
- The frequencies of TT, TG and GG genotypes in the patient and control group were 27,3%, 44,1%, 28,6% and 23,9%, 57,0% and 19,1%, respectively.
- Heterozygous TG genotype is predominant in both disease and control groups.

2. Relationship between polymorphism of *TP53* and *MDM2* gene and risk of lung cancer

2.1. *TP53* gene

- There is no association between dup16 SNP and the risk of lung cancer
- There was no significant relationship between R72P SNP of *TP53* gene and risk of lung cancer in all genetic models.
- Pro/Pro genotype in codon 72 of *TP53* gene who smoked have a 3.06-fold higher risk of developing LC than those with the Arg/Arg genotype who did not smoke (OR = 3,06; 95% CI = 1, 37 – 6,84).

2.2. *MDM2* gene

- SNP309T> G genotype of *MDM2* gene increased the risk of LC by 1,7 fold under the recessive gen model (OR GG/TG + TT = 1,7, 95% CI = 1,09 - 2,63), increased risk of LC in men and the risk of adenocarcinoma GG/TG + TT were 1.66 (95% CI = 1,01 – 2,76); 1,69 (95% CI = 1,05 – 2,72), respectively.
- The genotype SNP309T> G of *MDM2* gene increased the risk of lung cancer in smokers 2,09 fold under the recessive gen model (OR = 2,09; 95% CI = 1,01 – 4,31).
- Smokers with GG genotype had a 2,3-fold higher risk of developing lung cancer than non-smokers with TT genotype (OR = 2,30; 95% CI = 1,07 to 4,93).

RECOMMENDATIONS

2. A larger sample size study should be undertaken to detect the relationship between polymorphism of *TP53* and *MDM2* gene with the risk of lung cancer as well as some other cancers in Vietnam.
2. Genotypes of *TP53* and *MDM2* should be studied in interaction with risk factors of lung cancer by prospective study, monitoring time-exposed subjects with disease rates for each genotype of the *TP53* and *MDM2* gene.

LIST OF PUBLIC SCIENTIFIC WORKS RELATED TO THE DISSERTATION

1. Tran Khanh Chi, Tran Van Khanh, Nguyen Duc Hinh, Nguyen Thi Ha, Le Van Hung, Ta Thanh Van, Tran Huy Thinh. Determination Pro47Ser polymorphism of *TP53* gene in lung cancer patients by sequencing. *Journal of Medical Research*. Vol. 91, issue 5, pages 1-5.
2. Tran Khanh Chi, Tran Van Khanh, Nguyen Duc Hinh, Nguyen Thi Ha, Tran Thi Oanh, Ta Thanh Van, Tran Huy Thinh (2014). Determination SNP309 of *MDM2* gene in lung cancer patients by PCR-RFLP. *Journal of Medical Research*. Vol.90, issue 5, pages 35-42.
3. Tran Khanh Chi, Tran Huy Thinh, Nguyen Thi Ha and Tran Van Khanh (2015). *MDM2* SNP309 polymorphism and lung cancer risk. *Vietnam Medical Journal*. Vol.433, issue special, pages 50-54.
4. Tran Khanh Chi, Tran Huy Thinh (2017). Determination TP53 intron 3 sixteen base pairs duplication polymorphism in lung cancer by PCR method. *Journal of Medical Research*. Vol. 107, issue 2, pages 1-6.
5. Tran Khanh Chi, Tran Huy Thinh (2017). Association of single nucleotide polymorphism p53 codon 72 and *MDM2* SNP 309 with lung cancer risk. *Journal of Medical Research*. Vol. 106, issue 1, pages 1-8.
6. Tran Khanh Chi, Le Hoan, Tran Huy Thinh (2017). Determination of TP53 gene polymorphisms in lung cancer. *Vietnam Medical Journal*. Vol 458. Issue special, pages 176-182.

