

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN MINH HIỀN

**ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ SAO CHÉP hMAM mRNA,
SURVIVIN mRNA TỪ TẾ BÀO
UNG THƯ VÚ**

Chuyên ngành: Hóa sinh

Mã số : 62720112

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2014

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

**Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Phạm Thiện Ngọc
2. PGS.TS. Trần Văn Thuấn**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ 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 2014

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội
- Thư viện Thông tin Y học Trung ương

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC
ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Nguyễn Minh Hiền**, Phạm Thiện Ngọc, Lê Thị Minh Phúc, Lê Quang Huấn (2012), Nghiên cứu phát hiện Survivin mRNA, hMAM mRNA từ các tế bào ung thư trong máu, *Tạp chí Y học Việt Nam*, tháng 8- số 2/2012, trang 5-12.
2. **Nguyễn Minh Hiền**, Phạm Thiện Ngọc, Lê Thị Minh Phúc, Lê Quang Huấn (2012), Nghiên cứu sự sao chép (Transcription) gen Survivin từ các tế bào ung thư vú lưu hành trong máu (2012), *Tạp chí Y học thực hành số 846-2012*, trang 204-208.
3. **Nguyễn Minh Hiền**, Phạm Thiện Ngọc, Lê Thị Minh Phúc, Lê Quang Huấn, Nghiên cứu phát hiện hMAM mRNA từ các tế bào ung thư vú trong máu (2013), *Tạp chí ung thư học Việt Nam*, số 1-2013, trang 443-450.

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Lý do chọn đề tài

Ung thư vú là loại ung thư hay gặp trên thế giới, đứng hàng đầu ung thư ở nữ giới. Theo cơ IARC, ung thư vú chiếm 21% tổng số các loại ung thư ở phụ nữ trên thế giới. Hàng năm trên toàn thế giới có khoảng 1,15 triệu phụ nữ mắc bệnh ung thư vú mới được chẩn đoán và 465 000 ca tử vong. Theo các nhà ung thư học, ung thư vú nếu được phát hiện sớm, điều trị kịp thời thì tỷ lệ sống trên 5 năm cao hơn một cách rõ rệt. Từ hơn hai thập niên gần đây công nghệ sinh học, đặc biệt là sinh học phân tử đã có những tiến bộ vượt bậc trên nhiều lĩnh vực chẩn đoán, điều trị và theo dõi sau điều trị ung thư vú nhờ đó mà việc phát hiện ung thư vú sớm hơn, đánh giá giai đoạn ung thư vú chính xác hơn, có nhiều phương thức điều trị chuyên biệt phù hợp cho từng bệnh nhân cải thiện kết quả sống còn và chất lượng sống cho người bệnh. Một trong những phương pháp đó là phát hiện các tế bào ung thư dựa vào sự sao chép bất thường của các mRNA đặc trưng khối u mà ở người bình thường không thấy, từ đó có thể phát hiện tế bào ung thư từ mô ung thư và tế bào ung thư di chuyển trong máu ngay từ giai đoạn rất sớm. Các nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh có rất nhiều gen liên quan đến ung thư vú, trong đó *survivin*, *hMAM*, được coi là gen có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Việc phát hiện nhiều dấu ấn ung thư có bản chất là mRNA đặc hiệu từ các TBUTM (tế bào ung thư trong máu) đã mở ra triển vọng phát hiện khối u di căn từ giai đoạn sớm vì vậy nghiên cứu: “**Đánh giá mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA từ tế bào ung thư vú**”.

2. Mục tiêu nghiên cứu:

❖ **Đánh giá mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA từ mô ung thư vú.**

❖ **Đánh giá mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA từ tế bào ung thư vú lưu hành trong máu.**

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

Một đặc tính quan trọng nhất của ung thư là xâm lấn lan rộng, tế bào thoát mạch, di chuyển và di căn do hiện tượng phân bào. TBUTM có giá trị chẩn đoán, tiên lượng, dự báo di căn xa. Biểu hiện gen thay đổi phụ thuộc vào đặc tính của khối u và có thể phân biệt TBUTM với các tế bào bình thường khỏe mạnh. Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân

tử phát hiện sao chép bất thường các gen ung thư ở mô ung thư vú đã được nghiên cứu ở Việt Nam trong những năm gần đây và đã thu được nhiều thành công. Tuy nhiên nghiên cứu về sự sao chép bất thường các gen ung thư từ tế bào ung thư trong máu còn rất mới ở Việt Nam và trên thế giới. Nghiên cứu dựa trên sự sao chép bất thường của gen *hMAM* và *survivin* ở dòng tế bào ung thư để phát hiện tế bào ung thư trong mô, trong máu bệnh nhân ung thư vú. Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình phát hiện, đường chuẩn xác định số bản sao gen *hMAM* và *survivin* từ dòng tế bào ung thư vú nuôi cấy. Bằng kỹ thuật RT-PCR nghiên cứu đã xác định được tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA, *Survivin* mRNA ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú, trong mô và máu bệnh nhân u xơ vú, đồng thời làm sáng tỏ mối liên hệ giữa sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú với các yếu tố lâm sàng, mô bệnh học liên quan đến ung thư vú. Luận án đã chứng minh được mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô ung thư cao hơn mô u xơ, mức độ sao chép các gen này trong mô ung thư khác biệt không có ý nghĩa thống kê với trong máu ung thư trên cùng lượng RNA tổng số đưa vào. Kết quả mở ra triển vọng có thể phát hiện TBUTM từ giai đoạn sớm góp phần chẩn đoán, theo dõi điều trị ung thư vú.

4. Cấu trúc luận án:

- Luận án được trình bày trong 120 trang chính (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 31 trang

+ Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 15 trang

+ Chương 3: Kết quả nghiên cứu 38 trang

+ Chương 4: Bàn luận 32 trang

+ Kết luận: 1 trang

+ Kiến nghị: 1 trang

Luận án gồm 18 bảng, 1 sơ đồ và 33 hình, sử dụng 108 tài liệu tham khảo gồm tiếng Việt, tiếng Anh và một số trang Web. Phần phụ lục gồm: danh sách 43 bệnh nhân ung thư vú, 21 bệnh nhân u xơ vú được khám và điều trị tại bệnh viện K; kết quả tách chiết RNA tổng số; kết quả bản sao nhân bản gen *hMAM*, *survivin*; kết quả xây dựng đường chuẩn xác định bản sao gen *hMAM*, *survivin* bằng kỹ thuật realtime PCR.

Chương 1:TỔNG QUAN

1.1. Ung thư vú

Ung thư vú có nguồn gốc từ ống dẫn sữa được gọi là ung thư biểu mô tuyến sữa, ung thư có nguồn gốc từ tiểu thùy được gọi là ung thư biểu mô tiểu thùy. Có nhiều dạng ung thư vú khác nhau với trạng thái khác nhau, sự ác tính khác nhau, bản chất di truyền khác nhau và tỷ lệ sống sót khác nhau phụ thuộc vào các yếu tố này.

1.1.1 Tiến triển và các giai đoạn ung thư vú

❖ *Tiến triển ung thư vú*

Giai đoạn tại chỗ:

Khối u nguyên phát xuất phát từ đơn vị tiểu thùy - ống tuyến tận cùng, tức phần chế tiết của tuyến vú. Sau đó phát triển lan sang mô lân cận, xô đẩy tổ chức tuyến vú bình thường, xu hướng vượt khỏi mô tuyến vú xâm nhiễm mô xung quanh đến các cấu trúc lân cận như da, làm co rút da, sần da cam, phù nề da, đỏ và loét da.

Giai đoạn lan tràn:

- + Theo đường bạch huyết
- + Theo đường máu: chiếm 80%

❖ *Các giai đoạn của ung thư vú*

Hệ thống xếp giai đoạn của AJCC (2004). Hiện nay, hầu hết các quốc gia áp dụng hệ thống xếp giai đoạn này.

1.1.2. Chẩn đoán ung thư vú

Hiện tại, ung thư vú được chẩn đoán xác định dựa vào:

- + Lâm sàng: sờ thấy khối u ranh giới tương đối rõ.
- + Cận lâm sàng:

Chẩn đoán hình ảnh

Chụp XQ thường, chụp vú (Mammography), Siêu âm, PET/CT và PET/MRI, ghi hình miễn dịch phóng xạ (Radioimmunoscintigraphy- RIS).

Giải phẫu bệnh học ứng dụng trong chẩn đoán ung thư vú

Có nhiều phương pháp chẩn đoán ung thư vú nhưng kết quả mô bệnh học vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán xác định ung thư vú.

Hóa sinh học và hóa mô miễn dịch trong chẩn đoán ung thư vú

Dấu ấn ung thư (tumor marker) là một nhóm các chất (enym,

hormon, receptor, protein...) được các tế bào khối u trực tiếp sản xuất hoặc do các tế bào bình thường sản xuất do tác động kích ứng của các tế bào ung thư, các chất này đi vào vòng tuần hoàn và có thể được sử dụng để chẩn đoán và theo dõi điều trị ung thư.

1.2. TBUTM

1.2.1. Đặc điểm TBUTM

TBUTM được phát hiện trong máu của bệnh nhân ung thư được coi là dấu hiệu phát tán của bệnh. Các tế bào này mang đặc tính của tế bào ung thư nguyên phát, mang một số gen đặc trưng khối u mà người bình thường không thấy biểu hiện. Khi di chuyển trong máu các tế bào này tồn tại ở dạng không biệt hoá, nhưng nó sẽ phân chia khi đến một tổ chức thích hợp dưới sự hiện diện của các tác nhân đặc thù. Theo quan niệm trước đây di căn ung thư vú xảy ra ở giai đoạn muộn khi có khối u nguyên phát rõ ràng, nhưng trong những năm gần đây các nhà khoa học đã sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử chứng minh được quá trình di căn ung thư xảy ra ở giai đoạn rất sớm ngay từ khi mới hình thành khối u gọi là TBUTM. Vì các tế bào này xuất hiện sớm nên có thể coi là dấu ấn chẩn đoán ung thư ngay từ giai đoạn rất sớm.

1.2.2. Kỹ thuật acid nucleic phát hiện TBUTM

❖ **Kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)**

❖ **Real-Time PCR:**

1.2.3. Phát hiện tế bào ung thư vú trong máu bằng nhân bản các hMAM mRNA và survivin mRNA

❖ **Survivin**

Survivin là thành viên thuộc nhóm các protein ức chế sự chết theo chương trình của tế bào (IAP) và điều hòa phân chia tế bào. *Survivin* được phát hiện vào năm 1997 từ thư viện bộ gen của người. Gen *survivin* có chiều dài 15 kb, nằm ở vị trí NST 17q25. DNA *survivin* có cấu trúc mở gồm 426 nucleotid mã hóa cho protein gồm 142 aa với TLPT vào khoảng 16,3 kDa. *Survivin* ban đầu được phát hiện chỉ trong tuyến ức trưởng thành bình thường và nhau thai, tuy nhiên các nghiên cứu tiếp theo sử dụng phương pháp hiện đại hơn đã cho thấy nhiều mô lớn thể hiện *survivin* mặc dù ở mức độ thấp hơn so với các tế bào ung thư. Mức độ thấp của *survivin* trong các mô bình thường tác động lên các cytokine cho thấy *survivin* có thể có vai trò sinh lý trong việc điều chỉnh sự phát triển và tồn tại của tế bào.

Survivin là chất ức chế quá trình apoptosis, được thể hiện rất cao ở hầu hết các bệnh ung thư và sự có mặt của nó liên quan đến tình trạng kháng với hóa trị liệu, tăng tái phát khối u và sự sống còn của bệnh nhân ngắn hơn. Các cơ chế *survivin* tác động lên tế bào ung thư chưa được hiểu rõ, tuy nhiên *survivin* có thể điều chỉnh quá trình apoptosis, chu kỳ tế bào, hay thông qua sự tương tác vật lý với chức năng hoặc protein sốc nhiệt.

❖ Human mammaglobin (hMAM)

Mammaglobin là thành viên của họ uteroglobin, lần đầu tiên được mô tả năm 1996 bởi Watson và Fleming. Cho đến nay người ta đã phát hiện 23 thành viên thuộc siêu họ ung thư uteroglobin, trong đó 9 thành viên được phát hiện ở người. Người ta quan tâm tới 2 thành viên mammaglobin là *MammaglobinB* mã hóa bởi gen *SCGB2A1* (*secretoglobinB2A1*), biểu hiện cao ở ung thư buồng trứng. *MammaglobinA* (thường gọi là *hMAM*) được mã hóa bởi một gen *SCGB2A2*, biểu hiện cao ở ung thư vú. *SCGB2A2* nằm trên nhiễm sắc thể 11q12.2 và tổng hợp nên glycoprotein gồm 93aa, có TLPT 10,5kDa. *SCGB2A2* được phát hiện lần đầu tiên ở tiền liệt tuyến của chuột và sự xuất hiện của nhóm protein này có liên quan đến hormon steroid. *SCGB2A2* là 1 đoạn gen gồm 3 exon (119bp, 188bp và 199bp) và 2 intron (603 bp and 1888 bp).

Mặc dù vai trò gây bệnh ung thư vú của *hMAM* vẫn chưa được rõ ràng nhưng có hai giả thuyết mà người ta thấy là *hMAM* có liên quan đến ung thư vú: (i) người ta đã phát hiện sự có mặt của *hMAM* trên các mẫu mô được chẩn đoán chắc chắn là ung thư vú bằng kỹ thuật Northern blot và RT-PCR, không thấy trên các mẫu mô vú lành tính. (ii) *hMAM* được biểu hiện ở nhiều dòng tế bào ung thư vú. *hMAM* chiếm tỷ lệ dương tính ở 5/10 dòng tế bào ung thư vú, 21% ở mô ung thư vú nguyên phát, 62% ở mô ung thư vú có di căn xa. Cơ chế gây ung thư của gen *hMAM* liên quan đến thay đổi tế bào biểu mô ung thư dạng biểu mô.

1.3. Nghiên cứu phát hiện tế bào ung thư vú bằng kỹ thuật sinh học phân tử ở Việt Nam

Trong những năm gần đây, sinh học phân tử đã được áp dụng để phát hiện tế bào ung thư và đã thu được thành công đáng kể. Đầu tiên

đó là những nghiên cứu của Tạ Thành Văn và cộng sự về sự sao chép của gen *HIP* (Heparansulfate Interacting protein) trong mô ung thư vú. Đến năm 2008 bằng kỹ thuật RT-PCR và PCR định lượng điện di mao quản, Nghiên cứu của Đặng thị Tuyết Minh và cộng sự về gen *HIP* và *EGFR* ở mô ung thư vú đã khẳng định mức độ sao chép mRNA của *HIP* và *EGFR* ở mô ung thư vú cao hơn ở mô u xơ và tăng theo giai đoạn tiến triển trong ung thư vú. Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện tế bào ung thư ở mô qua sự biểu hiện của gen đặc hiệu ung thư là kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao góp phần trong chẩn đoán, điều trị và tiên lượng bệnh ung thư vú. Tuy nhiên theo AJCC 7^{tế} bào ung thư ở mô không chỉ ra giai đoạn M0 và M1, giai đoạn di căn của khối u, nhưng các bệnh nhân Mx (di căn ẩn) dù không có thêm bằng chứng lâm sàng hoặc ảnh phóng xạ cho di căn vẫn được coi và đối xử điều trị như di căn ung thư. Phát hiện tế bào ung thư vú trong máu là kỹ thuật khó và thu hút được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học. Cho đến nay những kết quả nghiên cứu về tế bào ung thư trong máu ở Việt Nam vẫn còn rất mới, cần sự đầu tư về công sức và kỹ thuật để đem lại hiệu quả tích cực trong chẩn đoán và điều trị ung thư vú.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chia 2 nhóm

Nhóm bệnh: Nhóm bệnh nhân ung thư vú theo phân loại ung thư vú TNM (n = 43)

Nhóm chứng: Nhóm bệnh nhân được chẩn đoán là u xơ tuyến vú (n = 21)

Đối tượng nghiên cứu được thu thập từ khoa ngoại vú bệnh viện K.

Tiêu chuẩn lựa chọn, và loại trừ chặt chẽ

Phương pháp chọn mẫu: Chọn mẫu thuận tiện.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu và sử lý số liệu

- Mô tả cắt ngang

- Thống kê dựa vào phần mềm SPSS 16.0

2.2.2. Địa điểm, thiết bị nghiên cứu

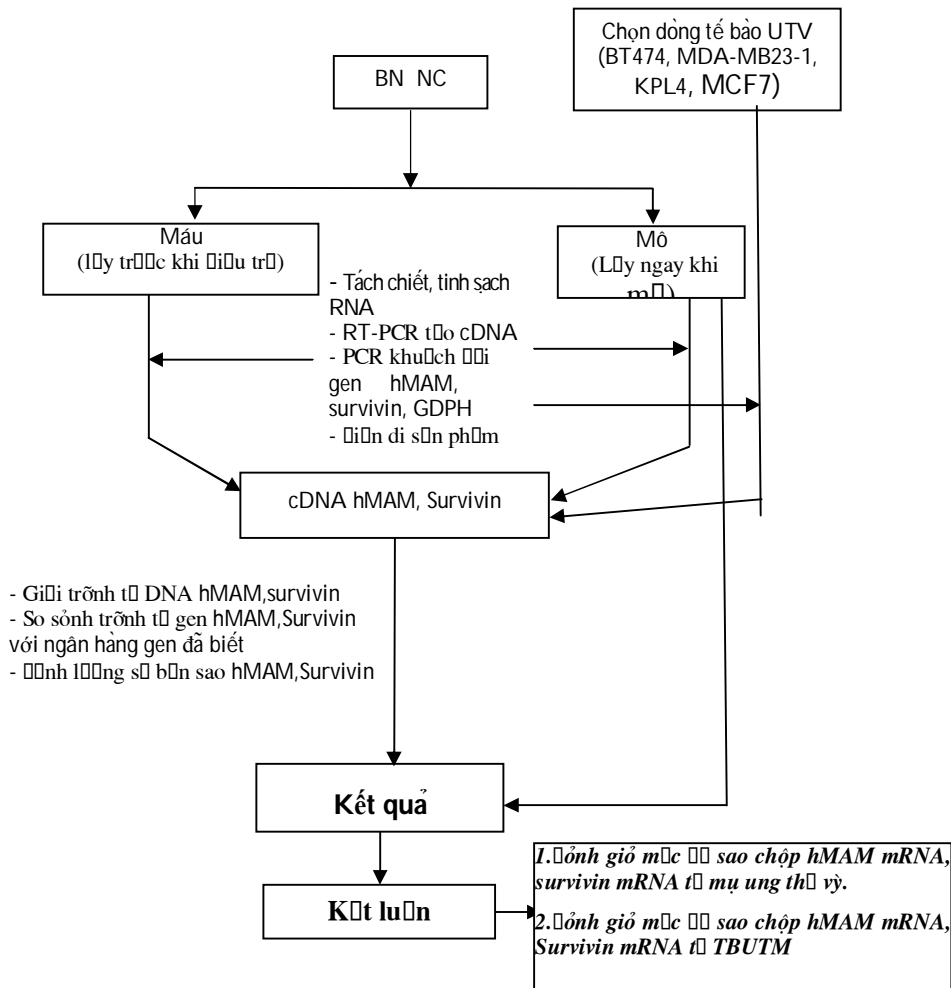
- Bệnh nhân được lựa chọn từ khoa ngoại vú bệnh viện K

- Hoá chất trang thiết bị nghiên cứu phục vụ cho phân tích gen:

Thực hiện tại phòng thí nghiệm của Phòng Công nghệ Tế bào Động vật Viện Công nghệ sinh học, bộ môn Hóa sinh trường Đại học Y Hà Nội.

- Quy trình nghiên cứu

Sơ đồ tóm tắt quy trình nghiên cứu



Xây dựng đường chuẩn Realtime PCR

Số bản sao thu được từ sản phẩm PCR được tính như sau:

$X(\text{g}/\mu\text{l DNA}) / [\text{Chiều dài đoạn RNA} \times 2 \times 340] \times 6.022 \times 10^{23} = Y$
 bản sao/ μl . Trong đó: 340 là khối lượng phân tử của một nucleotide 6.022×10^{23} là số phân tử trong 1 mol cơ chất.

Số bản sao cDNA ban đầu = Số bản sao thu được từ sản phẩm PCR/ 2^n (n là số chu kỳ PCR). Từ số bản sao này pha loãng theo tỷ lệ 10/100/1.000/10.000 ở mỗi ống phản ứng để dựng đường chuẩn.

* Lưu ý khi xây dựng đường chuẩn không nên để số bản sao ban đầu quá cao, theo khuyến cáo của Roche ngưỡng cao nhất khi xây dựng đường chuẩn nên là 10^7 để đảm bảo độ tuyến tính.

2.3. Thời gian và kinh phí đề tài

- Thời gian nghiên cứu: từ 1/2011 - 5/2013

- Kinh phí đề tài: Đề tài được hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ Y tế do PGS.TS Phạm Thiện Ngọc làm chủ nhiệm theo quyết định số 905/QĐ-BYT.

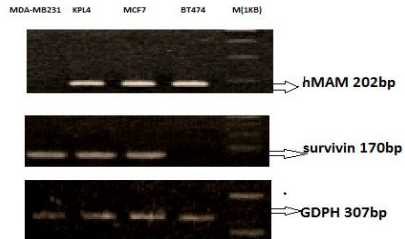
2.4. Vấn đề đạo đức của đề tài

Tuân thủ chặt chẽ vấn đề đạo đức trong nghiên cứu y sinh học.

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xây dựng quy trình phát hiện sao chép gen hMAM và survivin ở dòng tế bào ung thư vú nuôi cấy

3.1.1. Kết quả RT-PCR phát hiện hMAM mRNA và survivin mRNA ở dòng tế bào



Hình 3.1: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR DNA của hMAM, survivin, GAPDH ở dòng tế bào ung thư vú MDA-MB231, KPL4, MCF7, BT474, M: thang DNA chuẩn = 1kb

Nhận xét: kết quả điện di cho thấy nhân bản bằng mỗi hMAM dòng tế bào KPL4, MCF7, BT474 xuất hiện băng điện di rõ nét kích thước khoảng 202bp, dòng tế bào MDA-MB231 không thấy xuất hiện sản phẩm. Nhân bản bằng mỗi survivin cho kết quả dòng tế bào MDA-MB231, KPL4, MCF7 xuất hiện băng điện di kích thước khoảng 170bp, dòng tế bào BT474 không thấy xuất hiện sản phẩm. Để khẳng định đoạn gen nhân bản được, phải giải trình tự so sánh với đoạn gen được công bố tại ngân hàng gen.

3.1.2. Giải trình tự sản phẩm PCR gen hMAM, survivin đã khuếch đại

❖ Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR gen hMAM

Sản phẩm PCR với mỗi gen hMAM F/R được giải trình tự trực tiếp trên máy xác định trình tự tự động ABI 3100 Avant (Applied Biosystems)

1	EU_014192203	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	282	202	100.0	6 SE, 100
2	EU_014192213	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	282	202	100.0	6 SE, 100
3	EU_HM1123147	Homo sapiens, complete cds	303	202	100.0	6 SE, 100
4	EU_HM1812840	Homo sapiens, complete cds, frame 2, member 2, hMAM (CCB242) gene MGC 156193 (MGC 487103) mRNA, complete cds	302	202	100.0	6 SE, 100
5	EU_HM1812825	Homo sapiens, complete cds, frame 2, member 2, hMAM (CCB242) gene MGC 156193 (MGC 487103) mRNA, complete cds	302	202	100.0	6 SE, 100

Hình 3.2: Hình ảnh so sánh kết quả giải trình tự bản sao gen hMAM nhân bản được với trình tự hMAM mRNA công bố tại ngân hàng gen

Nhận xét: Kết quả giải trình tự bản sao gen hMAM, so sánh với các trình tự gen đã đăng trên Ngân hàng Gen Quốc tế có sự trùng lặp

100% với các trình tự đã đăng trên Genbank mã số: AY893203, AY888136, U33147 ...

14	EU_014192206	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	426	302	100.0	10.0, 4 SE, 24
15	EU_HM1812812	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	426	302	100.0	10.0, 4 SE, 24
16	EU_HM1812827	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	426	302	100.0	10.0, 4 SE, 24
17	EU_HM1812828	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	426	302	100.0	10.0, 4 SE, 24
18	EU_HM1812829	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	426	302	100.0	10.0, 4 SE, 24
19	EU_HM1812830	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	426	302	100.0	10.0, 4 SE, 24
20	EU_HM1812831	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	426	302	100.0	10.0, 4 SE, 24
21	EU_HM1812832	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	426	302	100.0	10.0, 4 SE, 24
22	EU_HM1812833	Survivin (contig) Homo sapiens, clone FL403355-015, LOC400309, frame 2, member 2 (CCB242) mRNA, complete cds	426	302	100.0	10.0, 4 SE, 24

Hình 3.3: Hình ảnh so sánh kết quả giải trình tự bản sao gen survivin nhân bản được với trình tự survivin công bố tại Ngân hàng Gen

Nhận xét: Kết quả giải trình tự bản sao gen survivin khi so sánh với các trình tự gen đã đăng trên Ngân hàng Gen Quốc tế có sự trùng lặp 100% với các trình tự đã đăng trên Genbank mã số: BD167854, BD185366, AY893903...

3.2. RT-PCR phát hiện sự sao chép hMAM mRNA và Survivin mRNA trong mô và trong máu bệnh nhân ung thư vú

3.2.1. Đặc điểm nhóm bệnh nhân nghiên cứu

3.2.1.1. Đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học của nhóm ung thư vú

Bảng 3.1: Đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học của nhóm ung thư vú (tổng n=43)

Đặc điểm	n	Tỷ lệ %
Tuổi		
Tuổi ≤ 50	21	48,8
Tuổi > 50	22	51,2
Giai đoạn bệnh		
I	8	18,6
II	19	44,2
III	11	25,6
IV	5	11,6
Kích thước u		
T1	10	23,3
T2	17	39,5
T3	13	30,2
T4	3	7,0

Di căn xa		
M0	38	88,4
M1	5	11,6
Di căn hạch		
N0	13	30,2
N1	17	39,6
N2	13	30,2
Thể mô bệnh học		
Thể ống tuyến xâm nhập	29	67,5
Thể tiêu thùy	8	18,6
Thể nhày	6	13,9
marker ung thư vú CA15-3 (bình thường <32 U/ml)		
Không tăng	33	76,7
Có tăng	10	23,3

Nhận xét: Những bệnh nhân ung thư vú nghiên cứu được chia 2 nhóm tuổi, trên và dưới 50. Tỷ lệ hai nhóm tuổi này sản sản như nhau 48,8% và 51,2%. Nghiên cứu đã thu thập đủ các giai đoạn bệnh. Trong số 43 bệnh nhân ung thư vú có đủ kích thước u từ T₁ đến T₄, trong đó T₁ chiếm tỷ lệ 23,3%. Có 13/43 bệnh nhân chưa phát hiện di căn hạch chiếm tỷ lệ 30,2%. Về mô bệnh học có 29/43 bệnh nhân carcinom thể ống xâm nhập chiếm tỷ lệ 67,4%. Trong số 43 bệnh nhân ung thư vú nghiên cứu có 33 bệnh nhân không có biên đổi CA15-3 chiếm tỷ lệ 76,7%.

3.2.2.2. RNA tổng số ở nhóm ung thư vú và nhóm u xơ vú

Bảng 3.2: So sánh RNA tổng số ở nhóm ung thư vú và u xơ vú

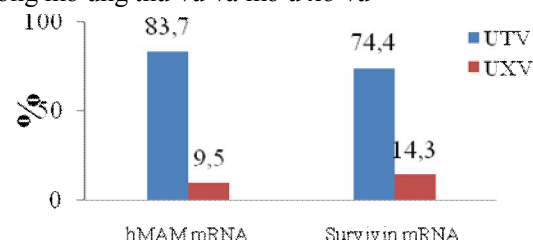
Nhóm bệnh	n	Máu (ng/μl) ($\bar{X} \pm SD$)	Mô (ng/μl) ($\bar{X} \pm SD$)
ung thư vú (1)	43	110,6±21,3	240,6±64,9
u xơ vú (2)	21	103,0±16,0	220,8±64,7
p (1) và (2)		0,056>0,05	0,85>0,05

Nhận xét: RNA tổng số trong mô cao hơn trong máu, không thấy sự khác biệt về khối lượng RNA tổng số ở mô ung thư và mô u xơ vú, máu ung thư và máu u xơ vú với p>0,05.

3.2.2. RT-PCR phát hiện sự sao chép hMAM mRNA và survivin mRNA trong mô bệnh nhân ung thư vú

Dựa vào kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại gen

hMAM và survivin, xác định tỷ lệ phát hiện hMAM mRNA, survivin mRNA trong mô ung thư vú và mô u xơ vú



Hình 3.4: Tỷ lệ phát hiện sự sao chép hMAM mRNA và survivin mRNA ở mô nghiên cứu

Nhận xét: Kết quả điện di RT-PCR khuếch đại hMAM mRNA và survivin mRNA ở mô ung thư vú: hMAM có 36/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 83,7%), survivin có 32/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 74,4%). Ở mô u xơ tỷ lệ phát hiện được hMAM là 2/21 trường hợp (chiếm tỷ lệ 9,5%), survivin có 3/21 trường hợp (chiếm tỷ lệ 14,3%).

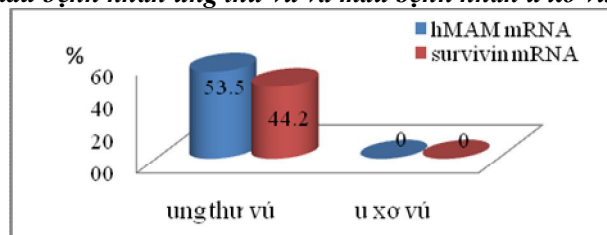
Bảng 3.3: Mối liên quan giữa tỷ lệ sao chép của hMAM mRNA, survivin mRNA trong mô ung thư với một số yếu tố sinh học

Các yếu tố liên quan bệnh ung thư vú	n	hMAM (+)	Survivin (+)
Tuổi			
≤ 50	21	16/21(76,2%)	16/21 (76,%)
>50	22	20/22(90,9%)	16/22 (72,7%)
Tổng	43	<i>p=0,19</i>	<i>p=0,7</i>
Kích thước u			
T ₁	10	9/10 (90,0%)	5/10 (50,0%)
T ₂	17	13/17 (76,5%)	13/17 (76,5%)
T ₃ và T ₄	16	14/16 (87,5%)	14/16 (87,5%)
Tổng	43	<i>P=0,5</i>	<i>p=0,1</i>
Di căn xa			
M ₀	38	31/38 (81,6%)	28/38 (73,7%)
M ₁	5	5/5 (100%)	4/5 (80,0%)
Tổng	43	<i>p=0,29</i>	<i>p=0,76</i>
Di căn hạch			
Không di căn hạch	13	10/13 (76,9%)	8/13(61,5%)
Có di căn hạch	30	26/30(86,7%)	24/30(80,0%)

Tổng	43	$p=0,4$	$p=0,2$
Giai đoạn bệnh			
I	8	7/8(87,5%)	4/8(50,0%)
II	19	15/19(78,9%)	14/19(73,7%)
III và IV	16	14/16(87,5%)	14/16(87,5%)
Tổng	43	$p=0,75$	$p=0,13$
Thể mô bệnh học			
Thể ống xâm nhập	29	27/29 (93,1%)	24/29 (82,8%)
Thể tiêu thụ	8	5/8 (62,5%)	4/8 (50,0%)
Thể nhầy	6	4/6 (66,7%)	4/6 (66,7%)
Tổng	43	$p=0,06$	$p=0,15$
Biên đổi CA 15-3			
Không tăng	33	29/33(84,4%)	26/33(87,8%)
Có tăng	10	7/10 (70,0%)	6/10(60,0%)
Tổng	43	$p=0,5$	$p=0,2$

Nhận xét: Tỷ lệ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô ung thư khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở nhóm trên và dưới 50 tuổi ($p>0,05$), ở các kích thước u, giai đoạn bệnh khác nhau, ở nhóm có di căn và chưa phát hiện thấy di căn ($p>0,05$), không khác biệt ở các thể mô bệnh học khác nhau, ở những bệnh nhân có tăng CA15-3 và nhóm không tăng ($p>0,05$)

3.2.3. Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú và máu bệnh nhân u xơ vú.



Hình 3.4: Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở máu bệnh nhân ung thư vú và u xơ vú

Nhận xét: Tỷ lệ khuếch đại được *hMAM* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú là 23/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 53,5%), *survivin* mRNA là 19/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 44,2%). Không phát hiện được bản sao *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân u xơ vú.

Bảng 3.4: Mối liên quan giữa tỷ lệ sao chép của *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong máu ung thư vú với một số yếu tố sinh học

Các yếu tố liên quan ung thư vú	n	<i>hMAM</i> (+) (%)	<i>Survivin</i> (+) (%)
Tuổi			
≤50	21	10/21(47,6%)	6/21(28,6%)
>50	22	13/22(59,1%)	13/22(59,1%)
Tổng	43	$p=0,45$	$p=0,051$
Kích thước u			
T ₁	10	3/10 (30,0%)	2/10(20,0%)
T ₂	17	7/17 (41,2%)	6/17(35,3%)
T ₃ và T ₄	16	13/16 (81,2%)	11/16(68,8%)
Tổng	43	$p= 0,02$	$p=0,03$
Di căn xa			
M ₀	38	18/38 (47,4%)	15/38(39,5%)
M ₁	5	5/5(100%)	4/5(80,0%)
Tổng	43	$p= 0,027$	$p=0,08$
Hạch			
không	13	5/13 (38,5%)	3/13(23,1%)
có	30	18/30 (60,0%)	16//30(53,3%)
Tổng	43	$p=0,19$	$p=0,06$
Giai đoạn bệnh			
I	8	2/8 (25,0%)	2/8(25,0%)
II	19	8/19 (42,1%)	6/19(31,6%)
III và IV	16	13/16 (81,2%)	11/16(68,8)
Tổng	43	$p=0,01$	$p=0,04$
Thể mô bệnh học			
Thể ống xâm nhập	29	16/29 (55,2%)	16/29(55,2%)
Thể tiêu thụ	8	3/8(37,5%)	2/8(25,0%)
Thể nhầy	6	4/6((66,7%)	1/6(16,7%)
Tổng	43	$p=0,52$	$p=0,1$
Biên đổi CA 15-3			
Không tăng	33	16/33(48,5%)	16/33(48,5%)
Có tăng	10	7/10(70,0%)	3/10(30,0%)
Tổng	43	$p=0,23$	$p=0,9$

Nhận xét: Không có sự khác biệt về tỷ lệ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú ở nhóm tuổi trên và dưới 50 ($p>0,05$), ở nhóm có di căn hạch và không có di căn hạch ($p>0,05$), không khác biệt ở nhóm biên đổi CA15-3, ở các nhóm mô bệnh học khác nhau ($p>0,05$). Tỷ lệ sao chép *hMAM*

mRNA, *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú tăng theo kích thước u, giai đoạn bệnh ($p < 0,05$).

3.3. Real-time PCR đánh giá mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong nhóm nghiên cứu.

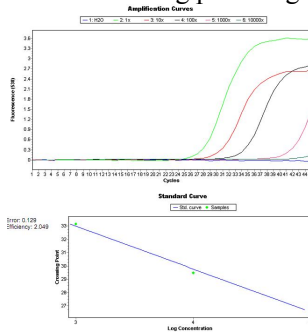
3.3.1. Xây dựng đường chuẩn xác định số bản sao từ dòng tế bào ung thư vú



Đườ

ng chuẩn và ngưỡng phát hiện *hMAM* mRNA từ tế bào ung thư vú BT474

Sử dụng 20.000 tế bào ung thư vú BT474, tách RNA, tạo cDNA, PCR nhân bản gen *hMAM*. Đo nồng độ sản phẩm PCR thu được khoảng 679 ng. Theo công thức tính số bản sao xây đường chuẩn Realtime PCR, số bản sao cDNA của *hMAM* được tạo ra từ dòng tế bào ung thư vú BT 474 khoảng 10^5 bản sao. Pha loãng theo các tỷ lệ 10/100/1.000/10.000 đưa vào các ống phản ứng.



Hình 3.5: Real-time PCR *hMAM* cDNA xác định đường chuẩn trên dòng tế bào ung thư vú BT474

A: Đường phản ứng B: Đường chuẩn

Nhận xét: Kết quả xây dựng được đường chuẩn (Standard Curve) xác định số bản sao cho các nghiên cứu phát hiện *hMAM* mRNA. Dựa vào đường chuẩn này có thể tính được số lượng bản sao của *hMAM* mRNA sau khi có kết quả chu kỳ ngưỡng.

Absolute Quantification

Settings

Channel: 530 Color Compensation: Off

Program: cycles Method: Automated (F' max) Units:

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentratio	Standard
<input type="checkbox"/>	1	H2O	Unknown			
<input type="checkbox"/>	2	1x	Standard	26.72	8.93E4	1.00E5
<input type="checkbox"/>	3	10x	Standard	29.46	1.25E4	1.00E4
<input type="checkbox"/>	4	100x	Standard	33.14	8.93E2	1.00E3
<input type="checkbox"/>	5	1000x	Standard	>40.00	<6.50E0	1.00E2
<input type="checkbox"/>	6	10000x	Standard	>40.00	<6.50E0	1.00E1

Hình 3.6: Real-time PCR *hMAM* cDNA xác định ngưỡng phát hiện trên dòng tế bào ung thư vú BT474

Nhận xét: Đường chuẩn được tạo bằng đo CP ở 5 ống phản ứng. Ống 1x là ống cDNA *hMAM* được tạo từ 20.000 tế bào BT474, tương đương 10^5 bản sao. Ở mức pha loãng 100 lần, tương đương 200 tế bào ung thư vú thì phát hiện được, với CP là 33,14 và số bản sao 893, thấp hơn ngưỡng này được coi là không phát hiện được.



Đườ

ng chuẩn và ngưỡng phát hiện *survivin* mRNA từ tế bào ung thư vú MCF7

Ngưỡng phát hiện và đường chuẩn *survivin* được thiết lập từ 20.000 tế bào MCF7

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentratio	Standard
<input type="checkbox"/>	1	H2O	Unknown			
<input type="checkbox"/>	2	10000x	Unknown			
<input type="checkbox"/>	3	1000x	Unknown	33.19	[9.51E1]	
<input type="checkbox"/>	4	100x	Standard	26.14	1.08E4	1.00E4
<input type="checkbox"/>	5	10x	Standard	23.05	8.56E4	1.00E5
<input type="checkbox"/>	6	1x	Standard	19.28	1.08E6	1.00E6

Hình 3.7: Real-time PCR *survivin* cDNA xác định ngưỡng phát hiện trên dòng tế bào ung thư vú MCF7

Nhận xét: Ở mức pha loãng 100 tương đương 200 tế bào là ngưỡng thấp nhất phát hiện sự sao chép *survivin*. Ngưỡng Cp phát hiện *survivin* cDNA nhân bản được là 26,14, tương đương $1.08E4$ bản sao.

Bảng 3.5: Mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ

Số bản sao	n	<i>hMAM</i> mRNA ($\bar{X} \pm SD$)	<i>Survivin</i> mRNA ($\bar{X} \pm SD$)
Mô ung thư	43	5.031E5±2.5888E6	8.278E4±174629
Mô u xơ	21	164 ±543	3733±11537

Nhận xét: Giá trị trung bình số bản sao gen *hMAM* và *survivin* ở mô ung thư rất cao và không phân bố theo quy luật chuẩn. Để so sánh mức độ sao chép gen *hMAM* và *survivin* ở mô ung thư vú so với mô u xơ vú, cần thực hiện trên kiểm định phi tham số.

Bảng 3.6: So sánh mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ vú

Mann-Whitney Ranks Test

Bản sao <i>hMAM</i> trong mô (ung thư – u xơ)	Bệnh	n	Mean Rank	Sum of Ranks
	Ung thư vú	43	40.94	1760.50
	U xơ vú	21	15.21	319.50
	Total	64	p<0,001	
Bản sao <i>survivin</i> trong mô (ung thư – u xơ)	Bệnh	n	Mean Rank	Sum of Ranks
	Ung thư vú	43	39.33	1691.00
	U xơ vú	21	18.52	389.00
	Total	64	P<0,001	

Nhận xét: So sánh bản sao *hMAM* trong mô

Thứ hạng trung bình của nhóm ung thư vú: 40,9, thứ hạng trung bình của nhóm u xơ vú: 15,21. Sự sao chép *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú cao hơn mô u xơ vú có ý nghĩa thống kê (p<0,001).

So sánh bản sao *survivin* trong mô

Thứ hạng trung bình của nhóm ung thư vú: 39,33, thứ hạng trung bình của nhóm u xơ vú: 18,52, sự sao chép *survivin* mRNA ở mô ung thư vú cao hơn mô u xơ vú có ý nghĩa thống kê (p<0,001).

3.3.3. So sánh mức độ sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong máu và trong mô bệnh nhân ung thư vú

Bảng 3.7: So sánh mức độ sao chép *hMAM* mRNA ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú

	Bản sao <i>survivin</i> trong mô- Bản sao <i>survivin</i> trong máu			Bản sao <i>hMAM</i> trong mô- Bản sao <i>hMAM</i> trong máu		
	n	Mean Rank	Sum of Ranks	n	Mean Rank	Sum of Ranks
Negative Ranks	13	16.77	218.00	17	21.59	367.00
Positive Ranks	19	16.32	310.00	19	15.74	299.00
Ties	11			7		
Total	43			43		
Z		-.860			-.534	
P (đuôi)		.390			.593	

Nhận xét: Để so sánh mức độ sao chép *hMAM* trong mô và máu sử dụng phép kiểm định Wilcoxon ghép cặp, kết quả thu được: Thứ hạng trung bình chênh lệch (-): 21,59, Thứ hạng trung bình chênh lệch (+): 15,74, Đơn vị lệch chuẩn Z = -0,534. Không có sự khác biệt số bản sao *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú và máu ung thư vú p=0,593.

Tương tự với *survivin* kết quả cho thấy: Thứ hạng trung bình chênh lệch (-): 16,77, thứ hạng trung bình chênh lệch (+): 16,32, đơn vị lệch chuẩn Z = -0,860. Không có sự khác biệt số bản sao *survivin* mRNA ở mô ung thư vú và máu ung thư vú p=0,390.

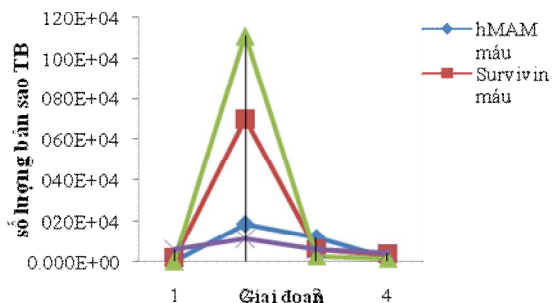
Bảng 3.8: Mối tương quan giữa mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú

	n	Hệ số tương quan (r)	Mức ý nghĩa thống kê (p)
<i>hMAM</i> mRNA	43	0,321	0,036
<i>Survivin</i> mRNA	43	0,479	0,001

Nhận xét: Sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính đơn biến trong đó bản sao ở mô ung thư là biến độc lập, bản sao ở máu bệnh nhân ung thư vú là biến phụ thuộc. Kết quả cho thấy mức ý nghĩa thống kê p<0,05, hệ số tương quan (r) giữa sự sao chép ở mô và máu của gen *hMAM* và *survivin* nằm trong khoảng (0,3-0,5) tương quan thuận ở

mức trung bình

3.3.4. Diễn tiến sự sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA theo giai đoạn bệnh



Hình 3.8: Diễn tiến sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong máu, mô theo các giai đoạn bệnh

Nhận xét: Trong 4 giai đoạn ung thư vú, giai đoạn 2 số bản sao cả *hMAM* và *Survivin* đều lớn nhất sau đó giảm dần ở giai đoạn 3 và 4. Có sự tương đồng về sự tăng sao chép ở mô và ở máu. Khi ở mô có sự tăng bản sao *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA thì cũng có sự tăng tương ứng của các bản sao trong máu.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Xây dựng quy trình phát hiện sự sao chép gen *hMAM* và *survivin* ở dòng tế bào ung thư vú nuôi cấy.

Các dòng tế bào được coi là xương sống cho những nghiên cứu về ung thư. Trên kết quả điện di hình 3.1, dòng tế bào KPL4, MCF7, BT474 khi được gắn với môi *hMAM* R/F sản phẩm PCR là băng rõ nét kích thước khoảng 202bp, dòng tế bào *MDA-MB231* không thấy sản phẩm. Sản phẩm PCR với môi *survivin* cho thấy ở vị trí dòng tế bào *MDA-MB231*, MCF7, KPL4 có băng rõ nét kích thước khoảng 170 bp, đây chính là kích thước gen *survivin* cần khuếch đại. Như vậy gen *survivin* cũng được sao chép ở 3/4 dòng tế bào ung thư vú nghiên cứu. Sản phẩm PCR thu được cho phép định hướng kết quả nhân bản được là đoạn gen *hMAM* và *survivin*, tuy nhiên để khẳng định chắc chắn cần giải trình tự sản phẩm PCR nhân bản được bằng môi *hMAM* và *survivin*. Từ

kết quả chromas giải trình tự so sánh với đoạn gen thiết kế và so sánh với trình tự đoạn gen đã công bố trong Ngân hàng Gen bằng phần mềm BLAST hay FASTA. Kết quả xác định trình tự nucleotid đã chứng minh sản phẩm PCR sau khi sử dụng cặp mồi *hMAM* F/R và *survivin* F/R chính là gen *hMAM* và *survivin* có độ tương đồng 100% so với gen *hMAM* và *survivin* đã công bố.

4.2. RT-PCR phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong mô và trong máu bệnh nhân ung thư vú.

4.2.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của nhóm ung thư vú nghiên cứu

Với số lượng mẫu nghiên cứu còn rất khiêm tốn, chưa phản ánh được tỷ lệ mắc bệnh theo tuổi nhưng nghiên cứu đã thu thập đủ số lượng mẫu cần thiết cho đề tài, có đủ các giai đoạn bệnh, các kích thước u từ nhỏ đến lớn, phù hợp với thực tế lâm sàng và với các kết quả trong nước về giai đoạn bệnh... phần nào dựng được bức tranh toàn cảnh về bệnh ung thư vú đảm bảo tính khoa học của nghiên cứu thực nghiệm.

4.2.2. RNA tổng số, tổng hợp cDNA.

So sánh nồng độ RNA thu được ở bệnh nhân ung thư vú và u xơ vú cho thấy lượng RNA tổng số ở mô (bao gồm mô ung thư và mô u xơ vú) nhiều hơn trong máu (bao gồm máu ung thư vú và máu bệnh nhân u xơ vú). Kết quả này phù hợp với thực tế ở mô là tổ chức đặc, số lượng tế bào thu được nhiều hơn trong máu. Tuy nhiên không có sự khác biệt ($p > 0,05$) về lượng RNA tổng số trong máu ung thư so với máu bệnh nhân u xơ vú, mô ung thư và mô u xơ vú. Như vậy bệnh nhân ung thư vú mặc dù có hiện tượng tăng sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA nhưng trên tổng thể các RNA không có sự khác biệt với bệnh nhân u xơ vú. Vì sự khuếch đại gen *hMAM* và *survivin* từ các nguồn không giống nhau: 30 gr mô và 250 μ l máu được tách bạch cầu, nên cần phải chuẩn hóa đầu vào sao cho giống nhau giữa mô và máu để thuận tiện cho việc so sánh kết quả. Để thực hiện được sự chuẩn hóa này, sau khi đo OD để biết khối lượng RNA tổng số trong 1 μ l sẽ hiệu chỉnh bằng cách pha loãng hoặc bổ xung thêm sao cho có khoảng 100ng RNA tổng số trong 20 μ l ống phản ứng cDNA

4.2.3. Tỷ lệ sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong mô ung thư vú và mối liên quan với các chỉ số lâm sàng, cận lâm sàng trong

bệnh ung thư vú.

Trong số 43 mẫu mô ung thư vú nghiên cứu: có 36/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 83,7%) phát hiện được sự sao chép của *hMAM* mRNA. Kết quả này cũng gần tương đương với các nghiên cứu trước, tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú theo Rocella và cộng sự là 93%, theo Raica là 78,7%. Theo Al Joudi là 90%. Với tỷ lệ phát hiện rất cao ở mô ung thư vú, *hMAM* mRNA là marker lý tưởng cho chẩn đoán bệnh ung thư vú. Tổ chức không ung thư sử dụng làm đối chứng trong nghiên cứu là mô u xơ, có 21 mẫu, có 2 mẫu (9,5%) phát hiện được bản sao *hMAM* mRNA. Như vậy *hMAM* mRNA có biểu hiện với tỷ lệ thấp ở mô u xơ vú. Kết quả cho thấy, tỷ lệ biểu hiện của *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú rất cao, những trường hợp khối u rất bé < 2cm đã phát hiện được 90% bản sao *hMAM* mRNA, ở giai đoạn I tỷ lệ phát hiện được bản sao của *hMAM* mRNA 87,5%, những trường hợp chưa có di căn hạch là 76,7%. Điều này gợi ý cho sự tăng cường sao chép *hMAM* xảy ra rất sớm ở tổ chức mô ung thư và có thể sử dụng phát hiện *hMAM* mRNA trong mô để chẩn đoán sớm ung thư vú. Kết quả nghiên cứu chỉ ra không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ biểu hiện *hMAM* mRNA với kích thước u, di căn hạch, di căn xa, giai đoạn bệnh ($p > 0,05$). Tỷ lệ phát hiện *survivin* là 32/43 trường hợp (74,4%), ở mô u xơ vú là 3 trường hợp (14,3%). Theo kết quả cho thấy tỷ lệ biểu hiện *survivin* mRNA ở giai đoạn I là 50%, giai đoạn III và IV là 87,5%, tỷ lệ biểu hiện *survivin* mRNA không khác biệt ở các giai đoạn bệnh ($p = 0,13$). Ngoài ra tỷ lệ biểu hiện của *survivin* mRNA khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở các nhóm tuổi trên và dưới 50 tuổi ($p = 0,7$), ở các nhóm có kích thước u khác nhau ($p = 0,1$). Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ phát hiện *survivin* mRNA còn được thấy ở nhóm có di căn xa và chưa phát hiện thấy di căn ($p = 0,76$), nhóm di căn hạch với nhóm chưa di căn hạch (với $p = 0,2$), sự khác biệt về phát hiện *survivin* ở các thể mô bệnh học không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,15$).

4.2.4. Tỷ lệ sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong máu ung thư vú và mối liên quan với các chỉ số lâm sàng, cận lâm sàng trong bệnh ung thư vú.

Có 23 mẫu máu trong tổng số 43 mẫu ung thư vú phát hiện có sự sao chép *hMAM* mRNA chiếm 53,5%. Trong số 21 mẫu máu của

bệnh nhân u xơ vú, không phát hiện được mẫu nào có bản sao *hMAM* mRNA. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Cheng, Shen, Rocella. So sánh với kết quả nghiên cứu của Rocella tỷ lệ biểu hiện *hMAM* mRNA ở máu ngoại vi là 12%, không thấy biểu hiện *hMAM* ở máu bệnh nhân u vú lành tính và người khỏe mạnh. Theo nghiên cứu của Cheng Y (2014), *hMAM* được phát hiện ở trong máu bệnh nhân ung thư vú là 75,4%, không phát hiện thấy ở ung thư biểu mô khác, bệnh vú lành tính, cũng như người khỏe mạnh. Tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA trong máu liên quan đến giai đoạn bệnh ($p = 0,01$). Tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA trong máu ở bệnh nhân ung thư vú có kích thước dưới 2cm là 30%. Có sự khác biệt về tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA trong máu theo kích thước u ($p = 0,02$), di căn xa ($p = 0,027$). Theo nghiên cứu của Lee tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA trong máu giai đoạn I,II là 23,4%, giai đoạn III,IV là 82,9%, tỷ lệ biểu hiện *hMAM* mRNA trong máu liên quan đến di căn hạch, di căn xa, các thụ thể nội tiết. Kết quả phát hiện *survivin* mRNA trong máu là 19 trường hợp chiếm tỷ lệ 44,2%. Không phát hiện thấy bản sao *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân u vú lành tính. Theo kết quả nghiên cứu của Yie và cộng sự, tỷ lệ phát hiện *survivin* mRNA trong máu là 50,7%, không phát hiện thấy ở người khỏe mạnh. Sau khi nghiên cứu trên 76 bệnh nhân ung thư vú Shin-Ichi và cộng sự đã đưa ra kết luận *survivin* mRNA ở giai đoạn I là 16,1%, giai đoạn II là 33,3%, giai đoạn III là 88,8%, có sự liên quan giữa tỷ lệ phát hiện *survivin* trong máu với giai đoạn bệnh ($p < 0,001$). *Survivin* mRNA trong máu còn liên quan đến kích thước u, di căn hạch. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ sao chép *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú giai đoạn I là 25%, giai đoạn II là 31,6%, giai đoạn III và IV là 68,8%, sự liên quan giữa *survivin* mRNA trong máu và các giai đoạn bệnh là có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Tóm lại, sử dụng kỹ thuật RT-PCR đã phát hiện được sự sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú ở giai đoạn sớm, tỷ lệ phát hiện liên quan đến kích thước u, giai đoạn bệnh.

4.3. Realtime PCR đánh giá mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong nhóm nghiên cứu.

4.3.1. Xây dựng đường chuẩn xác định số bản sao từ dòng tế bào ung thư vú

Để xây dựng đường chuẩn (Standard Curve) phải dựa vào dòng tế bào ung thư vú có sự tăng cường sao chép gen nghiên cứu. Theo kết quả RT-PCR, dòng tế bào BT474 phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA nên có thể sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Theo kết quả ở mức pha loãng 100 lần tương đương với 200 tế bào ung thư vú, Ct: 33,14, khoảng 893 bản copie là ngưỡng thấp nhất có thể phát hiện được sự sao chép *hMAM*. Theo Zehetner và cộng sự bằng kỹ thuật RT-PCR trộn dòng tế bào ung thư vú BT474 với 5ml máu bình thường khỏe mạnh, thì ngưỡng phát hiện là 100 TB BT474/1ml máu, ngưỡng bản sao phát hiện được >1000. Đường chuẩn phát hiện *survivin* từ dòng tế bào ung thư vú MCF7 được thiết lập với ngưỡng thấp nhất phát hiện được là 200 tế bào tương đương Ct là 26,14 và 1,08E4 bản copie. Rất nhiều nhà nghiên cứu cho rằng ngay cả khi Realtime PCR có điểm ngưỡng phân biệt các khối u và tế bào bình thường, kỹ thuật này không cung cấp một đánh giá chính xác số lượng các tế bào ung thư trong mẫu do sự thay đổi trong tỷ lệ sao chép mRNA giữa các tế bào khối u. Chính vì vậy để đánh giá mức độ sao chép gen nghiên cứu sử dụng đường chuẩn xác định số bản sao sẽ cung cấp thông tin chính xác và gần với thực tế hơn.

4.3.2. Sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ vú

Kết quả cho thấy số bản sao *hMAM* mRNA được khuếch đại ở mô ung thư vú: $5,031E5 \pm 2,5888E6$; mô u xơ vú 164 ± 543 . Tương tự số bản sao của *survivin* mRNA được khuếch đại ở mô ung thư vú $8,278E4 \pm 174629$; mô u xơ 3733 ± 11537 . Vì số bản sao không tuân theo quy luật chuẩn, để kiểm định sự khác biệt về mức độ sao chép của mô ung thư vú so với mô u xơ vú phải sử dụng kiểm định phi tham số Mann-Whitney cho kiểm định các trung vị. Kết quả cho thấy sự sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô ung thư vú cao hơn mô u xơ vú có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Năm 2004, Shi và cộng sự đã chứng minh được *hMAM* được phát hiện ở mô ung thư vú, mô vú lành tính, không phát hiện thấy ở mô lành tính khác, mức độ biểu hiện của *hMAM* ở mô ung thư vú tăng gấp 10 lần so với mô u vú lành tính, sự tăng cường sao chép này liên quan đến tăng 345 bp đầu tiên của promoter mã hóa. O'Brien cho rằng *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú cao gấp 10 đến 20 lần mô vú bình thường, hiếm khi ở các mô bình

thường khác. Mặc dù có sự sao chép ở mô u xơ nhưng mức độ sao chép rất thấp. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu trước, *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA tăng rất cao ở mô ung thư vú và dòng tế bào ung thư vú.

4.3.3. So sánh mức độ sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong máu và trong mô bệnh nhân ung thư vú

Sử dụng kiểm định Wilcoxon Signed Ranks Test cho kết quả không có sự khác biệt về số lượng bản sao *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở mô ung thư vú và máu ung thư vú với $p > 0,05$. Mỗi tương quan giữa mức độ sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở trong máu bệnh nhân ung thư vú với mô ung thư vú là mối tương quan thuận ở mức trung bình với hệ số tương quan r từ 0,3-0,5 với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Theo một vài tác giả mức độ biểu hiện của *hMAM* trong máu bệnh nhân ung thư vú cao gấp 8 lần so với bệnh nhân u vú lành tính. Cho đến nay vẫn còn nhiều ý kiến khác nhau về vai trò và mối liên quan giữa mức độ biểu hiện của gen *survivin*, *hMAM* trong mô, trong máu bệnh nhân ung thư vú.

Phân tích kết quả sao chép gen *hMAM* và *survivin* theo giai đoạn cho thấy số bản sao *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô ung thư vú tăng cao ở giai đoạn II, sau đó giảm dần ở giai đoạn III và IV. Trên biểu đồ diễn tiến của sự biến đổi mRNA trung bình của cả hai gen nghiên cứu có sự thống nhất ở một điểm: bản sao *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở trong mô tăng ở giai đoạn II thì trong máu cũng tăng ở giai đoạn II. Về sự tăng cao ở giai đoạn II vẫn còn nhiều điều cần phải nghiên cứu thêm, theo một số nghiên cứu biểu hiện của mRNA này không phải đơn thuần làm tăng trưởng tốc độ phân chia tế bào. Trên thực tế, chúng tôi thấy nhiều trường hợp sự sao chép *hMAM* và *survivin* ở máu cao hơn ở mô. Một số tác giả cho rằng sự tăng sao chép mRNA độc lập với kích thước u, giai đoạn bệnh, nhiều trường hợp tăng *hMAM* mRNA nhưng protein *hMAM* dưới ngưỡng, nhiều trường hợp protein *hMAM* rất cao nhưng *hMAM* mRNA âm tính. Trên thực tế có những trường hợp bệnh nhân được phát hiện sớm ở giai đoạn I,II, sau phẫu thuật vài tháng phát hiện di căn xa. Những trường hợp di căn sớm như vậy đã được các nhà khoa học chứng minh là do quá trình Micrometastases (vi di căn ẩn) đã bị "che khuất" trong thời điểm chẩn đoán, nếu không phát hiện được sẽ dẫn đến thất bại trong

điều trị.

KẾT LUẬN

1. Sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA từ mô ung thư vú

- Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong mô ung thư vú lần lượt là 36/43 (chiếm tỷ lệ 83,7%), 32/43 (chiếm tỷ lệ 74,4%).

- Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong mô u xơ vú lần lượt là: 2/21 (chiếm tỷ lệ 9,5%), 3/21 (chiếm tỷ lệ 14,3%).

- Mức độ sao chép *hMAM* mRNA và *Survivin* mRNA ở mô ung thư vú cao hơn mô u xơ vú ($p < 0,05$).

- Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở mô ung thư vú không liên quan đến tuổi, kích thước u, tình trạng hạch, giai đoạn bệnh, tình trạng di căn xa, các thể mô bệnh học, sự biến đổi CA15-3 ($p > 0,05$).

2. Sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA từ tế bào ung thư vú lưu hành trong máu.

- Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong máu ung thư vú lần lượt là: 23/43 (chiếm tỷ lệ 53,5%), 19/43 (chiếm tỷ lệ 44,2%).

- Không phát hiện được sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân u xơ vú.

- Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở máu liên quan đến kích thước u, giai đoạn bệnh ($p < 0,05$).

- Mức độ sao chép của *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA không có sự khác biệt giữa máu và mô ung thư vú ($p > 0,05$).

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA với cỡ mẫu lớn hơn độ nhạy, độ đặc hiệu trong chẩn đoán sớm và theo dõi điều trị, để có thể ứng dụng các gen này trong chẩn đoán, theo dõi điều trị bệnh nhân ung thư vú.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



NGUYEN MINH HIEN

EVALUATION *hMAM* mRNA, *SURVIVIN* mRNA TRANSCRIPTION FROM BREAST CANCER CELLS

Major : Biochemistry

Code : 62720112

MEDICAL DOCTOR DISSERTATION SUMMARY

Ha Noi – 2014

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

Scientific guidance: 1. Ass Prof.PhD. Pham Thien Ngoc
2. Ass Prof.PhD. Tran Van Thuan

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

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

At date month year

The dissertation can be found at:

- National Library of Vietnam
- Library of Hanoi Medical University
- Library of Vietnam Medical Information.

BACKGROUND

1. The reason for selecting topics

Breast cancer is the most common cancer in the women world. According to the IARC, breast cancer accounts for 21% of all cancers in women worldwide. Every year there are about 1.15 million women with breast cancer newly diagnosed and 465.000 deaths. According to the oncology, breast cancer if detected early, timely treatment, survival rate over the 5 years is significantly higher. Biotechnology, especially molecular biology has made significant progress in many fields diagnosis, treatment and follow-up after treatment for breast cancer so that the detection early breast cancer, staging of breast cancer more accurate, more specific treatments appropriate for each patient outcomes improve survival and quality of life for patients. One of those methods is the detection of cancer cells based on the abnormal copy of the specific mRNA in tumors but not detection normally, which can detect cancer cells from cancerous tissue and circulating tumor cells from a very early stage. Studies in the world have proven there are many genes involved in breast cancer, where *survivin*, *hMAM* is considered genetic high sensitivity and specificity. The discovery of the marker tumor is essentially specific mRNAs from the CTC (circulating tumor cell) has opened up the prospect of detecting metastatic tumor from an early stage so the study: "**Evaluation *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trancription from breast cancer cells**".

2. Objectives of the study:

- Evaluation *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA transcription from breast cancer tissue.
- Evaluation *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA transcription from CTC breast cancer.

3. Scientific and practical significance of the subject

An important characteristic of invasive cancer is spreading, cell extravasation, migration and metastasis by mitosis. The CTC has been

an important role in breast cancer. CTC valid diagnosis, prognosis, predict distant metastasis. Gene expression changes depend on the characteristics of the tumor and CTC can distinguish normal cells.

The molecular biology techniques, detect abnormal transcription of the gene in breast cancer tissues studied in Vietnam in recent years and has gained much success. However, studies abnormal transcription of the gene from the CTC is very new in Vietnam and around the world. Research based on the abnormal transcription of hMAM and survivin in cancer cells line to detect cancer cells in the tissue, the blood of breast cancer patients. Research has established processes to detect and stand curve determined the copy numbers of hMAM and survivin gene from the breast cancer cell line cultures. By RT-PCR techniques were studied to determine the detection rate of hMAM mRNA, survivin mRNA transcription in tissues and blood of breast cancer, the blood and tissue of benign breast tumors, that clarifying the relationship between hMAM mRNA, survivin mRNA in tissues and peripheral blood of breast cancer patients with clinical factors, histopathology. Our data were demonstrated hMAM mRNA, survivin mRNA level in cancer tissue is higher than fibrosis tissue.

4. Thesis structure:

- The thesis is presented in the 120 pages (not including references and appendices). The thesis is divided into 7 sections:

- + Introduction: 2 pages
- + Chapter 1: Overview 31 pages
- + Chapter 2: Objects and method 15 pages
- + Chapter 3: Research Results 38 pages
- + Chapter 4: Discussion 32 pages
- + Conclusion: 1page
- + Propose: 1 page

The thesis consists of 18 tables, 1 diagram and 33 figures, using 108 references, including Vietnamese, English and some Web pages.

The appendix includes: a list of 43 breast cancer patients, 21 patients with fibroids are diagnosed and treated in K hospital; Results of purified total RNA; Results *hMAM*, *survivin* copies; construction calibration curves *hMAM*, *survivin* copy numbers by realtime PCR technique.

Chapter 1: OVERVIEW

1.1. Breast Cancer

Breast cancer is originating from ducts are known as mammary gland carcinoma, cancer originating from lobules are known as lobular carcinomas. There are many different types of breast cancer with different status, a different malignant, genetically different nature and different survival depends on these factors.

1.1.1. The progress and stage of breast cancer

❖ Breast Cancer Progression

Primary tumors

Primary tumors originating from lobules units - bottom line pipe, that section of the mammary gland secretion. Then spread development to surrounding tissues, pushing normal breast institutions. Trends beyond the breast tissue surrounding tissue infection to neighboring structures such as skin, causing skin retraction, lumpy orange, skin edema, redness and skin ulcers.

Distant metastases

+ The lymphatic route:

+ The blood route:

❖ Breast Cancer Stages

TNM system

Below is a ranking system of the AJCC stage (2004), most of national applying this system

1.1.2. Diagnosis Breast Cancer

Currently, diagnosis of breast cancer is determined based on:

Clinical: palpable tumor boundaries are relatively clear.

Imaging Diagnostic

X ray, Mammography, Ultrasound, PET/CT and PET/MRI, recording radioimmunoassay (Radioimmunosciintigrapy- RIS).

Pathology

There are many methods for breast cancer diagnosis but histopathological results are still considered the gold standard for definitive diagnosis of breast cancer.

Biochemistry

Tumor marker is a group of substances (enzyme, hormones, receptors, proteins ...) are tumor cells directly produced by the cells or normal production due to irritation of the cancer cells, these substances circulating and can be used to diagnose and monitor cancer treatment.

1.2. CTC

1.2.1. CTC features

CTC was detected in the blood of cancer patients are considered signs disease spread. These cells are the characteristics of primary cancer cells, bearing a specific genes tumor that are not normally found expression. When moving blood cells exist in undifferentiated form, but it will split as to an appropriate organization in the presence of the particular agent. Before thinking metastatic breast cancer occurs in late stages when there is a clear primary tumor, but in recent years scientists have used molecular biology techniques to prove the di based cancer occurs at a very early stage since new tumor formation.

1.2.2. Nucleic acid techniques detection CTC

- RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)
- Real-Time PCR:

1.2.3. Detection of breast cancer cells using the cloned *survivin* mRNA and *hMAM* mRNA

❖ *Survivin*

Survivin is a member of inhibit apoptosis proteins group (IAP) and regulates cell division. *Survivin* was detected in 1997 from the genome library. *Survivin* gene has a 15 kb length, located at 17q25

chromosome. DNA *survivin* open structure consisting of 426 nucleotides encoding 142 aa protein with approximately 16.3 kDa. *Survivin* was originally detected in thymus normal adult and placenta, but subsequent studies using more modern methods has shown that large tissue although at a lower level than the cancer cells. Low *survivin* levels in normal tissue effects on cytokines showed *survivin* may have physiological role in regulating the cells growth and survival.

Survivin as apoptosis inhibitor, is highly expressed in most cancers, presence related to resistance to chemotherapy, increased tumor recurrence, and shorter survival patients. The mechanism of *survivin* development of cancer cells is not well understood, but may be adjusted *survivin* apoptosis, cell cycle, or heat shock protein.

❖ *Human mammaglobin (hMAM)*

hMAM was members of *uteroglobin* family and was first described in 1996 by Watson and Fleming. People have discovered so 23 members of the uteroglobin superfamily cancer, including 9 members detected in humans. Interested two members: *B mammaglobin* is encoded by *SCGB2A1* (secretoglobinB2A1), highly expressed in ovarian cancer. *MammaglobinA* (*hMAM*) is encoded by a gene *SCGB2A2*, highly expressed in breast cancer. *SCGB2A2* located on 11q12.2 chromosome and the synthesis of glycoproteins, including 93aa, there TLPT 10,5kDa. *SCGB2A2* first detected in prostate rat and the emergence of this group of proteins related to steroid hormones. *SCGB2A2* gene consists of 3 exons (119bp, 188bp and 199bp) and two introns (603 bp and 1888 bp).

Although the *hMAM* role in the breast cancer cause still unclear but there are two theories that people see is *hMAM* related to breast cancer: (i) it has detected the *hMAM* on the tissue samples are diagnosed with breast cancer is certainly by Northern blot technique and RT-PCR, not found in benign breast tissue samples. (ii) *hMAM* is expressed in many breast cancer cell lines. *hMAM* positive proportion in 5/10 breast cancer cell lines, 21% in primary breast cancer tissue, 62% in breast

cancer tissue metastases. Also *hMAM* be considered related to breast cancer because of its close relationship to breast biology and uteroglobin, a role in regulating progesterone. The mechanism of cancer causing genes *hMAM* unknown, but we see it related to changes mammary epithelial cells, stimulate growth, increase the rate of cell division, it is specific for the epithelial cancer tissue.

1.3. The study found breast cancer cells using molecular biology techniques in Vietnam

In recent years, molecular biology has been used to detect cancer cells and have gained significant success. That is the first study of Ta Thanh Van et al, research about the copy of the HIP gene in breast cancer tissue. To 2008 by RT-PCR and quantify capillary electrophoresis PCR, Dang Thi Tuyet Minh et al HIP and EGFR gene in breast cancer tissue confirmed the level of mRNA copy of the HIP and EGFR in breast cancer tissue was higher in the fibroid tissue and increases with advanced stages of breast cancer. Application of molecular biology techniques to detect cancer cells in the tissue through the expression of specific genes is technically cancer sensitivity and high specificity to contribute in the diagnosis, treatment and prognosis of cancer breast cancer. However, according to the AJCC 7, Cancer cells in tissue could not show the M0 and M1 stage, metastatic tumor, but the patient Mx though there is no evidence of clinical or radiation for metastatic image is considered and treated as the treatment of metastatic cancer. That is technically difficult and has attracted the attention of scientists. So far the results research on cancer cells in the blood in Vietnam is still very new, need an investment of effort and technique to bring a positive effect in diagnosis and treatment of breast cancer.

Chapter 2: SUBJECTS AND METHODS

2.1. Research Subjects

Patients groups: breast cancer patients. n=43, fibroids patients n=21. Study subjects were collected from K hospital.

2.2. Research methodology

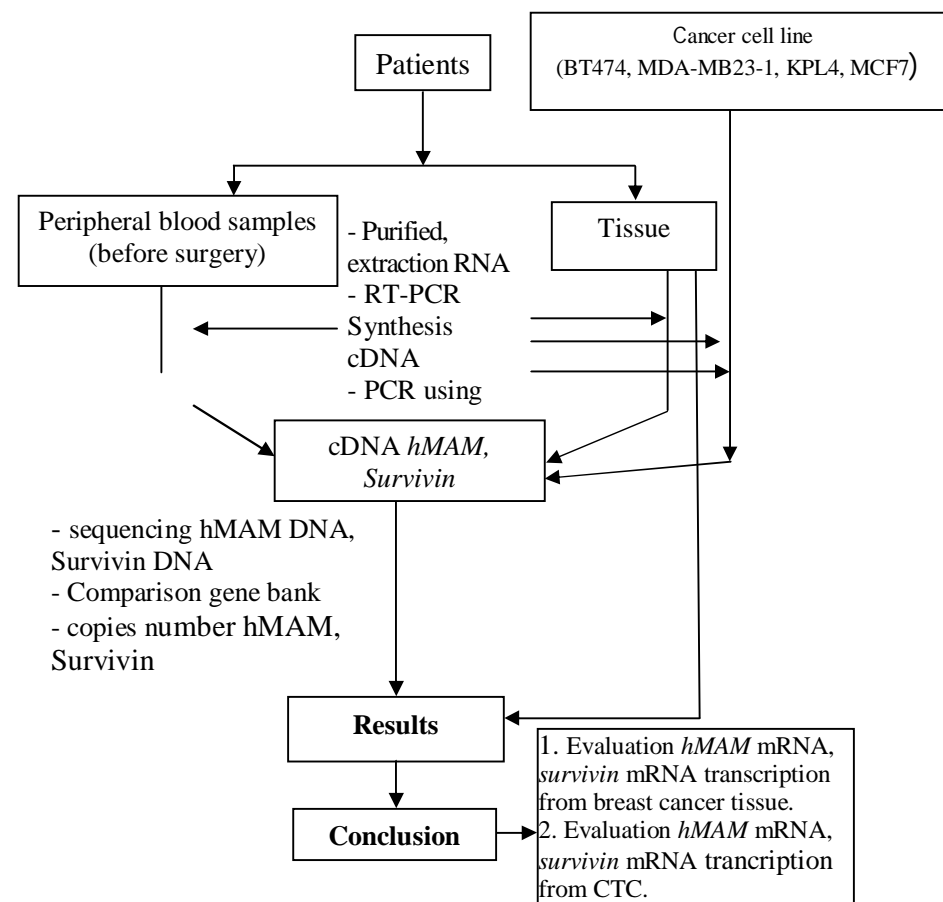
2.2.1. Study design and data processing

- Describe cross
- Statistics based on SPSS 16.0

2.2.2. Location, equipment research

- Genetic analysis:
 - + Laboratory Animal Cell Technology of VAST
 - + Biochemistry Department, Hanoi Medical University
 - Research Proces

SUMMARY CHART RESEARCH PROCESS



2.2.3. Steps

Standardized technical procedures on the breast cancer cell lines and then applied on the sample studied. Specific procedures are as follows:

2.2.3.1. Sampling

2.2.3.2. Primer design

2.2.3.3. Process cultured breast cancer cell lines

2.2.3.4. Techniques total RNA extraction from breast cancer cell lines, blood and tissue studies

2.2.3.5. Determine the concentration and purity of RNA samples by Nano drop 1000.

2.2.3.6. RT-PCR synthesis cDNA

2.2.3.7. PCR using primers GAPDH, hMAM and survivin.

2.2.3.8. Electrophoresis DNA on agarose gel

2.2.3.9. DNA sequencing

2.2.3.10. Real-time PCR

Realtime PCR baseline building

Copies obtained from PCR products are as follows:

$$X \text{ (g)}/l \text{ DNA} / [\text{length} \times 2 \times 340 \text{ RNA fragment}] = Y \times 6022 \times 1023 \text{ copies}/\mu\text{l}$$

Where: 340 is the molecular weight of a nucleotide 6022 × 1023 is the number of molecules in one mole of the substrate.

cDNA copy of the original number = Number of copies obtained from PCR products/2ⁿ (n is the number of PCR cycles). Dilution rate in each tube 10/100/1.000/10.000 from the number of copies develop baseline response.

* Note when road construction standards should not copy the original number is too high, as recommended by Roche highest level when road construction standards should be 10⁷ to ensure linearity.

2.3. Time and funding topics

- Study period: from 1/2011 - 5/2013

- Funds for study: funded from the projects of Ministry of Health by Associate Prof PhD. Pham Thien Ngoc owned by decision No. 905 / QD-BYT.

2.4. Moral issues of subject

This study was biomedical ethically acceptable

Chapter 3: RESEARCH RESULTS

3.1. Construction procedures to detect copy hMAM gene and survivin gene in breast cancer cell lines

3.1.1. Results RT-PCR detection hMAM mRNA and survivin mRNA in cell lines

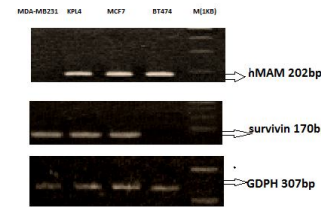


Figure 3.1: Images electrophoresis of PCR hMAM, survivin, GAPDH cDNA in breast cancer cell lines

Reviewers: After cloning of hMAM, survivin cDNA by PCR in four breast cancer cell lines, electrophoretic results showed KPL4 cell line, MCF7, BT474 appears clear electrophoretic band of about 202bp, MDA-MB231 cell lines. Cloning survivin results MDA-MB231, KPL4, MCF7 appearance electrical tape around 170bp, BT474 cell line did not show. To confirm gene fragment was cloned, sequenced to compare with published Gene Bank

3.1.2. Sequencing hMAM, survivin were amplified

Results sequencing hMAM gene amplified primers hMAM F / R directly sequenced on automated sequencing ABI 3100 Avant (Applied Biosystem

Accession	Gene	Species	Length (bp)	Similarity (%)	Identity (%)
AF122882.1	hMAM	Human	202	100	100
AF122883.1	hMAM	Human	202	100	100
AF122884.1	hMAM	Human	202	100	100
AF122885.1	hMAM	Human	202	100	100
AF122886.1	hMAM	Human	202	100	100

Figure 3.2: comparing the sequences hMAM gene copies with that in the gene bank announced

Reviewers: Sequencing results hMAM gene, similarity 100% with the gene sequence was published in Gene Bank identification numbers: AY893203, AY888136, U33147.

Accession	Gene	Species	Length (bp)	Similarity (%)	Identity (%)
AF122887.1	survivin	Human	170	100	100
AF122888.1	survivin	Human	170	100	100
AF122889.1	survivin	Human	170	100	100
AF122890.1	survivin	Human	170	100	100
AF122891.1	survivin	Human	170	100	100

Figure 3.3: comparing the sequences the survivin gene with that in gene bank announced

Reviewers: Sequencing results *survivin* gene copies when compared to the gene sequence was published in the international gene bank we get results overlap 100% with sequences published in Gene Bank identification numbers : BD167854, BD185366, AY893903 ...

3.2. RT-PCR detection *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA transcription in breast cancer tissues and breast cancer peripheral blood.

3.2.1. Characteristics patients

3.2.1.1. The clinical features, histopathology of breast cancer research group

Table 3.1: Basic characteristics of subjects

characteristics	No. of cases (n)	Rate %
Age (year)		
≤ 50	21	48,8
>50	22	51,2
Grade of cancer		
I	8	18,6
II	19	44,2
III	11	25,6
IV	5	11,6
Tumor size		
T1	10	23,3
T2	17	39,5
T3	13	30,2
T4	3	7,0
Distant metastasis		
M0	38	88,4
M1	5	11,6
Lymph node		
N0	13	30,2
N1	17	39,6
N2	13	30,2
Histopathology type		
Ductal	29	67,5
lobular	8	18,6
mucous	6	13,9
CA15-3 (32 U/ml)		
≤ 32	33	76,7
>32	10	23,3

Reviewers: The breast cancer patients were divided into 2 age groups, over and lower 50 age ratio is 48.8% and 51.2%. Researchers have collected enough disease stage, which is the highest stage II 44.2%. There is have the size from T1 to T4 tumors, which account for 23.3% T1, 13 patients had no lymph node occupancy rate 30.2%. On histopathological, mainly ductal rate 67.4 %. Among 43 breast cancer patients studied, 33 patients did not have increased CA15-3 rate 76.7%.

3.2.2.2. Total RNA extracted

Table 3.2: Comparison of total RNA in the group of breast cancer and fibroids breast

Patient	n	Peripheral blood (PB) (ng/μl) ($\bar{X} \pm SD$)	Tissue (ng/μl) ($\bar{X} \pm SD$)
breast cancer (1)	43	110,6±21,3	240,6±64,9
fibroids breast (2)	21	103,0±16,0	220,8±64,7
p (1) and (2)		0,056>0,05	0,85>0,05

Reviewers: Average value of total RNA in tissue higher blood. There was no difference of total RNA in breast cancer tissue with fibroid, PB from breast cancer patients with fibroids ($p > 0.05$).

3.2.2. RT-PCR detection transcription *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in breast cancer tissue

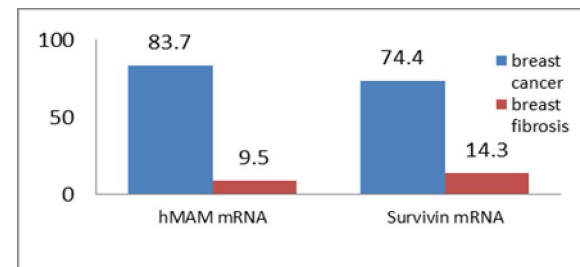


Figure 3.4: Detection *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA rate transcription in breast cancer tissue and fibrosis tissue

Reviewers: The results of electrophoresis RT-PCR *hMAM* mRNA and *survivin* mRNA in breast cancer tissue: *hMAM* have 36/43 cases (83.7%), *survivin* have 32/43 cases (74.4%). In tissue fibrosis

detected *hMAM* have 2/21 cases (9.5%), *survivin* have 3/21 cases (14.3%).

Table 3.3 *Survivin*, *hMAM* expression in breast cancer tissue and clinicopathological factor

Characteristics	No. of cases (n)	<i>hMAM</i> (+)	<i>Survivin</i> (+)
Age (year)			
≤ 50	21	16/21(76.2%)	16/21 (76.%)
>50	22	20/22(90.9%)	16/22 (72.7%)
total	43	p=0.19	p=0.7
Tumor size			
T1	10	9/10 (90.0%)	5/10 (50.0%)
T2	17	13/17 (76.5%)	13/17 (76.5%)
T3 và T4	16	14/16 (87.5%)	14/16 (87.5%)
total	43	P=0.5	p=0.1
Distant metastasis			
M0	38	31/38 (81.6%)	28/38 (73.7%)
M1	5	5/5 (100%)	4/5 (80.0%)
total	43	p=0.29	p=0.76
Lymph node			
No	13	10/13 (76.9%)	8/13(61.5%)
Yes	30	26/30(86.7%)	24/30(80.0%)
total	43	p=0.4	p=0.2
Glade of cancer			
I	8	7/8(87.5%)	4/8(50.0%)
II	19	15/19(78.9%)	14/19(73.7%)
III và IV	16	14/16(87.5%)	14/16(87.5%)
total	43	p=0.75	p=0.13
Histopathology type	29	27/29 (93.1%)	24/29 (82.8%)
Ductal	8	5/8 (62.5%)	4/8 (50.0%)
Lobular	6	4/6 (66.7%)	4/6 (66.7%)
mucous	43	p=0.06	p=0.15
CA15-3 (32 U/ml)	33	29/33(84.4%)	26/33(87.8%)
≤ 32	10	7/10 (70.0%)	6/10(60.0%)
>32	43	p=0.5	p=0.2

Reviewers: data were examined using Chi-square. Positive *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ratio in cancer tissue no difference in the groups was statistically significant over and under 50 years of age ($p>0.05$), in the tumor size, disease stage different, in the metastatic group and found no metastasis ($p>0.05$), not different in various histopathology, in patients with increased CA15-3 and the group did not increase ($p>0.05$).

3.2.3. RT-PCR detection transcription of *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in breast cancer peripheral blood and breast fibroid patient's blood.

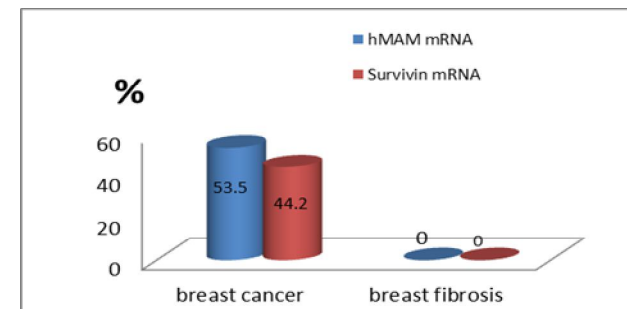


Figure3.4: Detection *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA rate transcription in breast cancer blood and breast fibrosis blood

Reviewers: *hMAM* mRNA, *surviving* mRNA was positively detected in 23 cases (53.5%), 19 cases (44.2%) breast cancer blood, no detection *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA copies in breast fibrosis blood

Table 3.4 *Survivin*, *hMAM* expression in breast cancer blood and clinicopathological factor

Characteristics	No. of cases (n)	<i>hMAM</i> (+) (%)	<i>Survivin</i> (+) (%)
Age (year)			
≤ 50	21	10/21(47.6%)	6/21(28.6%)
>50	22	13/22(59.1%)	13/22(59.1%)
total	43	p=0.45	p=0.051
Tumor size			
T1	10	3/10 (30.0%)	2/10(20.0%)
T2	17	7/17 (41.2%)	6/17(35.3%)
T3 and T4	16	13/16 (81.2%)	11/16(68.8%)
total	43	p=0.02	p=0.03
Distant metastasis			
M0	38	18/38 (47.4%)	15/38(39.5%)
M1	5	5/5(100%)	4/5(80.0%)
total	43	p= 0.027	p=0.08
Lymph node			
No	13	5/13 (38.5%)	3/13(23.1%)
Yes	30	18/30 (60.0%)	16//30(53.3%)
total	43	p=0.19	p=0.06
Grade of cancer			
I	8	2/8 (25.0%)	2/8(25.0%)
II	19	8/19 (42.1%)	6/19(31.6%)
III và IV	16	13/16 (81.2%)	11/16(68.8)
total	43	p=0.01	p=0.04
Histopathology type			
Ductal	29	16/29 (55.2%)	16/29(55.2%)
Lobular	8	3/8(37.5%)	2/8(25.0%)
mucous	6	4/6((66.7%)	1/6(16.7%)
total	43	p=0.52	p=0.1
CA15-3 (32 U/ml)			
≤ 32	33	16/33(48.5%)	16/33(48.5%)
>32	10	7/10(70.0%)	3/10(30.0%)
total	43	p=0.23	p=0.9

Reviewers: No difference in the rate of copy *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in the blood of breast cancer patients in the age group above and below 50 ($p > 0.05$) in the group with lymph node metastasis and without lymph node metastasis ($p > 0.05$), no difference in the change group CA15-3, in the different histologic groups ($p > 0.05$). The ratio of mRNA

copy of *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in the blood of patients with breast cancer increases with tumor size, stage of disease ($p < 0.05$)

3.3. Assessment *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA copies by realtime PCR.

3.3.1. Construction standards cuves determine the number of copies from breast cancer cell lines

- ❖ Calibration and detection threshold *hMAM* mRNA from BT474 breast cancer cells line

Using breast cancer cell lines BT 474: get 20,000 BT474 cells. Measured concentrations of PCR products obtained approximately 679 ng. According to the formula for calculating the number of copies set Realtime PCR standard curve, the number of copies of *hMAM* cDNA generated from breast cancer cell lines BT 474 were 105 copies. Dilution ratios 10/100/1.000/10.000 put into the reaction tube.

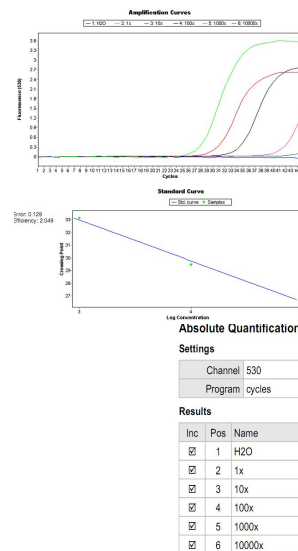


Figure 3.5: Realtime PCR *hMAM* cDNA for determine baseline in BT474 cell lines

Figure 3.6: Real-time PCR *hMAM* cDNA was determined the detection level in BT474 cell lines

Reviewers: Calibration was made by measuring CP at 5 tube

reaction. 1x tube *hMAM* cDNA was generated from 20.000 BT474 cells, equivalent to 105 copies. At a dilution of 100 times, the equivalent of 200 breast cancer cells are detected, the CP is 33.14 and copy number is 893.

- ❖ Calibration and detection threshold surviving mRNA from MCF7 breast cancer cells line

Results							
Ino	Pos	Name	Type	CP	Concentratio	Standard	
☐	1	H2O	Unknown				
☐	2	1000bc	Unknown				
☐	3	1000x	Unknown	33.19	[9.51E1]		
☐	4	100x	Standard	26.14	1.08E4	1.00E4	
☐	5	10x	Standard	23.05	8.58E4	1.00E5	
☐	6	1x	Standard	19.28	1.08E6	1.00E6	

Figure 3.7: Real-time PCR surviving cDNA was determined the detection level in MCF7 cell lines

Reviewers: Based on calculation software has identified copy number amplification of the reaction tube, diluted at 100 times, equivalent to 200 cells was minimum threshold detection transcription *survivin* cDNA, that is 26.14 Cp, the equivalent 1.08E4 copie.

Table 3.5: The level *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA copies in breast cancer tissue and fibrosis tissue

copy numbers	n	<i>hMAM</i> mRNA ($\bar{X} \pm SD$)	<i>Survivin</i> mRNA ($\bar{X} \pm SD$)
breast cancer tissue	43	5.031E5±2.5888E6	8.278E4±174629
fibrosis tissue	21	164 ±543	3733±11537

Reviewers: the average value copies of *survivin* and *hMAM* very high in cancer tissue and not distributed according to the standard rules. Level *hMAM* and *survivin* copies in breast cancer tissue compared with breast fibroid tissue to perform the non-parametric testing.

Table 3.6: Comparison copies number *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in breast cancer tissue and breast fibrosis tissue

<i>hMAM</i> mRNA copies in tissue	patient	n	Mean Rank	Sum of Ranks
	breast cancer	43	40.94	1760.50
	breast fibrosis	21	15.21	319.50
	Total	64	p<0,001	
<i>survivin</i> mRNA copies in tissue	patient	n	Mean Rank	Sum of Ranks
	breast cancer	43	39.33	1691.00
	breast fibrosis	21	18.52	389.00
	Total	64	p<0,001	

Reviewers: *hMAM* mRNA transcription in breast cancer tissue more than breast fibrosis tissue significantly statistics (p<0.01). *Survivin* mRNA transcription in breast cancer tissue more than breast fibrosis tissue significantly statistics (p<0.01).

3.3.3. Comparison copy numbers *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in breast cancer tissue and breast cancer blood.

Table 3.7: Comparison copies number of *hMAM* mRNA in breast cancer tissue and breast cancer blood

	<i>Survivin</i> mRNA copies in tissue - <i>Survivin</i> mRNA copies in blood			<i>hMAM</i> mRNA copies in tissue- <i>hMAM</i> mRNA copies in blood		
	n	Mean Rank	Sum of Ranks	n	Mean Rank	Sum of Ranks
Negative Ranks	13	16.77	218.00	17	21.59	367.00
Positive Ranks	19	16.32	310.00	19	15.74	299.00
Ties	11			7		
Total	43			43		
Z	-.860			-.534		
Asymp. Sig. (2-tailed)	.390			.593		

Reviewers: No difference *hMAM* mRNA copy numbers in breast cancer tissue and breast cancer blood p=0.593. No difference *survivin* mRNA copy numbers in breast cancer tissue and breast cancer blood p=0.390.

Table 3.8: The relationship between tissue and blood about the copy level of *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in breast cancer patients

	n	correlation coefficient (r)	statistical significance (p)
<i>hMAM</i> mRNA	43	0,321	0,036
<i>Survivin</i> mRNA	43	0,479	0,001

Reviewers: using linear regression copies of the cancer tissue is variable independent, copies in the blood is the dependent variable. a statistically significant $p < 0.05$, correlation coefficient (r) between the copy of *hMAM* and *survivin* gene in tissues and blood the range (0.3-0.5), medium positively relative

3.3.4. Progression transcription *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA follow disease staged

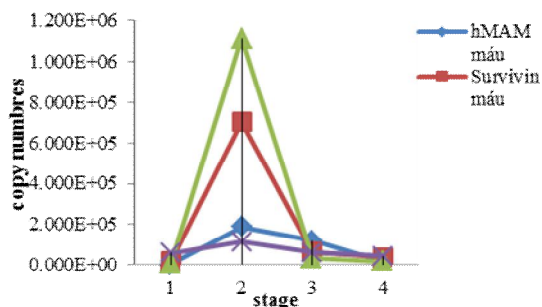


Figure 3.8 Progression transcription *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in blood, tissue of breast cancer patients according to the the disease stage

Reviewers: There are 4 breast cancer stages, in 2e stage the copies *hMAM* and *survivin* are the biggest then descending in 3e and 4e stages. There are similarities in the increase in the tissue and the blood.

CHAPTER 4: DISCUSSION

4.1. Construction procedures to detect copy *hMAM* gene and *survivin* gene in breast cancer cell lines

The cell line is considered as the backbone for the study of cancer. On electrophoresis results Figure 3.1, KPL4 cell line, MCF7, BT474 positive prime *hMAM* R/F, around 202bp size, MDA-MB231 cell lines

did not show the product. PCR products with primers positioned *survivin* showed MDA-MB231, MCF7, KPL4 is clear band about 170 bp in size, this size should *survivin* gene amplification. Thus *survivin* gene is also reproduced in three quarters of breast cancer cell lines studied. Confirm sequencing PCR products were cloned using primers *hMAM* and *survivin*. From chromas sequencing results compared with the design of the genome and comparison with gene sequences were published in gene banks using BLAST or FASTA software. Results of nucleotide sequencing of PCR products demonstrated after using primers *hMAM* F/R and *survivin* F/R is highly homologous genes with the published gene bank

4.2. RT-PCR detection *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA transcription in breast cancer tissues and breast cancer peripheral blood.

4.2.1. Characteristics of subject

With the number of studied samples is still modest, not representative the age incidence, but researchers have collected a sufficient number of samples needed for the subject, there is enough disease stage, tumor size from small to large, consistent with clinical practice and with the results on stage disease ... partly up the panorama of breast cancer to ensure the science of experimental studies.

4.2.2. Total RNA, cDNA synthesis,

Data of total RNA levels obtained in patients with breast cancer and breast fibroids showed that the total RNA in tissue (including cancerous tissue and breast fibroid tissue) more than in blood (including blood and blood breast cancer patients with breast fibroids). This result is consistent with the fact that organizations in specific tissues, cell numbers obtained more blood. However, the amount of RNA in the blood and tissue of cancer patients no differences ($p > 0.05$) than breast fibroids its. Breast cancer patients although increasing *hMAM* mRNA and *survivin* mRNA copy the overall differ with breast fibrosis patients.

4.2.3. The rate of detection of *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA transcription in breast cancer tissue correlation with clinicopathological factor

This study had the 43 samples of breast cancer tissue: with 36/43 cases (83.7%) to detect *hMAM* mRNA transcription. This result is almost equivalent to the previous study, the detection rate *hMAM* mRNA

in breast cancer tissue according to Rocella et al was 93%, by Raica was 78.7%, Al Joudi was 90%. With a very high detection rate in breast cancer tissue, *hMAM* mRNA is great marker for breast cancer diagnosis. Negative controls in the study was the fibroid tissue, had 21 samples. There are 2 (9.5%) samples of them detectable *hMAM* mRNA copies. So *hMAM* mRNA were low rate expression in breast fibroids tissues. Data showed that *hMAM* mRNA expression rate in breast cancer tissue is very high, the case very small tumors <2 cm (T1) has detected 90% *hMAM* mRNA copies, in the first stage (very early) detection rate was 87.5% *hMAM* mRNA, these cases no lymph node was 76.7%. This suggests an enhanced copy of *hMAM* occurs very early in cancer tissue and organizations can use to detect *hMAM* mRNA in tissue for early diagnosis of breast cancer. The study results showed no significant statistics difference in the rate *hMAM* mRNA expression with tumor size, lymph node metastasis, distant metastasis, disease stage ($p>0.05$). Our study with 43 breast cancer tissue and 21 breast fibrosis tissue showed detection rates *survivin* is 32/43 cases in tumor (74.4%), in 3 cases (14.3%) in fibroid. The results showed that *survivin* mRNA expression ratio in the first period and 50%, stage III and IV was 87.5%, the percentage of *survivin* mRNA expression did not differ in the stage of disease ($p=0.13$). In addition, the ratio of *survivin* mRNA expression difference was not statistically significant in the age groups above and below 50 years of age ($p=0.7$), in the group with different tumor size ($p=0.1$). The difference was not statistically significant in the rate of detection of *survivin* mRNA is also seen in those with distant metastases and found no metastasis ($p=0.76$), lymph node group with no lymph node ($p=0.2$), the histopathological ($p=0.15$).

4.2.4. The rate of detection of *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA transcription in breast cancer blood, correlation with clinicopathological factor

Ratio detection *hMAM* mRNA in breast cancer blood is 23 samples (53.5%). We were not detected *hMAM* mRNA copies on the 21 blood samples from breast fibroids patients. This result is consistent with research by Cheng, Shen, Rocella. Compared with the results of Rocella research performed Nested RT-PCR technique, the rate *hMAM* mRNA expression in breast cancer peripheral blood is 12%, not found

expression in blood of benign breast tumor patients and healthy individuals strong. According to research by Cheng Y (2014), using Realtime RT-PCR technique, *hMAM* were detected 75.4% in the blood of breast cancer patients, not found in other epithelial cancers, benign breast disease, volunteers. Detection rate of *hMAM* in blood related to disease stage ($p=0.01$), tumor size ($p=0.02$), distant metastasis ($p=0.027$). Study results showed that *hMAM* mRNA transcription detect in the blood was found early no real metastasis in clinical practice. According to Lee research detection rate of *hMAM* mRNA in the blood in stage I, II 23.4%, stage III and IV was 82.9%, the ratio of expression *hMAM* mRNA in blood related to lymph node metastasis, distant metastasis, the hormone receptor. Findings *survivin* mRNA in the blood of 19 cases (44.2%), not detect *survivin* mRNA copies in blood benign breast tumor patients. According to the research results of Yie et al, *survivin* mRNA detection rate was 50.7% in the blood, not found in healthy people. The study results showed that *survivin* mRNA copies ratio in the blood of breast cancer patients was 25% stage I, 31.6% stage II, stage III and IV was 68.8%, the relationship between *survivin* mRNA in blood and disease stage statistically significant ($p < 0.05$). *Survivin* mRNA detected in the blood of breast cancer patients at the stage when the tumor less than 2cm was 20%, from 2 to 5 cm was 35.3%, 68.8% the above the 5 cm, difference in detection rates *survivin* mRNA with tumor size was statistically significant ($p=0.03$). In summary, using RT-PCR technique detected the *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in blood of breast cancer patients at an early stage, the detection rate related to tumor size, disease stage.

4.3. Real-time PCR assessment *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA copy numbers.

4.3.1. Construction standards cuves determine the number of copies from breast cancer cell lines

To construct the Standard Curve based on breast cancer cell lines research genetic copy. The results BT474 cell line detected *hMAM* mRNA transcription been used to construct the calibration curve. After counting the number cells/ml to separated total RNA, cDNA synthetic, PCR with primers *hMAM*, measure the volume of products obtained from this PCR reaction was *hMAM* genes. As a result is equivalent to

200 breast cancer cells, Ct: 33.14, approximately 893 copie is the lowest level of detectable *hMAM* replication. According Zehetner B by RT-PCR mix BT474 cell line with 5ml normal blood, the detection threshold is 100 TB BT474/1ml blood, duplicate detection threshold is >1000. Similar findings construction standard cuves, *survivin* was performed on 20.000 breast cancer MCF7 cells, set to the lowest level of detection was 200 cells equivalent Ct is 26.14 and the copie 1.08E4. Many studies show that even when Realtime PCR "cut point" to distinguish tumor and normal cells, this technique does not provide an accurate assessment of the number of tumor cells in the sample by the changes in mRNA copy ratio between the tumor cells. So that to assess the extent of gene duplication researchers use baseline will determine the number of copies provided accurate information and more realistic.

4.3.2. *hMAM* mRNA and *survivin* mRNA copies in breast cancer tissue and breast fibrosis tissue

hMAM mRNA amplified in breast cancer tissue: $5,031E5 \pm 2,5888E6$; Breast fibrosis tissue 164 ± 543 , the number of copies of *survivin* mRNA was amplified in breast cancer tissue $8,278E4 \pm 174 629$; tissue fibrosis and 11537 ± 3733 , use of Mann-Whitney nonparametric test to show difference replication of breast cancer tissue compared with breast fibroid tissue . The data showed that the *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA copies in breast cancer tissue is higher than the breast fibrosis tissue statistically significant $p < 0.001$. In 2004, Shi.CX and colleagues demonstrated *hMAM* been detected in breast cancer tissue, benign breast tissue, not found in other benign tissues, the expression level of *hMAM* increase in breast cancer tissue 10-fold compared with benign breast tissues, the enhanced copy of this increase related to the first 345 bp of the promoter encoded. O'Brien.NA indicated that *hMAM* mRNA in breast cancer tissue 10 to 20 times higher than normal breast tissue, rarely in other normal tissues.

4.3.3. *hMAM* mRNA and *survivin* mRNA copies in tissue and blood peripheral of breast cancer patients

Using the Wilcoxon Signed Ranks Test inspection results do not differ in the copy numbers of *hMAM* mRNA and *survivin* mRNA in breast cancer tissue and breast cancer blood with $p > 0.05$. The correlation between the level of *survivin* mRNA, *hMAM* mRNA in the

blood of breast cancer patients with breast cancer tissue is in positive correlation with the average correlation coefficient (r) between 0.3-0.5 with statistically significant $p < 0.05$. According to some authors *hMAM* expression levels in the blood of patients with breast cancer 8 times higher compared with patients with benign breast tumors. So far there are still many different opinions on the role and relationship between the expression levels of *survivin* gene, *hMAM* gene in tissue and blood of breast cancer patients.

Analysis results *hMAM* and *survivin* gene copy phased shows *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA copies in breast cancer tissue increased in stage II, then decreased gradually in stages III and IV. According to some studies, mRNA expression was not merely increases the growth rate of cell division. The excessive growth of *hMAM* mRNA and *survivin* mRNA still many different ideas needs to be further studied to analyze the relationship of DNA, mRNA, protein, and promoter. Some authors suggest that the increase in mRNA copy independent of tumor size, stage of disease, many cases increases *hMAM* mRNA but protein *hMAM* below, many cases are very high *hMAM* protein but *hMAM* mRNA negative. Many studies show an association between cancer cells in blood with time of recurrence, survival ability, really metastatic progression clinical. In fact there are cases of patients for early detection of stage I, II, several months after surgery to detect distant metastases. The case so early metastasis scientists have been proven to be due process Micrometastases has been obscured in the time of diagnosis, if not detected will lead to failure in treatment.

CONCLUSION

1. Transcription *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA from breast cancer tissue
 - Detection rates *hMAM* mRNA and *survivin* mRNA transcription in breast cancer tissue, respectively 36/43 (83.7%), 32/43 (74.4%).
 - Detection rates *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA transcription in tissue fibrosis and breast respectively: 2/21 (9.5%), 3/21 (14.3%).
 - The level of *survivin* mRNA, *hMAM* mRNA in breast cancer tissue higher fibrosis tissue ($p < 0.05$).

- Detection rates *hMAM* mRNA and *survivin* mRNA transcription in breast cancer tissue is not related to age, tumor size, lymph node status, disease stage, distant metastasis status, the histopathological, the variable change CA15-3 ($p > 0.05$).

2. Transcription *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA from breast cancer circulating tumor cells.

- Detection rates *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in the blood of breast cancer patients, respectively: 23/43 (53.5%), 19/43 (44.2%).

- No detectable *survivin* mRNA, *hMAM* mRNA in blood breast fibroid patients.

- Detection rates of *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA in the breast cancer blood related to tumor size, stage of disease ($p < 0.05$).

- The level of transcription *hMAM* mRNA and *survivin* mRNA no difference between the blood and tissue of breast cancer patients ($p > 0.05$).

PROPOSALS

Continuing research transcription *hMAM* mRNA and *survivin* mRNA with a larger sample size sensitivity, specificity in early diagnosis and treatment monitoring, in order to apply this gene in the diagnosis and follow-up treatment human breast cancer.