

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



TRỊNH QUỐC ĐẠT

**NGHIÊN CỨU KIỂU GEN TP53 VÀ MDM2
TRONG UNG THƯ' TẾ BÀO GAN
NGUYỄN PHÁT**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2017

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

TRỊNH QUỐC ĐẠT

**NGHIÊN CỨU KIỂU GEN TP53 VÀ MDM2
TRONG UNG THƯ TẾ BÀO GAN
NGUYỄN PHÁT**

Chuyên ngành : Hóa sinh Y học

Mã số : 62720112

Người hướng dẫn khoa học:

TS. TRẦN HUY THỊNH

GS.TS. TẠ THÀNH VĂN

HÀ NỘI - 2017

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư tế bào gan nguyên phát (hepatocellular carcinoma-HCC, UTTBGNP) là bệnh lý ác tính hay gặp hàng đầu trên thế giới. Theo tổ chức Y Tế thế giới, hàng năm có hơn nửa triệu trường hợp mắc mới trên toàn cầu. Bệnh có tỷ lệ tử vong cao, đứng thứ hai trong các nguyên nhân tử vong do ung thư ở nam giới, chỉ sau ung thư phổi. Hiệp hội ung thư Hoa Kỳ công bố, năm 2012 thế giới có khoảng 745.500 người chết vì ung thư gan [1],[2]. Việt Nam là quốc gia nằm trong vùng dịch tễ có tỷ lệ viêm gan virus cao nên có số người mắc UTTBGNP tương đối lớn. Ước tính trung bình mỗi năm cả nước có trên 10.000 ca UTTBGNP mới phát hiện, tỷ lệ này thuộc hàng cao nhất thế giới [3],[4],[5].

Các yếu tố nguy cơ gây UTTBGNP từ lâu đã được biết đến như viêm gan virus B, C, nghiện rượu, aflatoxin B1, tình trạng xơ gan, gan nhiễm mỡ không do rượu... [6]. Gần đây, với sự phát triển mạnh mẽ của chuyên ngành sinh học phân tử, vai trò của yếu tố gen-di truyền đã được đề cập. Một trong những hướng nghiên cứu là tìm kiếm các kiểu gen có nguy cơ cao phát sinh ung thư gan từ các gen tiềm năng. Các kiểu gen nguy cơ, sau đó sẽ phát triển thành các phương tiện sàng lọc sớm và tư vấn cho cộng đồng, để phòng tránh UTTBGNP. Hầu hết các nhóm gen tiềm năng, liên quan với ung thư gan đã được nghiên cứu, chúng bao gồm gen mã hoá các enzym chuyển hoá rượu (*ADH*, *ALDH*), gen mã hoá các enzym chuyển hoá hợp chất xenobiotic (*CYP...*), các gen *β -catenin* trong sự tăng trưởng tế bào, gen mã hoá các cytokin gây viêm (*IL*, *TNF- α ...*) các gen ức chế khối u (*TP53*, *MDM2...*) [7],[8],[9].

TP53 là một trong những gen được nghiên cứu nhiều nhất, và có tần số đột biến lớn nhất trong ung thư gan [9]. Gen TP53 là nhạc trưởng trong con đường tín hiệu p53, một cơ chế chống ung thư quan trọng của con người. Khi các yếu tố có hại làm tổn thương bộ gen, TP53 sẽ được hoạt hóa gây dừng

chu kỳ phân bào cho đến khi DNA được sửa chữa hoặc gây chết tế bào theo chương trình nếu DNA tổn thương không sửa chữa được. Vì vậy, TP53 được xem như trạm gác của bộ gen tế bào (guardian genome) [10],[11],[12],[13]. Tuy nhiên sự biểu hiện của TP53 lại chịu sự kiểm soát của MDM2. Một gen điều hoà trong con đường tín hiệu p53. MDM2 kiểm soát TP53 thông qua quá trình giáng hóa protein TP53. Ngược lại, TP53 hoạt hóa lại thúc đẩy quá trình phiên mã MDM2. Sự điều hòa ngược của hai gen này đảm bảo cho sự ổn định bộ gen tế bào [14],[15]. Nếu một trong hai gen bị biến đổi, sẽ dẫn đến sự mất kiểm soát quá trình phân chia tế bào, tạo cơ hội để các dòng tế bào ung thư xuất hiện và phát triển.

Hiện tượng thay thế các nucleotid đơn của TP53 và MDM2 tạo ra các kiểu gen khác nhau trong cộng đồng [11]. Sự phân bố các kiểu gen này liên quan đến bệnh sinh của nhiều loại hình ung thư, trong đó có ung thư tế bào gan nguyên phát [16],[17],[18],[19],[20]. Việc xác định khả năng mắc bệnh của các kiểu gen TP53 và MDM2 rất có giá trị trong sàng lọc sớm, phòng tránh, theo dõi, ngăn ngừa sự hình thành và phát triển khối u gan. Đây được xem như một hướng tiếp cận mới đầy triển vọng, góp phần làm giảm tỷ lệ mắc ung thư tế bào gan nguyên phát. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn đó, chúng tôi thực hiện đề tài **“Nghiên cứu kiểu gen TP53 và MDM2 trong ung thư tế bào gan nguyên phát”** với các mục tiêu nghiên cứu cụ thể sau:

1. *Xác định tỷ lệ phân bố kiểu gen TP53 ở bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát và nhóm chứng.*
2. *Xác định tỷ lệ phân bố kiểu gen MDM2 ở bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát và nhóm chứng.*
3. *Đánh giá mối tương quan giữa các kiểu gen TP53, MDM2 và một số yếu tố nguy cơ gây ung thư tế bào gan nguyên phát.*

Chương 1

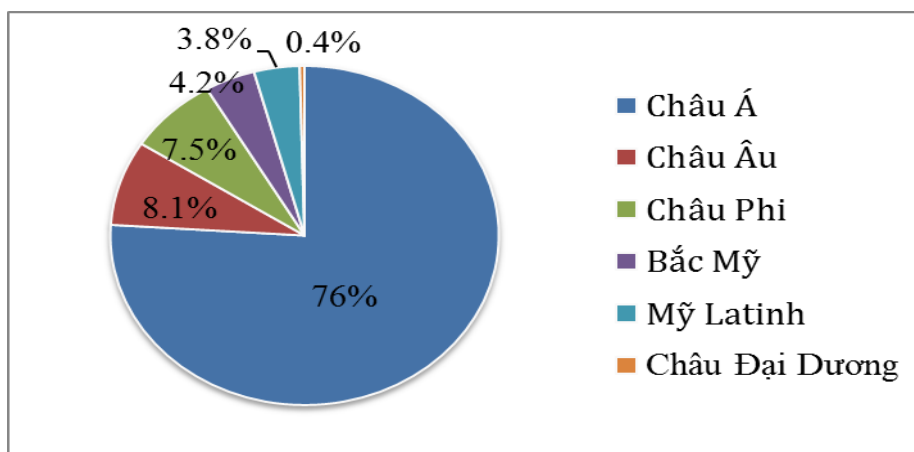
TỔNG QUAN

1.1. UNG THƯ TẾ BÀO GAN NGUYÊN PHÁT

Ung thư tế bào gan nguyên phát hay còn có tên là ung thư biểu mô tế bào gan. Đây là một bệnh lý ác tính khởi phát từ những tế bào gan (hepatocellular carcinoma).

1.1.1. Dịch tễ học

Theo số liệu trên Global Cancer Facts & Figures, ung thư gan đứng hàng thứ năm ở nam giới và thứ chín ở nữ giới về tỷ lệ mắc, trong các loại hình ung thư. Châu Á và Bắc Phi là những vùng có tỷ lệ mắc cao nhất. Trong 782.500 trường hợp mắc mới trên toàn cầu trong năm 2012, châu Á chiếm đến 76%. Đặc biệt riêng Trung Quốc chiếm gần 50% tổng số ca. Các vùng Đông-Đông Nam Á và Bắc Phi ghi nhận tỷ lệ mắc hơn 20/100.000 người dân. Các vùng bắc Mỹ và châu Âu có tỷ lệ mắc thấp nhất, dưới 10/100.000 người dân. Tuổi trung bình mắc UTTBGNP tại châu Á là 45 tuổi trong khi thống kê ở Châu Âu là 60 và châu Phi là 35. Nam giới có tỷ lệ mắc bệnh cao hơn nữ, gấp từ 2 đến 20 lần so với nữ giới. Ung thư biểu mô tế bào gan chiếm gần 90% trường hợp ung thư gan nguyên phát [1],[2],[3].



Hình 1.1. Phân bố tỷ lệ UTTBGNP trên thế giới. (Số liệu: IARC, 2012)

UTTBNP tiến triển rất nhanh, nếu không được điều trị thì bệnh nhân thường tử vong sau khoảng 6 tháng đến 2 năm kể từ khi có triệu chứng đầu tiên. Tiên lượng cũng không khá hơn ngay cả ở các nước phát triển. Tại Hoa Kỳ, sự tồn tại một năm là dưới 50%, và sống sót sau năm năm chỉ có 10% [3]. Ở các nước đang phát triển, tỷ lệ này thậm chí còn thấp hơn. Tỷ lệ tử vong cao hơn so với tỷ lệ mắc mới được ghi nhận tại một số vùng. Điều này được lý giải do gan là một cơ quan ưa thích để di căn của nhiều bệnh ung thư, và không dễ dàng để tách riêng số liệu tử vong do ung thư gan thứ phát hay nguyên phát, nhất là ở những nước đang phát triển. Số liệu của thống kê năm 2012 cho biết, trong nguyên nhân gây tử vong của các loại hình ung thư, thì UTTBNP chiếm 30-40% ở châu Phi và châu Á trong khi tỷ lệ này với châu Âu là 1%. Trên phạm vi toàn cầu, ung thư gan đứng hàng thứ hai ở nam giới và thứ sáu ở phụ nữ, trong tổng số ca tử vong do ung thư. Ước tính có khoảng 745.500 ca tử vong trong năm 2012 [1],[3].

Xu hướng mắc UTTBNP trên toàn cầu có nhiều thay đổi trong những thập kỷ gần đây. Những khu vực có tỷ lệ mắc thấp như châu Âu, Bắc Mỹ đang gia tăng nhanh chóng. Điều này được giải thích do tỷ lệ nhiễm virus viêm gan C tăng trong những năm 1960 – 1970 liên quan đến tiêm chích ma túy. Ngoài ra còn có sự gia tăng nhanh chóng của bệnh lý gan nhiễm mỡ không do rượu, béo phì, đái tháo đường type II. Ngược lại một số quốc gia có tỷ lệ mắc ung thư gan cao liên quan đến HBV sẽ có sự suy giảm trong thời gian sắp tới do hiệu quả của chương trình tiêm phòng vacxin HBV từ những năm 1980 [3].

Việt Nam là quốc gia nằm trong vùng dịch tễ có tỷ lệ viêm gan virus cao nên có tỷ lệ ung thư gan mới phát hiện thuộc hàng cao nhất thế giới. Tại hội thảo quốc gia về phòng chống ung thư tổ chức tại Hà Nội tháng 10/2004 cho thấy, tỷ lệ mắc UTTBNP đứng ở vị trí thứ 3 sau ung thư phổi và ung

thư dạ dày. Ước tính mỗi năm có trên 10.000 trường hợp mắc mới. Tỷ lệ mắc bệnh ở các tỉnh phía Nam cao hơn phía Bắc. UTTBGNP có thể gặp ở mọi lứa tuổi nhưng chủ yếu là lứa tuổi trung niên (40-50 tuổi). Tỷ lệ mắc bệnh ở nam cao gấp 3-4 lần so với nữ. Tại thành phố Hồ Chí Minh, ung thư gan đứng thứ nhất trong số 10 loại ung thư thường gặp ở nam giới (với tần xuất 38,2 trường hợp trên 100.000 dân mỗi năm), thứ sáu ở nữ (với tần suất 8,3 trường hợp trên 100.000 dân mỗi năm). Ở Hà Nội, ung thư gan đứng hàng thứ ba ở nam giới và thứ bảy ở nữ [4],[5].

1.1.2. Các yếu tố nguy cơ

1.1.2.1. Xơ gan

Phần lớn UTTBGNP phát triển trên nền gan xơ. Xơ gan càng nặng thì khả năng UTTBGNP càng cao. Ở châu Á, tỷ lệ xơ gan trên các bệnh nhân ung thư lên đến 70 - 90% [21]. Đã có nhiều nghiên cứu tiến hành trên thế giới cũng như tại Việt Nam đều kết luận, có một tỷ lệ lớn UTTBGNP phát triển trên nền gan xơ. Nghiên cứu của Okuda (2007) và Nordenstedt (2010) cho thấy tỷ lệ này là khoảng 70%-90% [21],[22]. Ở Việt Nam, tỷ lệ này là khoảng 80% - 90% [23].

Các tổn thương mạn tính của gan tạo ra một nhu cầu thay đổi các tế bào gan mới với số lượng lớn, để hàn gắn tổn thương và tái sinh. Đây là điều kiện để những bất thường về di truyền tế bào xảy ra như: biến đổi nhiễm sắc thể, kích hoạt các gen sinh ung thư, bất hoạt các gen ức chế khối u... Viêm gan virus, nghiện rượu, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu là các nguyên nhân gây xơ gan, tiến triển thành ung thư theo con đường này. Mặt khác, hầu hết các trường hợp UTTBGNP xảy ra sau nhiều năm của bệnh viêm gan mạn tính. Tình trạng này cung cấp môi trường làm biến đổi nhiễm sắc thể và đột biến gen. Sự tích tụ ngẫu nhiên, sau nhiều năm những tổn thương gen và nhiễm sắc thể, cuối cùng sẽ dẫn đến sự phát triển của các dòng tế bào gan

không nguyên bản, kém biệt hoá hoặc không biệt hoá. Đây là nguồn gốc ung thư tế bào gan nguyên phát [21].

1.1.2.2. Nghiện rượu

Năm 1988, tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế - IARC kết luận rằng, có một mối quan hệ nhân quả giữa việc lạm dụng rượu và ung thư gan. Đến năm 2007, quỹ nghiên cứu ung thư thế giới và Viện nghiên cứu ung thư Hoa Kỳ trong một nghiên cứu đánh giá các chế độ ăn uống và hoạt động thể chất, kết luận rằng nghiện rượu là một nguyên nhân trực tiếp của bệnh ung thư gan [24],[25]. Các nghiên cứu chỉ ra, khi lượng alcohol dùng trên 80g/24h và kéo dài, nguy cơ ung thư gan sẽ hình thành. Tuy nhiên, cơ chế trực tiếp gây bệnh còn chưa thống nhất. Quan điểm được ủng hộ nhiều nhất là rượu gây UTTBGNP thông qua xơ gan, hoặc hiệp đồng với các virus viêm gan B, C.

Các nghiên cứu đánh giá liên quan giữa rượu và UTTBGNP ở châu Âu đã được tiến hành từ rất sớm. Kết quả cho thấy, nguy cơ UTTBGNP cao gấp 13 lần ở những bệnh nhân xơ gan uống rượu nhiều so với những bệnh nhân xơ gan không uống rượu [26]. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Kim Hoa và cộng sự năm 2010 ở miền Trung Việt Nam cho thấy, bệnh nhân có tiền sử uống rượu có nguy cơ bị UTTBGNP cao gấp 7 lần so với nhóm chứng [5]. Các kết quả cho thấy, rượu là yếu tố nguy cơ quan trọng trong UTTBGNP. Các kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra, phụ nữ cùng uống lượng rượu như nam giới có nguy cơ mắc bệnh gan gấp 2 lần nam giới, người Mỹ nguồn gốc Tây Ban Nha có nguy cơ mắc bệnh gan do rượu cao hơn người Mỹ da đen và da trắng. Khi mắc các bệnh lý phối hợp, viêm gan B, C, rối loạn chuyển hóa... sẽ làm tăng nguy cơ UTTBGNP do rượu [27],[28],[29].

1.1.2.3. Virus viêm gan B

Ước tính có khoảng 2 tỷ người mang HBV trên thế giới, trong đó 250 triệu người bị viêm gan B mạn tính, và khoảng gần 1 triệu người thiệt mạng

mỗi năm liên quan đến loại virus này. Đây được xem như một sát thủ thầm lặng vì hầu hết các bệnh nhân không nhận biết được là mình đã mắc bệnh cho đến khi các triệu chứng tổn thương gan xuất hiện. HBV có tỷ lệ lây nhiễm gấp 50 – 100 lần so với HIV (WHO, 2009). Theo số liệu của WHO, Việt Nam được xếp vào vùng lưu hành cao của nhiễm virus viêm gan B, tỉ lệ nhiễm HBV ở Việt Nam trung bình vào khoảng 15%, như vậy ước tính ra có khoảng 10-12 triệu người Việt đang mang mầm bệnh nguy hiểm này.

Theo các số liệu của Cougot và cộng sự, trong các yếu tố nguy cơ chính gây UTTBGNP, thì tình trạng viêm gan virus B và viêm gan virus C mạn tính là 2 yếu tố quan trọng nhất, chiếm khoảng 70% các trường hợp ung thư tế bào gan nguyên phát trên thế giới [30]. Một nghiên cứu tại Mỹ ở bệnh nhân người Mỹ gốc Hàn nhiễm HBV mạn tính đã ghi nhận 9,59% bệnh nhân tiến triển UTTBGNP. Nghiên cứu cũng ghi nhận nam giới nhiễm HBV có nguy cơ mắc UTTBGNP cao hơn nữ nhiễm HBV 2,4 lần (95% CI 1.18-4.87) [31]. Cũng nghiên cứu trên người châu Á khác, Sakuma và cộng sự đã tìm thấy là tỷ lệ mắc ung thư biểu mô tế bào gan ở nam công nhân đường sắt Nhật nhiễm HBV là 0,4%/năm [32]. Cả hai nhóm này là nam giới và là người châu Á, với nhiễm virus viêm gan B có thể mắc vào lúc sinh hoặc vào đầu thời kỳ thơ ấu. Các nghiên cứu ở Bắc Mỹ, McMahon và cộng sự đã báo cáo một tỷ lệ mắc UTTBGNP 0,26%/năm trong một nghiên cứu ở những người nhiễm HBV ở Alaska [33]. Các nghiên cứu thống kê cộng dồn (meta-analysis) trên nhiều nghiên cứu đơn lẻ, tại nhiều quốc gia, nhiều chủng tộc khác nhau, với một cỡ mẫu lên đến hàng chục nghìn cho thấy, nguy cơ mắc UTTBGNP của người nhiễm HBV là khá cao, khoảng 15,6 đến 20,4 lần so với người bình thường [34],[35]. Tại Việt Nam, nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Kim Hoa và cộng sự năm 2010 chỉ ra, những bệnh nhân có tiền sử viêm gan virus B có nguy cơ bị UTTBGNP cao gấp 6,64 lần so với nhóm chứng [5].

HBV là một loại virus nhỏ mang DNA thuộc họ Hepadnaviridae. Khi xâm nhập vào cơ thể, chúng sẽ đi thẳng vào từng tế bào của gan và sinh trưởng rất nhanh chóng. Với đặc tính vi khuẩn hóa, chúng sẽ trung dụng và điều khiển các vật liệu di truyền của tế bào gan để nhân lên rồi phát tán. Lâu dần, HBV chiếm lấy chủ quyền và chỉ huy mọi hoạt động của bộ gen tế bào gan [36]. Sự thay đổi chủ sở hữu này có thể gây ra nhiều hậu quả tai hại sau này. Không những chi phối mọi hoạt động của bộ gen, chúng còn có thể tích hợp vào chất DNA làm thay đổi các đặc tính di truyền của tế bào gan. Bằng chứng là việc tìm thấy dấu vết DNA của HBV trong cả tế bào gan bị viêm mạn tính và tế bào gan ung thư. Quá trình tích hợp hay chèn các mảnh DNA của HBV vào bộ gen tế bào gan tại những vị trí nhất định của HBV, hoặc với những mảnh gen HBV đột biến, sẽ gây ra những biến đổi di truyền tế bào gan. Con đường này từ lâu được cho là một lý thuyết cho sự hình thành UTTBGNP trên bệnh nhân viêm gan B mạn tính [30].

Ngoài ra, còn có một giả thuyết khác về quá trình hình thành UTTBGNP ở bệnh nhân viêm B mạn tính. Trên thực tế, virus không trực tiếp làm tổn thương tế bào gan mà do hệ thống miễn dịch của cơ thể nhận diện các tế bào gan đã bị nhiễm, tấn công phá huỷ các tế bào này gây tổn thương gan. Giai đoạn viêm mạn tính kéo dài dẫn đến xơ hoá các tiểu thùy gan, tạo ra môi trường lý tưởng cho đột biến gen và biến đổi nhiễm sắc thể xuất hiện. Hơn nữa, tổ chức xơ phát triển lấn át các mô gan bình thường làm các tế bào gan ngày càng ít nhưng vẫn phải đảm đương các chức năng bình thường của gan. Bệnh cảnh này tạo ra nhu cầu mãnh liệt tái sinh liên tục tế bào gan. Đây là điều kiện không thể tốt hơn để các đột biến gen xuất hiện và tích lũy. Đây cũng chính là mầm mống của ung thư tế bào gan nguyên phát [21].

1.1.2.4. Virus viêm gan C

HCV cũng là một nguyên nhân chính gây ung thư tế bào gan. Theo số liệu của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), có khoảng 170 - 200 triệu người mang HCV mạn tính trên toàn cầu và khoảng 500.000 người chết mỗi năm liên quan đến HCV. Khoảng 2,3 - 4,7 triệu người nhiễm mới mỗi năm. Hiện có khoảng 6% dân số Việt Nam nhiễm virus viêm gan C. Con số này đang có khuynh hướng gia tăng. HCV nguy hiểm vì bệnh hầu như không có biểu hiện gì rõ rệt, không bao giờ có thể tối cấp. Nhiều người chỉ biết mình nhiễm virus khi đã bị xơ gan, ung thư gan. Khoảng 80% trường hợp nhiễm HCV sẽ chuyển mạn tính. Virus viêm gan C sẽ âm thầm huỷ hoại các tế bào gan cho đến khi xơ hoá, tiến trình này kéo dài khoảng 20 năm. Các nghiên cứu bệnh viêm gan siêu vi C và UTTBGNP cho thấy, thời gian tiến triển ung thư là khoảng 28 năm sau khi bị nhiễm HCV. Như vậy, những bệnh nhân bị nhiễm viêm gan C mà tiến triển tới xơ gan thì khoảng 8-10 năm sau UTTBGNP sẽ xảy ra.

Các nghiên cứu lớn tại châu Âu, tìm thấy 40-44% số bệnh nhân bị UTTBGNP có nhiễm HCV [37],[38]. Một nghiên cứu khác tại Nhật Bản, cho kết quả là 80-90% số ca UTTBGNP có viêm gan C mạn tính [39]. Không chỉ tại Nhật, mà tại các quốc gia Đông Á khác, HCV thật sự là một nguy cơ ung thư gan rất rõ ràng. Donato và cộng sự đã thực hiện một nghiên cứu phân tích cộng đồng, dựa trên số liệu thu được từ 21 nghiên cứu bệnh chứng đã thực hiện. Kết quả cho thấy, nguy cơ ung thư tế bào gan nguyên phát cao gấp 17 lần ở những người nhiễm HCV mạn so với người bình thường làm chứng [40].

Con đường mà HCV gây ra HCC chưa được nghiên cứu rõ. Không giống như HBV, HCV không xâm nhập trực tiếp vào chất liệu di truyền của tế bào gan, nên khả năng HCV làm tổn thương bộ gen của tế bào gan là không cao. Tuy nhiên, tình trạng viêm mạn tính và xơ hoá tổ chức nhu mô

gan do bất cứ nguyên nhân nào cũng là một nguy cơ dẫn tới UTTBGNP. Do đó có thể xem, HCV gây ra xơ gan, là một nguyên nhân không trực tiếp của UTTBGNP. Một số ít trường hợp nhiễm HCV mãn tính diễn tiến đến thẳng UTTBGNP mà không thông qua xơ gan. Vì vậy một lý thuyết khác cho rằng, protein lõi của HCV là thủ phạm dẫn tới UTTBGNP. Chính protein lõi ngăn cản quá trình chết tự nhiên của tế bào gan hoặc chống lại chức năng ức chế khối u bình thường trong gan. Hậu quả là tạo ra những dòng tế bào bất thường có thể dẫn tới ung thư [21].

1.1.2.5. Aflatoxin B₁ (AFB₁)

Aflatoxin B₁ là một độc tố được tạo ra bởi nấm *Aspergillus*, loại nấm sinh ra chủ yếu trong các loại lương thực - thực phẩm như: ngô, sắn, gạo, lạc, đậu... ở điều kiện môi trường nóng ẩm. Đây là một chất gây ung thư rất mạnh, sản phẩm tạo ra trong quá trình chuyển hóa AFB₁, có khả năng gắn vào phân tử DNA và gây đột biến. Đã có các bằng chứng về sự liên quan giữa tình trạng nhiễm AFB₁ và đột biến gen ở các bệnh nhân UTTBGNP, mà nhiều nhất là đột biến gen TP53. Đây là một gen ức chế ung thư quan trọng của cơ thể con người. Chất AFB₁ gây đột biến gen TP53 thông qua sự hoạt hóa 1 chất chuyển hóa của nó là AFB-1-exo-8,9-epoxide [41]. Chất này có thể gây ra sự thay thế G thành T tại codon 249 của gen TP53 [42]. Hậu quả làm biến đổi phân tử protein p53 tại vùng gắn kết DNA đích, dẫn đến làm suy giảm khả năng ức chế sự hình thành khối u của TP53. Tỷ lệ cao những đột biến này (lên đến 50%) đã được tìm thấy ở 1 số nước thuộc khu vực Đông Nam Á và Nam Phi, một tỷ lệ thấp hơn được ghi nhận ở khu vực châu Âu, Bắc Mỹ và Trung Đông [43],[44].

Những bằng chứng mạnh mẽ chứng minh AFB₁ là một yếu tố nguy cơ gây UTTBGNP đã được các nghiên cứu dịch tễ lớn công bố. Các kết quả nghiên cứu có được, do sự phát triển của các phương pháp xét nghiệm phát

hiện sản phẩm chuyển hóa của AFB₁ trong nước tiểu và albumin gắn AFB₁ trong huyết thanh. Ngoài ra bằng chứng ở cấp độ phân tử của sự liên quan cũng được khẳng định qua việc phát hiện các đột biến có dấu vết aflatoxin trong DNA mô ung thư. Một nghiên cứu tại Trung Quốc cho thấy, các chất bài tiết ra nước tiểu của chuyển hóa aflatoxin dương tính, làm tăng gấp 4 lần nguy cơ UTTBGNP so với người âm tính. Đặc biệt khi kết hợp kết quả xét nghiệm dương tính với nhiễm HBV mạn tính đã tăng đến 60 lần nguy cơ UTTBGNP [45].

1.1.2.6. Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, béo phì, đái tháo đường

Một số nghiên cứu ở Hoa Kỳ đi tìm các yếu tố nguy cơ đối với xơ gan và ung thư gan, đã không xác định được HCV, HBV, hoặc nghiện rượu trong 30% - 40% số bệnh nhân. Các trường hợp này, đều có xu hướng và các đặc điểm lâm sàng, nhân khẩu học gợi ý đến bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH) [46]. Một nghiên cứu khác với số lượng mẫu lớn [47], đã tiến hành trong 7,6 năm, sau khi xác định chính xác NASH. Kết quả cho thấy, nguyên nhân gây tử vong do bệnh gan mạn tính đứng thứ 3 trong nhóm NASH so với thứ 13 trong toàn bộ dân số bang Minnesota. Tuy nhiên cơ chế bệnh sinh NASH gây xơ gan và ung thư gan vẫn chưa được rõ ràng. Một nghiên cứu cộng dồn tất cả những nghiên cứu từ 2002-2008 tại Mỹ đã chỉ ra, NASH là một yếu tố nguy cơ của UTTBGNP [48].

Bệnh béo phì được ghi nhận là tăng song hành với tỷ lệ mắc UTTBGNP. Trong một tiến cứu quy mô lớn trên 900.000 người Mỹ, sau 16 năm theo dõi, các nhà nghiên cứu đã thu được kết quả tỷ lệ tử vong do ung thư gan là cao hơn 4,5 lần ở nam giới có chỉ số BMI > 35 và 1,7 lần ở phụ nữ BMI > 35 so với các cá nhân cân nặng bình thường [49]. Hai nghiên cứu thuần tập dựa vào dân số khác, đến từ Thụy Điển và Đan Mạch phát hiện thấy, tăng từ hai đến

ba lần nguy cơ UTTBGNP ở nam giới béo phì và phụ nữ so với những người có chỉ số BMI bình thường [50],[51].

Đái tháo đường lần đầu tiên được đề cập như là một nguy cơ của ung thư tế bào gan từ năm 1986 [52]. Tuy nhiên sau đó các nghiên cứu tiếp theo đã không thống nhất kết quả. Đến năm 2006, một nghiên cứu cộng gộp phân tích đa biến đã đưa ra kết luận, đái tháo đường liên quan đến UTTBGNP tại nhiều khu vực trên thế giới. Cả những khu vực có tỷ lệ mắc UTTBGNP thấp cũng như cao [53]. Sau đó một tiến cứu trên cỡ mẫu rất lớn đã được tiến hành, kết quả chỉ ra, nguy cơ ung thư gan gấp đôi ở nhóm có bệnh tiểu đường, và tăng lên theo thời gian theo dõi [54]. Tuy nhiên, cơ chế phân tử của mối liên quan giữa tiểu đường type II và ung thư gan chưa đầy đủ. Lý thuyết phổ biến nhất, được cho là gián tiếp qua tình trạng viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH) và tiến trình xơ gan.

1.1.3. Bệnh học phân tử ung thư tế bào gan nguyên phát

1.1.3.1. Vai trò của di truyền trong ung thư gan

Các nghiên cứu về dịch tễ phân tử đã cho thấy hầu hết các trường hợp UTTBGNP đều khởi phát lẻ tẻ và liên quan đến ít nhất một yếu tố nguy cơ không phải di truyền như viêm gan B, C mạn tính, nghiện rượu, gan nhiễm mỡ. Một thực tế nữa là rất nhiều người trong chúng ta phơi nhiễm với các yếu tố nguy cơ trong thời gian dài, nhưng không phát triển thành UTTBGNP. Tất cả điều này cho thấy một hiện thực rằng, UTTBGNP có tính riêng biệt cho từng cá thể, hay có một vai trò không thể phủ nhận của di truyền.

Năm 2002, một nghiên cứu bệnh chứng lớn tại Hoa Kỳ đã đưa ra các bằng chứng sơ bộ về vai trò của gen trong tiến trình phát sinh phát triển ung thư. Nghiên cứu được tiến hành với số lượng mẫu lớn với 500 bệnh nhân

xơ gan (hầu hết nhiễm HCV) và 500 người đối chứng không có bệnh gan. Kết quả cho thấy, tỷ lệ có họ hàng một đời cũng mắc xơ gan trong nhóm bệnh cao hơn có ý nghĩa so với nhóm chứng (OR = 17; 95% CI, 4.2–12.9) [55]. Một nghiên cứu khác, trong khi tìm hiểu tính gia đình của kháng insulin trong viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), các tác giả phát hiện một xu hướng gia đình rất rõ trong những bệnh nhân NASH có xơ gan [56]. Cũng tương tự như vậy đối với tiến trình xơ gan của nhiễm HBV mạn tính, một số nghiên cứu đã đưa ra những bằng chứng sơ bộ về sự khác biệt giữa các nhóm gia đình [57],[58]. Cả ba nhóm nghiên cứu trên không tiến hành trên bệnh nhân UTTBGNP mà trên đối tượng xơ gan. Tuy nhiên xơ gan được cho là bệnh cảnh mạn tính cuối cùng trước khi chuyển ác tính, của các yếu tố nguy cơ ngoại sinh. Những bằng chứng sơ bộ này còn mang một thông điệp, di truyền không chỉ là một yếu tố nguy cơ độc lập, mà còn tương tác với các yếu tố môi trường để định hình xu hướng tiến triển tới ung thư gan hay là không.

Gần đây với nhiều thành tựu trong ngành di truyền học, như hoàn thành dự án bộ gen người, phát hiện hàng triệu các đa hình nucleotid đơn (SNP), phát triển nhiều kỹ thuật sinh học phân tử mới, bình dân hoá giá của các xét nghiệm di truyền... đã tạo điều kiện để thực hiện các dự án nghiên cứu dịch tễ gen lớn, có tính đại diện cho cộng đồng hơn. Mô hình nghiên cứu bệnh chứng được sử dụng, để tìm sự khác biệt di truyền của nhóm người bị ung thư gan và không. Tuy nhiên trong rất nhiều gen trong cơ thể, người ta chỉ chọn một số ít các gen có tiềm năng liên quan đến UTTBGNP để phân tích. Có thể chia thành 3 nhóm chính sau: [55]

- Nhóm gen quan trọng trong các chức năng khử độc của gan. Như các gen mã hoá cho các enzym trong pha I, pha II của hệ thống cytochrom P450 (chức năng chuyển hoá hợp chất xenobiotic của gan). Đó là tập hợp các gen trong nhóm CYP.

- Nhóm gen key-point của các con đường tín hiệu quan trọng trong ung thư. Như chết theo chương trình, sửa chữa DNA, phản ứng viêm... Tiêu biểu là gen ức chế khối u TP53 trong con đường tín hiệu p53.

- Nhóm gen làm trầm trọng hơn hoặc giảm thiểu tác động từ quá trình phơi nhiễm với các yếu tố độc hại từ môi trường. Như rượu, aflatoxin... Ví dụ gen mã hoá enzym ADH, ALDH trong chuyển hoá rượu.

Các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra được những đa hình kiểu gen liên quan UTTBGNP, không liên quan hoặc liên quan đến một nhóm cá thể hạn chế nào đó trong cộng đồng. Tuy nhiên, sự liên quan tìm thấy, thường không thật chặt và không thống nhất. Ngoài những hạn chế của các nghiên cứu, thì trên thực tế cũng vô cùng khó khăn để tìm thấy những tác động rất nhỏ của một yếu tố gen đứng riêng rẽ, trong bối cảnh có nhiều gen trong các con đường tín hiệu khác nhau, đan xen, kim hãm, điều hoà và cùng có thể tác động lên quá trình hình thành khối u gan. Ngoài ra yếu tố gen còn trở nên bé nhỏ hơn, trong sự tác động liên tục, mạnh mẽ của vô số các yếu tố nguy cơ từ môi trường lên cơ thể con người [60],[61],[62],[63].

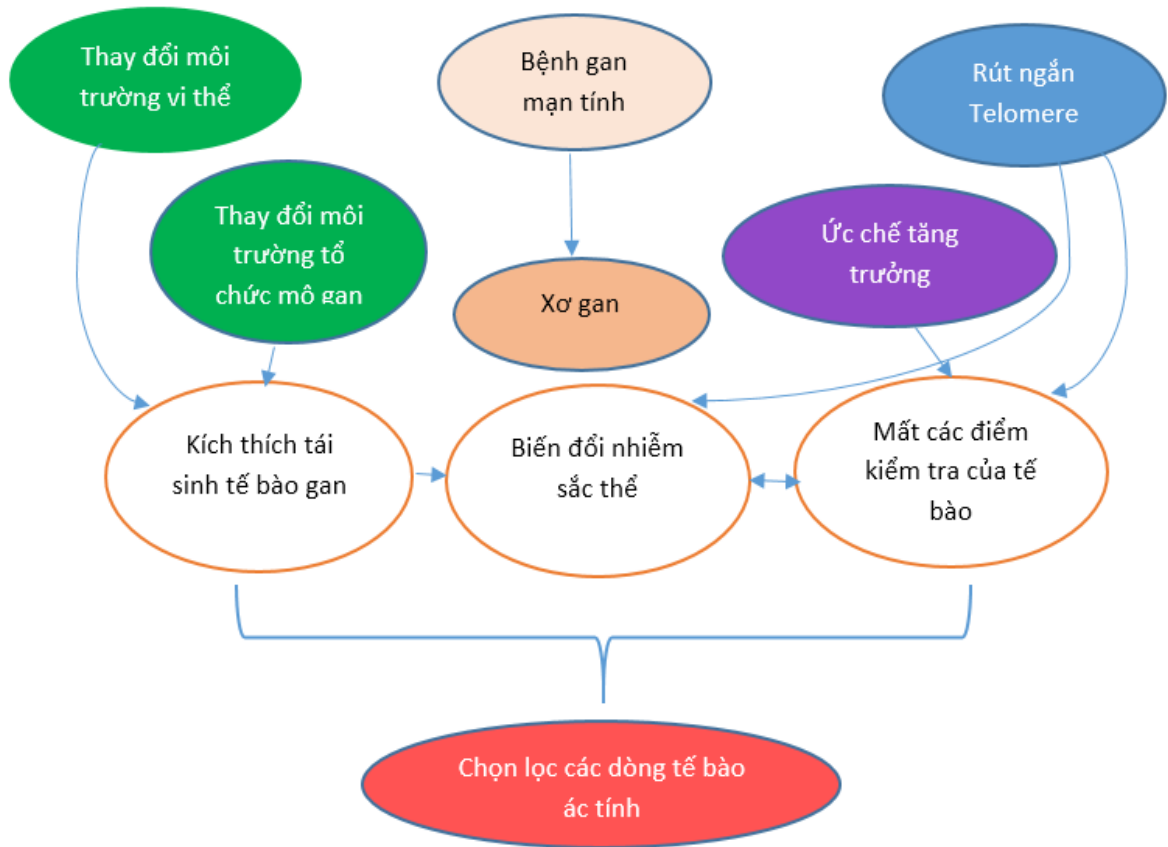
Cũng giống như nhiều bệnh lý ung thư khác, tuy không được như kỳ vọng ban đầu, lúc mới tiếp cận với hướng nghiên cứu các đa hình kiểu gen liên quan ung thư tế bào gan nguyên phát, nhưng những kết quả đạt được đã góp phần làm sáng tỏ cơ chế phân tử của căn bệnh này.

1.1.3.2. Các cơ chế phát sinh ung thư tế bào gan nguyên phát

Các nghiên cứu dịch tễ gen đã đồng thuận một kết quả, hầu hết UTTBGNP tiến triển qua giai đoạn phá huỷ mạn tính tổ chức gan. Nhưng vẫn có một số rất ít các trường hợp tiến triển từ các tế bào gan khoẻ mạnh trong một quá trình lão hoá bình thường. Điều này đòi hỏi bắt buộc phải có sự liên quan đến phân chia tế bào. Hoạt động phân chia tế bào như là một sự trao quyền thừa kế các “tài sản thiết yếu” nhằm tạo ra các tế bào mới

hoàn toàn xa lạ. Lý thuyết này đã được chứng minh bởi nghiên cứu cơ chế ung thư gan trên loài gặm nhấm, liên quan đến phân chia tế bào, bị kích thích sau khi cắt bỏ một phần gan của chúng [64]. Tuy nhiên tỷ lệ của các trường hợp trên là rất ít, dẫn đến lý thuyết này khó có thể trở thành cơ chế chính của sự phát sinh ung thư tế bào gan. Thực tế có một tần suất cao hơn rất nhiều những biến đổi nhiễm sắc thể, được tích tụ trong UTTBGNP [65].

Hầu hết các trường hợp UTTBGNP đều tiến triển qua thời gian dài phá huỷ gan mạn tính (20-40 năm). Nhưng nguy cơ ung thư chỉ đột ngột tăng lên khi gan chuyển sang bệnh cảnh xơ hoá các tiểu thùy. Để nắm bắt cơ chế phân tử của UTTBGNP bắt buộc phải giải thích được tại sao nguy cơ ung thư lại tăng lên khi tiến triển đến bệnh cảnh xơ gan. Điều thú vị là tế bào gan tăng tái sinh trong giai đoạn viêm mạn tính nhưng lại giảm rất nhiều khi đến giai đoạn xơ gan. Giải thích cho hiện tượng này là sự kiệt sức của gan khi bắt đầu chạm tới giai đoạn xơ gan [66]. Có ba cơ chế chính, được tổng kết lại cho đến thời điểm hiện tại, đã được sự đồng thuận rộng rãi của các nhà khoa học (hình 1.2).



Hình 1.2. Cơ chế phân tử của ung thư tế bào gan nguyên phát

Nguồn: Gastroenterology năm 2007, số 132.

Ba cơ chế chính gây ung thư gan được phân chia thành trong tế bào và ngoài tế bào. 1) Trong tế bào là sự rút ngắn telomere và ức chế tăng trưởng của tế bào gan. Cả hai đều dẫn đến sự chọn lọc các tế bào mất điểm kiểm tra (chu kỳ tế bào, chết theo chương trình...). Ngoài ra rút ngắn telomere còn gây biến đổi nhiễm sắc thể. 2) Ngoài tế bào chính là sự thay đổi các điều kiện môi trường bao quanh tế bào gan. Chúng là các yếu tố dịch thể, các sản phẩm chuyển hoá và thay đổi cấu trúc nhu mô gan. Những thay đổi các điều kiện này trong bệnh cảnh xơ gan sẽ kích thích tái sinh tế bào gan mạnh mẽ, trong khi đang mang những khiếm khuyết nhiễm sắc thể (NST). Điều này làm tăng cơ hội cho những dòng tế bào ác tính được chọn lọc.

Rút ngắn Telomere (Telomere shortening). Telomere là các cấu trúc đặc thù nằm ở đầu tận của nhiễm sắc thể. Đây là những đoạn trình tự lặp lại ngắn (TTAGGG). Khoảng 1000-2000 đoạn liên nhau. Không mã hoá và rất cần thiết cho sự ổn định của hệ gen. Chúng bảo vệ NST trong quá trình phân bào và giữ cho NST không bị dính vào nhau. Telomere được ví như những cái nắp đậy của NST. Sau mỗi lần phân chia tế bào telomere lại bị ngắn đi (đủ cho 30-50 lần). Điều này sẽ giới hạn số lần phân bào hay chính là quá trình lão hoá tự nhiên của cơ thể. Chỉ có trong các dòng tế bào gốc telomere mới không bị ngắn đi [67],[68].

Trong quá trình phá huỷ tế bào gan mạn tính telomere bị ngắn đi nhanh chóng do nhu cầu tái sinh của tế bào gan. Qua thời gian telomere bị rút ngắn, đến bệnh cảnh xơ gan, các tiểu thùy bắt đầu già hoá do telomere đã ngắn tới hạn [69]. Khi các telomere ngắn tới hạn, nguy cơ mất mát gen tại các đầu tận của NST sẽ kích hoạt các dòng tín hiệu cảnh báo DNA bị hư hỏng. Các cơ chế bảo vệ lập tức được kích hoạt, như dừng chu kỳ phân bào, lão hoá, chết theo chương trình... [70], [71].

Telomere không còn thực hiện được chức năng, không những kích hoạt các con đường tín hiệu sửa chữa DNA mà còn dẫn đến các NST bị dính vào nhau. Khi tế bào phân chia, hiện tượng dính NST sẽ có thể gây ra đa bội NST, mất NST, chuyển đoạn NST cho những tế bào mới [72]. Đây là nguồn gốc của các tế bào ung thư. Lý thuyết này đã được củng cố bằng một nghiên cứu thực nghiệm trên chuột. Khối u gan xuất hiện sớm hơn trên những con chuột có telomere ngắn hoặc thiếu telomere [73]. Những bằng chứng đưa ra một suy đoán hết sức thuyết phục là suy giảm hay mất chức năng của telomere đã làm biến đổi NST trong xơ gan và bắt đầu khởi phát cho quá trình ung thư hoá tế bào gan [74]. Minh chứng cụ thể cho suy đoán này, là những tế bào gan bị ung thư đều có các telomere bị rút ngắn tới hạn

[75],[76]. Một nghiên cứu khác đã đưa ra các kết quả hết sức thú vị, cũng bổ sung cho lý thuyết rút ngắn telomere, đó là phát hiện có sự tăng tỷ lệ tế bào dị bội NST trong tổ chức ung thư gan [77].

Khiếm khuyết tăng sinh tế bào. Ức chế và suy giảm tăng trưởng tế bào gan ở giai đoạn xơ gan, bản thân nó có thể làm tăng nguy cơ hình thành ung thư. Có một số nghiên cứu đã có kết quả phù hợp với giả định này. Sau khi tiêm hóa chất ức chế tế bào gan tăng sinh, các nhà nghiên cứu đã phát hiện sự tăng tốc hình thành khối u gan ở chuột [78]. Tương tự như vậy, ung thư bạch cầu ở chuột đã được thúc đẩy nhanh trong bối cảnh ức chế chu kỳ phân chia của các tế bào tạo máu tuỷ xương [79]. Tế bào gan tăng sinh mạnh mẽ trong suốt quá trình viêm mạn tính, nhưng sụt giảm hoàn toàn khi chuyển xơ gan. Hiện tượng này được giải thích bởi sự suy kiệt của tế bào trong bệnh cảnh xơ gan. Ngoài ra trong một nỗ lực kiểm soát sự ổn định di truyền, các điểm kiểm tra tế bào được bật lên. Trong đó có các điểm kiểm tra dừng chu kỳ tế bào, ức chế chu kỳ tế bào thậm chí gây chết tế bào theo chương trình. Các điểm kiểm tra này duy trì một môi trường ức chế tăng trưởng. Tuy nhiên những điều kiện ức chế tăng trưởng khắc nghiệt này lại tạo ra một sự chọn lọc tự nhiên các dòng tế bào có khả năng tồn tại và phân chia mạnh mẽ. Đó là các dòng tế bào bị mất các điểm kiểm tra (check points). Đó chính là các dòng tế bào ác tính [55].

Phù hợp với lý thuyết này là hiện tượng tăng biểu hiện một cách tương quan của protein p21 với nguy cơ ung thư tế bào gan nguyên phát ở những bệnh nhân xơ gan [80]. Protein P21 là mục tiêu đầu tiên của p53, để kích hoạt ngưng chu kỳ tế bào và quá trình già hoá tế bào gan, nhằm phản ứng lại với telomere ngắn lại [81]. P53 lại là một trong những điểm kiểm tra quan trọng nhất của phân chia tế bào.

Ngoài ra hiện tượng telomere ngắn lại trong quá trình xơ gan cũng góp phần gây ra khiếm khuyết tăng sinh tế bào gan. Điều này được minh chứng bằng sự xuất hiện của CCAAT/ enhancer binding protein- α trong tế bào gan chuột lão hoá. Đây là một trong 6 loại yếu tố phiên mã. Chúng có thể làm chậm lại quá trình tăng sinh tế bào gián tiếp qua yếu tố kích hoạt sao chép (E2F) [82]. Sự suy giảm tái sinh tế bào gan do lão hoá phù hợp với hiện tượng tăng tốc tiến trình xơ hoá gan ở những bệnh nhân lớn tuổi bị viêm mạn tính [83].

Thay đổi các điều kiện môi trường. Thay đổi các điều kiện môi trường vi thể (microenvironment) hay môi trường cấu trúc tổ chức nhu mô gan (macroenvironment), góp phần gây UTTBGNP trong bệnh cảnh xơ gan.

Sự phục hồi tổ chức nhu mô gan được quy định rất chặt chẽ. Trên mô hình chuột, người ta thấy tế bào gan ngừng tăng sinh rõ rệt khi cấu trúc mô gan hoàn toàn bình phục. Cũng giống ở người, những bệnh nhân sau khi ghép gan sẽ có gan mới có kích thước phù hợp với bản thân, sau một quá trình tái sinh của tế bào gan. Cơ chế của sự kiểm soát này còn chưa được rõ. Không giống như tụy, cấu trúc và kích cỡ tổ chức nhu mô gan không được quy định bởi các tín hiệu từ dòng tế bào gốc [84]. Những phát hiện này gợi ý một khả năng, kích thước và cấu trúc nhu mô gan được quy định bởi một sự kiểm soát đan xen, tương hỗ của nhiều yếu tố tăng trưởng (growth factors). Sự tương tác theo kiểu điều hoà ngược (feed back) giữa các yếu tố tăng trưởng và sự tăng sinh tế bào, đã quy định quá trình tăng trưởng và định hình cấu trúc nhu mô gan. Dẫn đến một hệ quả là, khi gan bị mất đi một phần (mổ cắt gan) hay suy giảm chức năng (xơ gan) sẽ tạo ra một môi trường (macroenvironment) kích thích tăng trưởng tế bào gan. Đây cũng là một lý do hợp lý nữa để phát sinh ung thư trong bệnh cảnh xơ gan [55].

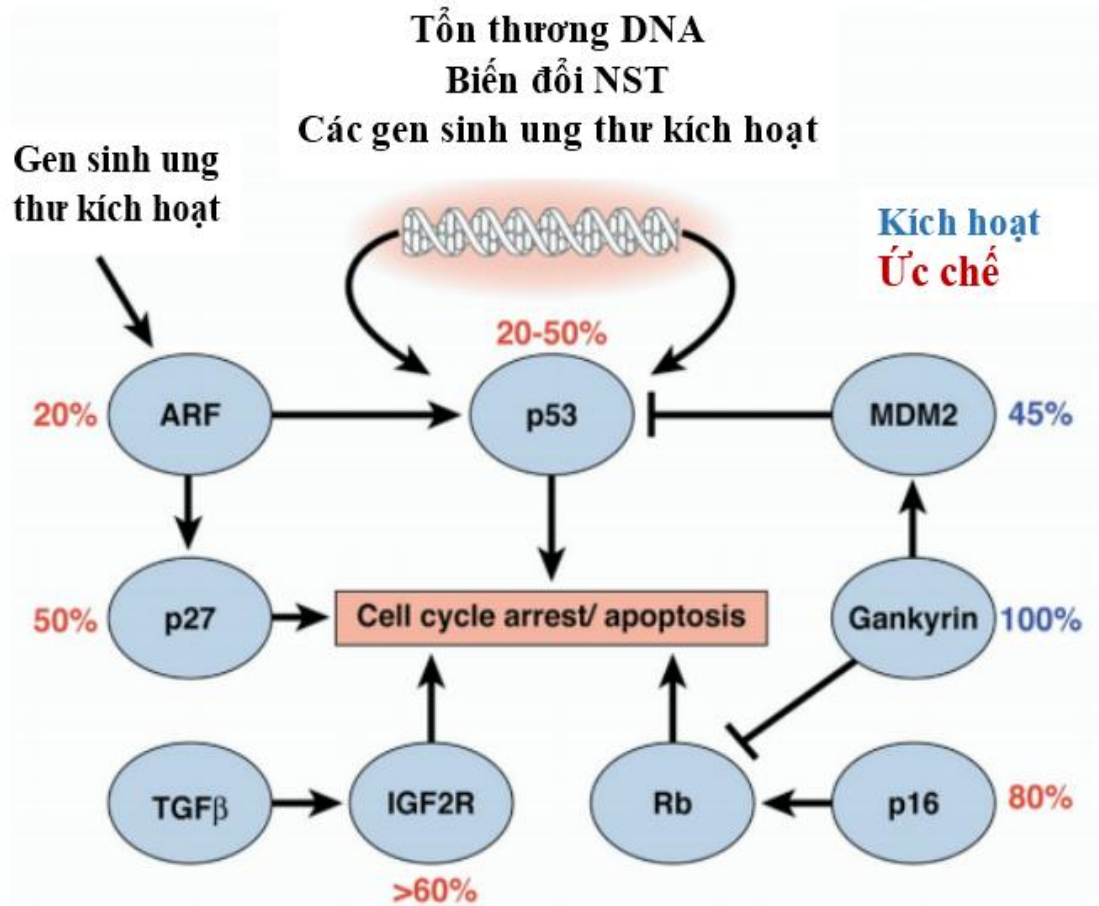
Xơ gan đồng thời cũng thay đổi môi trường vi thể (microenvironment) tại gan. Điều này tác động rất lớn đến sự biến đổi ung thư hoá. Một điểm nổi bật là quá trình xơ gan thường kích hoạt các tế bào hình sao. Kết quả làm tăng sự tổng hợp các protein ngoại bào: các cytokin, yếu tố tăng trưởng, các sản phẩm của quá trình oxy hoá [85]. Rất nhiều trong các thành phần này, được cho là có thể tác động đến tái sinh tế bào gan. Tái sinh những tế bào gan có khiếm khuyết lại chính là chọn lọc các tế bào ung thư [86]. Hơn nữa, phản ứng viêm gây ra bởi hệ thống miễn dịch trong quá trình viêm gan, có thể ảnh hưởng đến sự tiến trình ung thư tế bào gan. Phù hợp với nhận định trên, một nghiên cứu thực nghiệm trên chuột đã cho thấy, khi gỡ bỏ ức chế của dòng tín hiệu cytokine-3 (SOCS3), một điều hoà âm tính của interleukin-6, một chất sinh ra trong viêm gan, đã gây ra khối u gan [87]. Ngoài ra, người ta còn cho rằng, những dấu ấn miễn dịch của môi trường vi thể tại gan có sự tương quan với di căn, tái phát và rất có giá trị trong tiên lượng bệnh UTTBGNP [88].

1.1.3.3. Biến đổi phân tử trong ung thư tế bào gan nguyên phát

Với ba cơ chế phân tử, rút ngắn telomere, khiếm khuyết tăng sinh và thay đổi các điều kiện môi trường, đã chỉ ra các con đường chủ yếu dẫn đến ung thư tế bào gan. Mỗi cơ chế đều đưa ra cách thức gây ra biến đổi dẫn đến ung thư. Tuy nhiên những biến đổi cụ thể ở cấp độ phân tử là gì? Hay hậu quả của những cơ chế tác động này sẽ ra sao, để từ đó làm xuất hiện tế bào ung thư gan. Dưới đây là bốn biến đổi phân tử chính.

Mất các điểm kiểm tra chu kỳ tế bào. (Loss of Cell-Cycle Checkpoints). Rút ngắn telomere và mất các điểm kiểm tra chu kỳ phân bào dẫn đến khiếm khuyết trong sự tái sinh tế bào, được cho là các sự kiện xảy ra ở bệnh cảnh xơ gan [66],[69]. Vô hiệu hoá các điểm kiểm tra sẽ tạo cơ hội các dòng tế bào bất thường về di truyền được chọn lọc. Đây là cơ chế nổi

bật nhất trong sự biến đổi phân tử của UTTBGNP. Một số điểm kiểm tra chu kỳ tế bào quan trọng nhất được giới thiệu (hình 1.3).



Hình 1.3. Một số điểm kiểm tra chu kỳ tế bào và điểm kiểm tra chết theo chương trình, thường bị mất trong ung thư tế bào gan nguyên phát.

Nguồn: Gastroenterology năm 2007, số 132.

P53, MDM2. Con đường tín hiệu p53 là dòng tín hiệu ức chế khối u quan trọng nhất của con người. Với nhiều chức năng quan trọng. Một là giới hạn sự sống sót và sự tăng sinh của tế bào, để đáp ứng lại sự rút ngắn telomere [70]. Hai là gây dừng chu kỳ tế bào khi phát hiện tín hiệu từ các gen sinh ung thư (tín hiệu tăng trưởng bất thường) [89]. Ba là bảo vệ sự

toàn vẹn của bộ gen tế bào thông qua sửa chữa DNA hoặc gây apoptosis khi không thể khắc phục.

Những bằng chứng liên quan của con đường tín hiệu p53 với UTTBGNP được tìm thấy ở nhiều nghiên cứu khác nhau. Đầu tiên phải kể đến tỷ lệ đột biến gen TP53 xảy ra khi phơi nhiễm với aflatoxin trong những bệnh nhân ung thư gan. Tỷ lệ đột biến gen TP53 > 50% trường hợp có phơi nhiễm, nhưng chỉ 20-40% đối với các bệnh nhân không có phơi nhiễm với aflatoxin [44],[90]. Một nghiên cứu khác cho thấy, sự tăng biểu hiện của MDM2 (yếu tố điều hoà ngược âm tính của p53) được phát hiện trong UTTBGNP. MDM2 tăng biểu hiện sẽ ức chế p53, mất khả năng “điểm kiểm soát chu kỳ tế bào” và chức năng apoptosis [91]. Trong nghiên cứu thực nghiệm trên chuột, người ta đã chứng minh rằng, gián tiếp qua sự lão hóa, p53 đã phản ứng lại với các tín hiệu từ sự rối loạn chức năng của telomere trong tế bào gan [92]. Ngoài ra, khi xoá bỏ hoàn toàn chức năng của p53, đã gây bất ổn NST nghiêm trọng và hình thành ung thư biểu mô tế bào gan cho những con chuột bị khiếm khuyết chức năng telomere [72]. Những bằng chứng dường như đang chỉ ra một khả năng, khi mất chức năng “điểm kiểm soát” của p53 ở bệnh cảnh xơ gan, sẽ tạo ra một cơ hội cho sự nhân lên và mở rộng các tế bào gan có khiếm khuyết telomere. Điều này dẫn đến hậu quả tất yếu là bất ổn NST và khởi động tiến trình ung thư tế bào gan. Củng cố cho nhận định này, người ta đã phát hiện p21 (một protein đích trong dòng tín hiệu p53). Protein này tăng cường biểu hiện trong giai đoạn xơ gan nhưng lại giảm thậm chí mất hoàn toàn trong các tế bào gan ác tính [76].

Rb/p16, cũng là một điểm kiểm tra quan trọng khác của cơ thể con người. Cũng giống như p53, điểm kiểm tra Rb/p16 là một con đường tín

hiệu, giới hạn sự tăng sinh của tế bào nhằm phản ứng lại sự rút ngắn telomere, hư hỏng DNA và các tín hiệu bất thường từ những gen sinh ung thư (oncogene) [70],[89]. Trong UTTBGNP ở người, dòng chảy tín hiệu Rb bị đứt gãy đến khoảng 80% trường hợp. Hay gặp nhất là sự ức chế của p16 bởi hiện tượng methyl hoá vùng kích hoạt sao chép [93]. Ngoài ra, sự biểu hiện của gankyrin (một yếu tố ức chế của điểm kiểm tra p53 và Rb), được tăng cường trong mô ung thư gan [94]. Các bằng chứng cho thấy một thực tế, chức năng “điểm kiểm tra” của Rb/p16 bị suy giảm hoặc mất trong ung thư tế bào gan. Chính điều này, đã cho phép nhân lên các tế bào gan có khiếm khuyết telomere trong bệnh cảnh xơ gan. Củng cố cho lý thuyết trên, người ta thấy có sự tăng biểu hiện của p16 trong xơ gan, nhưng suy giảm rõ rệt trong các tế bào gan ác tính [76].

IGF2R (Thụ thể yếu tố tăng trưởng giống insulin 2). Mất dị hợp tử tại locus IGF2R trên NST 6 rất thường gặp (60%) trong UTTBGNP [95]. Trong điều kiện bình thường, IGF2R làm suy giảm sự tăng sinh của tế bào bằng cách làm suy yếu tác động của IGF2 lên quá trình nguyên phân và kích hoạt con đường tín hiệu của yếu tố tăng trưởng β [96]. Cũng như các checkpoints khác, khi mất chức năng “điểm kiểm tra” của IGF2R, sẽ tạo ra cơ hội nhân lên của các tế bào gan khiếm khuyết di truyền, trong giai đoạn xơ gan. Một điều thú vị là gen IGF2R nằm trên vùng giáp danh với telomere của đầu nhánh ngắn NST số 6. Điều này cho phép nhận định rằng sự mất dị hợp tử tại locus IGF2R có liên quan đến hiện tượng rút ngắn telomere [97].

Kháng apoptosis. Tần xuất bất hoạt điểm kiểm tra p53 xảy ra nhiều trong UTTBGNP gợi ý một khả năng có sự suy yếu đáng kể đặc tính chết theo chương trình (apoptosis) phụ thuộc p53 của tế bào gan. Điều này có

thể đưa tới sự khởi động tiến trình biến đổi ung thư hoá. Củng cố cho nhận định này, người ta phát hiện sự biểu hiện quá mức của HSCO (một yếu tố ức chế apoptosis phụ thuộc p53), với tần xuất cao trong các tế bào gan ung thư [98]. Ngoài ra, apoptosis không phụ thuộc p53, trong điều kiện bình thường được kích hoạt để phản ứng lại với hiện tượng rút ngắn telomere, cũng suy giảm trong ung thư tế bào gan [70],[99]. Nhận định này được minh chứng qua Hint2 (một chất nhạy cảm với apoptosis, biểu hiện ở ty thể). Chất này suy giảm nhiều trong UTTBGNP. Không những thế, Hint2 còn tương quan với một tiên lượng xấu cho bệnh nhân ung thư tế bào gan [100].

Con đường tín hiệu yếu tố tăng trưởng β , được kích hoạt ở bệnh cảnh xơ gan. Khi dòng tín hiệu này được kích hoạt sẽ gây ra apoptosis bằng sự kiểm soát Smad3-mediated (BCL2). Đây là một protein thuộc các thành tố ức chế quá trình chết theo chương trình (apoptosis) [101]. Tuy nhiên, vẫn cần thêm những bằng chứng để lý giải tại sao tế bào gan trốn tránh được sự kích hoạt con đường này trong cả một thời kỳ xơ gan, phải chăng có liên quan đến sự suy giảm các tín hiệu tăng trưởng của IGF2R? Kháng apoptosis trong UTTBGNP có thể liên quan đến con đường tín hiệu insulin (IGF2) và sự kích hoạt dòng tín hiệu Akt [102].

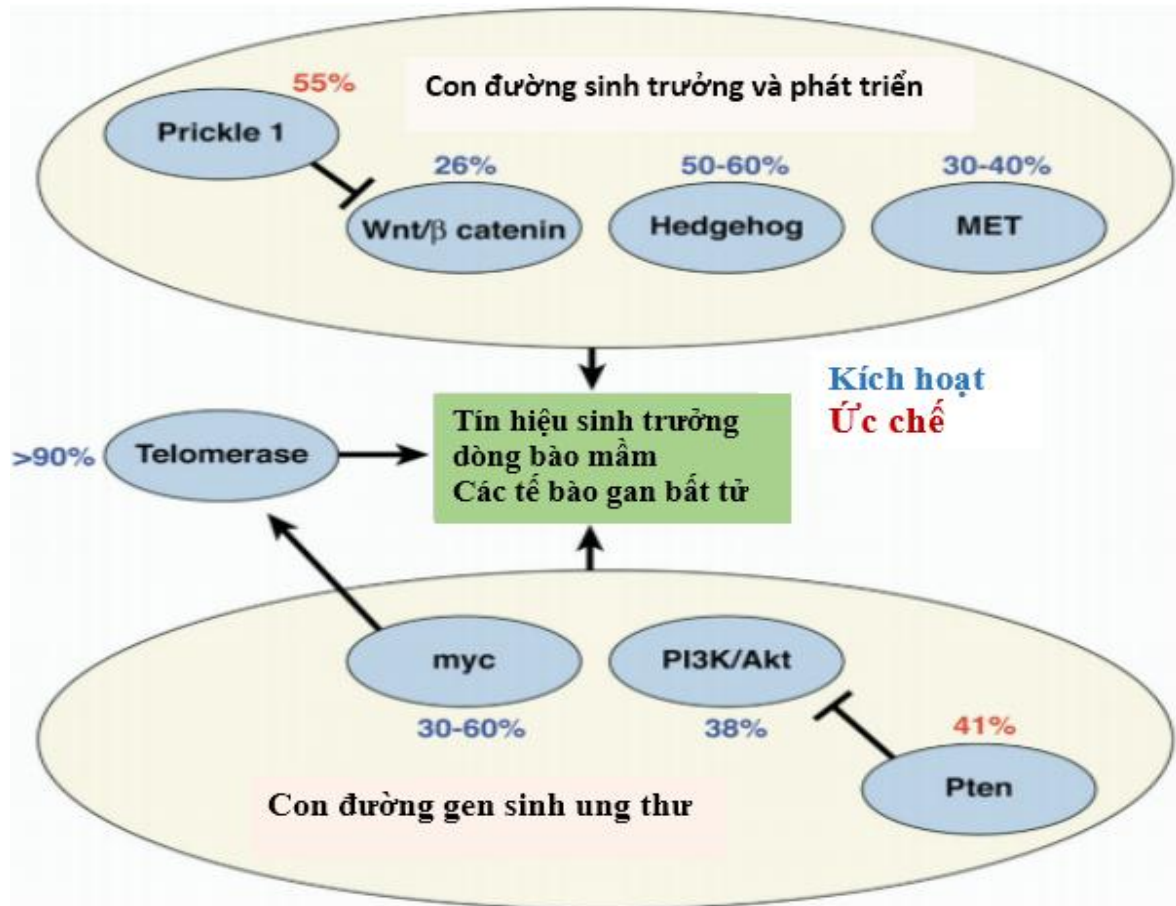
Kích hoạt gen sinh ung thư (oncogene). Kích hoạt các gen sinh ung thư là những biến đổi thường gặp trong ung thư. Tuy nhiên tiến trình khởi động các tín hiệu oncogene giữa các loại ung thư không giống nhau. Trong ung thư tế bào gan mọi thứ diễn ra muộn hơn. Điều này có thể được giải thích, do UTTBGNP có là hậu quả của những biến đổi NST, gây ra bởi sự rút ngắn telomere và khiếm khuyết “điểm kiểm tra” xảy ra trong suốt giai đoạn xơ gan. Có một số oncogene thường gặp trong ung thư tế bào gan nguyên phát, được trình bày ở hình 1.4. Được chia làm hai nhóm: nhóm là

các yếu tố liên quan đến sự phát triển và biệt hoá tế bào gan và nhóm chỉ đơn thuần gây ung thư.

Wnt/ β -catenin là một dòng tín hiệu phát triển tế bào, liên hệ một cách chặt chẽ, trong suốt thời gian sơ khai của của tiến trình phát triển và biệt hoá tế bào gan [103]. Kích hoạt con đường Wnt/ β -catenin được phát hiện với tần xuất cao trong ung thư gan ở chuột khi có đột biến tế bào sinh dưỡng (somatic mutations) [104]. Nghiên cứu thực nghiệm trên mô hình chuột cho thấy, khi người ta xoá bỏ những mục tiêu đích tại gan của gen APC (adenomatosis polyposis coli), sau đó kích hoạt con đường tín hiệu β -catenin sẽ gây ra ung thư tế bào gan ở chuột [105]. Những con đường phát triển khác, liên quan đến UTTBGNP còn phải kể đến hedgehog và MET (c-met proto-oncogene/hepatocyte growth factor receptor) [106],[107]. Sự kích hoạt của các con đường phát triển sơ khai, đưa ra gợi ý rằng, có một tỷ lệ ung thư tế bào gan xuất hiện từ những tế bào gốc gan (liver stem cells). Tế bào gan bình thường không cần các tế bào gốc để tăng trưởng, bởi vì tế bào gan sinh dưỡng vẫn duy trì khả năng quay lại chu kỳ phân bào. Một môi trường ức chế tăng trưởng như trong bệnh cảnh xơ gan, có thể dẫn đến kích hoạt và biến đổi các tế bào gốc gan. Một số nghiên cứu đầu tiên, đã cung cấp những bằng chứng cho thấy sự tồn tại quần thể tế bào gốc trong UTTBGNP [108],[109]. Ngoài ra, người ta còn phát hiện sự biểu hiện của gen tế bào gốc trong các mô UTTBGNP [110].

PI3K/Akt là dòng tín hiệu mang đầy đủ đặc tính oncogene. Sự kích hoạt của con đường Akt và khiếm khuyết biểu hiện của phosphatase và tensin homolog (PTEN) (một điều hoà âm tính của Akt) được phát hiện trong 40%–60% trường hợp UTTBGNP [111]. Kích hoạt con đường tín hiệu Akt sẽ ức chế sự tác động của yếu tố tăng trưởng β , gây chết theo

chương trình và gây ức chế các hoạt động tăng trưởng của yếu tố phiên mã CCAAT/enhancer binding protein α . Cả hai ảnh hưởng này đều có thể kích hoạt quá trình biến đổi ung thư trong giai đoạn xơ gan. Người ta đã phát hiện sự liên kết giữa sự kích hoạt con đường Akt với sự kích hoạt dòng tín hiệu β -catenin ở tế bào gốc ruột [112].



Hình 1.4. Oncogene thường gặp nhất trong ung thư tế bào gan nguyên phát

Nguồn: Gastroenterology năm 2007, số 132.

Myc là một gen sinh ung thư rất mạnh, đã gây được UTTBGNP trên mô hình chuột. Khả năng gây UTTBGNP của Myc phụ thuộc vào sự kích hoạt liên tục của gen sinh ung thư [113]. Tuy nhiên các dữ liệu trên ung thư gan ở người còn chưa đồng nhất, cần nhiều hơn nữa các nghiên cứu tiếp theo. Một nghiên cứu sớm nhất về Myc trong UTTBGNP đã cho thấy một

sự tương quan giữa sự kích hoạt Myc và kích cỡ khối u, cũng như khả năng tiên lượng bệnh [114]. Một trong những cơ chế kích hoạt Myc là sự khuếch đại locus Myc trên NST. Sự khuếch đại này lại được gây ra bởi rút ngắn telomere và khiếm khuyết các điểm kiểm tra [115]. Chứng minh cho giả thuyết trên, một nghiên cứu trên mô hình chuột đã ghi nhận, khi tăng số bản copy của NST 15, vùng chứa Myc, làm tăng tần xuất ung thư gan lên một cách rõ rệt ở những con chuột có đột biến p53 và telomere bị rút ngắn [99].

Rất nhiều những nghiên cứu về cơ chế phân tử UTTBGNP, đưa ra sự giống nhau tương đối giữa trên mô hình chuột và ở người. Sự so sánh thú vị giữa các loài sẽ rất hữu ích trong việc tiếp tục phát hiện các gen sinh ung thư và gen ức chế ung thư. Ngoài ra, các thái cực biểu hiện của gen đem đến một hướng tiếp cận rất thuyết phục để giải mã cơ chế phân tử của ung thư tế bào gan.

Tế bào ung thư bất tử. Đây là đặc điểm nổi bật của tế bào ung thư, là hậu quả của những biến đổi phân tử trong tiến trình ung thư hoá. Người ta thấy rằng, hơn 90% các tế bào gan ác tính có sự kích hoạt telomerase, và tăng cường tổng hợp các đoạn telomere [116]. Telomerase là một ribonucleoprotein có vai trò tổng hợp các đoạn lặp lại telomere đã bị mất đi trong mỗi lần phân bào. Telomerase có bản chất là một enzym phiên mã ngược, bởi vì nó tổng hợp DNA từ khuôn RNA. Telomerase được kích hoạt sẽ tổng hợp kéo dài các đoạn telomere, đảm bảo telomere không ngắn đi. Đây là điều kiện cần để tế bào bất tử, do các tín hiệu kích hoạt lão hoá và chết tế bào, từ sự rút ngắn telomere không còn nữa. Bất tử là một đặc điểm dễ nhận thấy nhất của các tế bào ung thư trong đó có tế bào gan. Khi nghiên cứu trên các dòng tế bào gốc người ta đã thấy rằng, telomerase là một cấu phần thiết yếu cho sự nhân lên không giới hạn của các stem cells [117]. Ở gan người bình thường telomerase bị bất hoạt, nhưng nó bắt đầu được hoạt

hoá trong những vùng tổn thương tiền ung thư [116]. Các dữ liệu nghiên cứu thực nghiệm trên chuột cho thấy, telomere ngắn lại sẽ khởi động tiến trình ung thư gan, nhưng việc thiếu hay mất hoàn toàn telomerase lại làm ngừng tiến trình ác tính các tổ chức tổn thương tiền ung thư [73]. Một lý thuyết phù hợp với thực tế trên, đó là sự có mặt của telomerase rất cần thiết để nói không với khiếm khuyết chức năng telomere và phòng ngừa sự tích tụ biến đổi NST cũng như hư hại gen. Những biến đổi đủ để gây ung thư gan độc lập với sự kiểm soát từ con đường p53 [99],[118].

1.2 GEN TP53 VÀ MDM2

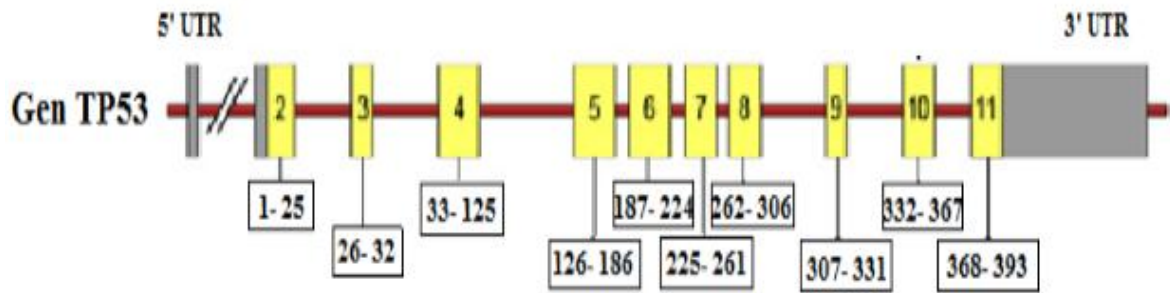
Gen TP53 và MDM2 là một trong những điểm kiểm tra tế bào quan trọng nhất trong cơ chế bệnh sinh của UTTBGNP.

1.2.1. Gen áp chế ung thư TP53

Gen TP53, được phát hiện đầu tiên vào năm 1979 bởi Crawford và cộng sự tại trường đại học Princeton, Dundee, Vương quốc Anh [119]. Gen mã hoá cho phân tử protein p53. Là nhạc trưởng trong con đường tín hiệu p53. Mang đầy đủ các đặc tính sinh học của con đường tín hiệu p53. TP53 được xem là gen ức chế khối u quan trọng nhất của cơ thể con người.

1.2.1.1. Cấu trúc

Ở người, gen TP53 nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể số 17 (17p13.1). Đây là vùng có tần xuất đột biến cao trong ung thư. Gen TP53 có kích thước 22000 bp, bao gồm 11 exon và 10 intron. Các exon từ E1 đến E11, trong đó E1 không mã hóa, quá trình phiên mã bắt đầu từ exon 2 đến exon 11. Vùng không mã hoá thứ nhất (intron1) có kích thước rất lớn khoảng 10kb. Vùng có sự tương đồng nhiều nhất giữa các loài có vú là exon 2,5,6,7 và 8. Được gọi là tumor protein 53 vì phân tử protein có trọng lượng 53 kDa.



Hình 1.5. Cấu trúc phân tử gen TP53

Nguồn: Nature review cancer số 4, năm 2004

- Vùng màu vàng là vùng mã hoá (exon 2-11).
- Vùng màu xám là vùng không được dịch mã UTR (untranslated region).

Gen TP53 mã hóa cho phân tử protein p53 có trọng lượng 53 kDa, bao gồm 393 acid amin với 3 vùng chức năng khác nhau [120] (hình 1.6).

- Vùng hoạt hóa N tận (NH₂-terminal acidic transactivation domain TA) bao gồm:

+ Vùng amin tận (1-42): vùng này cần thiết cho hoạt động sao chép và tương tác với MDM2 (murine double minute 2).

+ Vùng giàu prolin (61-94): liên quan đến chức năng pro-apoptosis và có vai trò điều hòa hoạt động p53. Khi vùng này bị xóa bỏ sẽ dẫn đến mất hoàn toàn chức năng pro-apoptosis của p53.

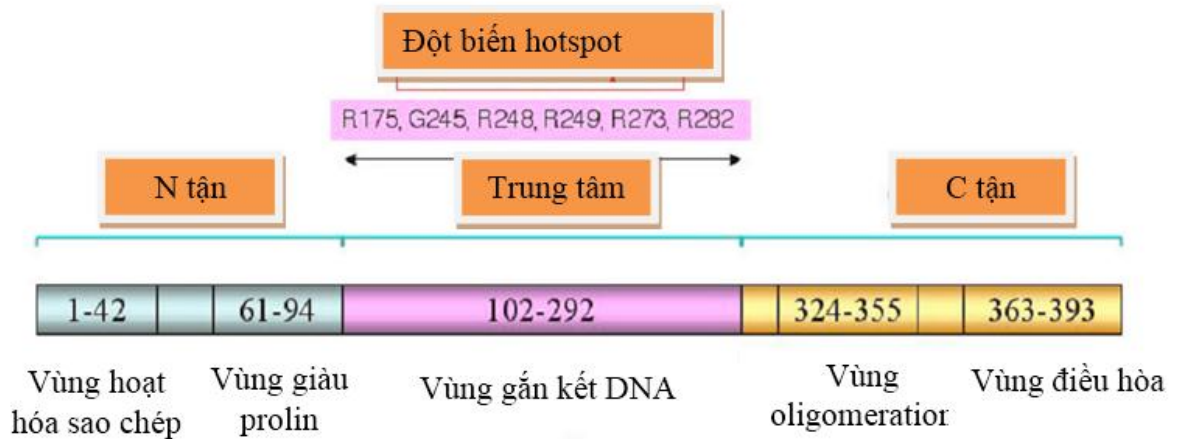
- Vùng gắn kết DNA (DNA-binding domain DB) gồm các acid amin từ 102-292 và gắn kết các DNA có trình tự đặc biệt.

- Vùng C tận (COOH-terminal oligomerization domain OD) bao gồm:

+ Vùng oligomerization (324-355) tạo cấu trúc bậc 4 của p53.

+ Vùng điều hòa nhóm carboxyl tận (363-393) có vai trò điều hòa xuôi dòng sự gắn kết DNA với vùng trung tâm và liên quan đến apoptosis. Nếu sự tương tác giữa vùng C tận và vùng gắn DNA bị phá vỡ thì vùng gắn DNA tổn thương sẽ hoạt hóa và gây tăng quá trình phiên mã.

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



Hình 1.6. Cấu trúc phân tử protein p53

Nguồn: Nature review cancer số 4, năm 2004

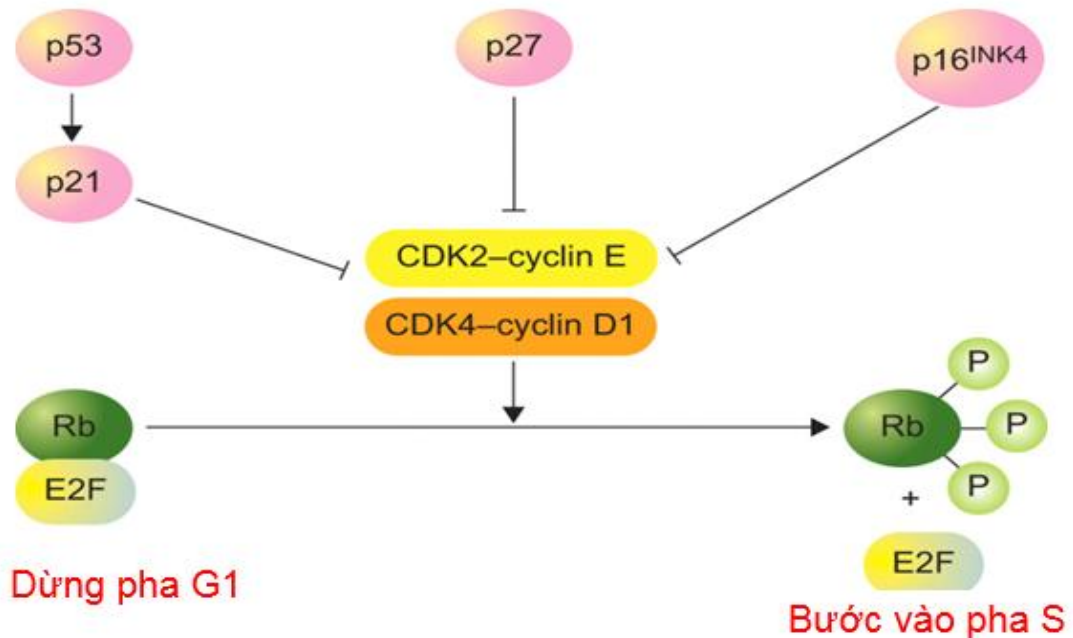
1.2.1.2. Chức năng của TP53

Gen TP53 có vai trò quan trọng trong kiểm soát sự phân chia và chết theo chương trình của tế bào (apoptosis). Khi các tổn thương gen xảy ra, 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, p53 được xem như trạm gác của bộ gen tế bào (guardian genome) [10],[11] [12]. Ngoài ra, p53 còn có khả năng hoạt hóa hoặc ức chế một loạt gen khác trong con đường tín hiệu p53 để đảm bảo sự ổn định của tế bào [11].

Kiểm soát chu kỳ tế bào.

Gen TP53 có thể gây dừng chu kỳ tế bào ở pha G1/S và G2/M bằng cách tác động đến các gen kiểm soát chu kỳ phân chia tế bào như GADD 45 (Grow arrest and DNA-damage-inducible protein 45), p21 và 14-3-3δ. Sự dừng chu kỳ tế bào giúp tế bào có thời gian sửa chữa tổn thương DNA trước khi bước vào giai đoạn quan trọng của sự tổng hợp DNA và nguyên phân.

Chu kỳ tế bào bước vào pha S cần enzym cdk2 và vào pha M cần cdc2. Enzym cdk2 có thể bị ức chế bởi p21 và cdc2 có thể bị ức chế bởi p21, GADD45, 14-3-3δ.



Hình 1.7. Cơ chế dừng chu kỳ tế bào của p53 qua trung gian p21

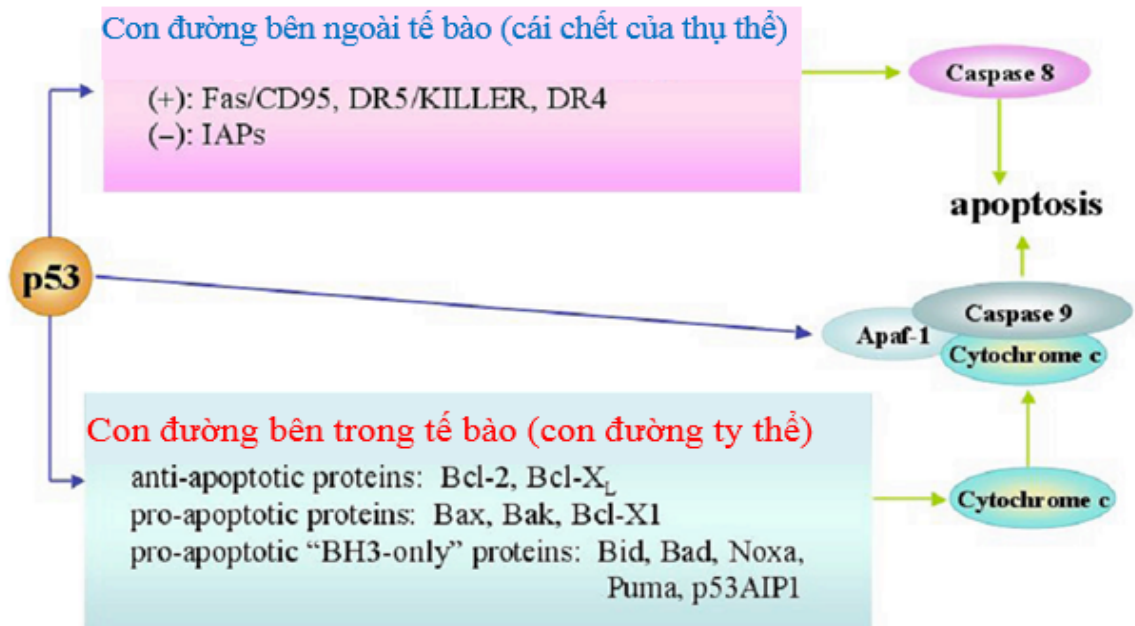
Nguồn: Nature Reviews Cancer, số 8, năm 2007.

Khi DNA bị tổn thương, gen p53 thúc đẩy tăng phiên mã p21. Protein 21 có 2 vùng gắn với p53 là p21-WAF1 (wild type of p53 activate fragment 1) và p21-CIP1 (Cyclin dependent kinase interacting protein 1). Protein p21-CIP1 gây bất hoạt phức hợp cyclinE-CDK2, p21-WAF1 gây bất hoạt phức hợp CyclinD1-CDK4. Các phức hợp CDK bất hoạt không có khả năng phosphoryl hóa pRB (Retinoblastoma protein) và pRB không phosphoryl hóa là dạng kích hoạt, sẽ gắn vào E2F. E2F (transcription factor induces cyclin E gene) có tác dụng kích hoạt một loạt các gen như myc, mybB tham gia vào sự nhân lên của DNA trong pha S. Sự hình thành phức hợp pRB-E2F trực tiếp ngăn cản chu trình tế bào từ pha G1 chuyển vào pha S và kết quả là chu trình phân bào bị dừng ở pha G1 cho đến khi DNA tổn thương được sửa chữa (Hình 1.7).

Gen TP53 gây tăng phiên mã GADD 45. GADD45 gắn vào CDC2, ngăn cản sự hình thành phức hợp cyclin B/CDC2 và ức chế hoạt động của enzym kinase. Đồng thời GADD45 cũng tác dụng trực tiếp lên sự nhân đôi DNA trong pha S bằng cách gắn với PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) và chiếm chỗ của DNA polymerase. Protein 14-3-3δ sẽ loại bỏ cyclin B/CDC2 khỏi nhân để phân tách cyclin B/CDC2 ra khỏi protein đích của nó. Sự biểu hiện quá mức của 14-3-3δ gây ngừng chu kỳ tế bào ở pha G2 [12],[120].

Quá trình chết tế bào theo chương trình (apoptosis)

Là “gatekeeper” tế bào, gen TP53 có vai trò ngăn chặn các biến đổi NST và tổn thương DNA tích tụ, đủ để gây ra biến đổi ác tính. Một trong những công cụ hữu hiệu là khả năng kích hoạt chương trình chết tế bào khi cần thiết. Gen p53 gây chết tế bào thông qua yếu tố ảnh hưởng đích. Đầu tiên phải kể đến là yếu tố Bax (Bcl-2-associated X protein). Đây là một protein thuộc gia đình Bcl-2 protein. Quá trình phiên mã của gen Bax được kích hoạt trực tiếp bởi vùng gắn kết DNA của protein p53 [12]. DR5/KILLER (death receptor, DRAL, Fas/CD95 (cell-death signaling receptor), PIG3 (p53-inducible gene 3), Puma (p53-upregulated modulator of apoptosis), PIDD (p53-induced protein with death domain), PERP (p53 apoptosis effector related to PMP-22), Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1, Scotin, p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1). Khi có biểu hiện quá mức các protein này thì đều gây chết tế bào. P53 có thể kích hoạt đặc tính chết theo chương trình của tế bào cả theo con đường bên trong tế bào hay con đường ty thể (Intrinsic pathway/mitochondrial pathway) và con đường bên ngoài tế bào hay con đường cái chết thụ thể. (Extrinsic pathway/death receptor pathway). Ngoài ra, p53 có thể trực tiếp kích hoạt Apaf-1 dẫn đến sự chết tế bào [120],[121] (Hình 1.8).



Hình 1.8. Các con đường gây apoptosis của p53

Nguồn: Nature reviews cancer, số 8, 2007.

Sửa chữa gen bị thương tổn.

Không phải tất cả các gen chỉ là mang lại sự sống hay cái chết cho tế bào mà còn có các gen sửa chữa các DNA hư hỏng, được gọi là các repair genes. Các gen này kiểm soát tỷ lệ đột biến của toàn bộ DNA, trong đó có cả các gen ung thư và gen ức chế ung thư. Protein p53 có liên quan đến các gen này nhưng cơ chế chưa thật rõ ràng. Một số nghiên cứu cho rằng p53 có vai trò giới thiệu các gen điều hoà quá trình cắt các nucleotid trên DNA cần sửa chữa, tách nhiễm sắc thể và phân li nhiễm sắc thể. Ngoài ra p53 còn liên quan đến sửa chữa DNA bằng cách trình diện một gen đặc biệt "ribonucleotide reductase" sau khi DNA bị thương tổn [12].

Ngăn ngừa sự tăng sinh mạch máu.

Để phát triển thành các khối u đủ lớn để gây nguy hiểm, tổ chức ung thư cần rất nhiều chất dinh dưỡng. Muốn vậy phải có hiện tượng tăng sinh mạch máu trong tổ chức khối u và vùng lân cận. Trong điều kiện bình thường

p53 kích thích sự sao chép các gen ức chế quá trình tăng sinh mạch máu [12]. Vì thế những tế bào có đột biến gen p53 thì có sự xuất hiện tăng sinh mạch máu. Đây là yếu tố sau cùng để tổ chức ung thư phát triển. Điều này củng cố cho lý thuyết về các gen ức chế ung thư. Như vậy, ngăn trở hiện tượng tăng sinh mạch máu là một trong những cơ chế quan trọng của gen TP53 ức chế khối u.

1.2.2. Gen sinh ung thư MDM2 (Murine Double Minute 2)

MDM2 là một oncoprotein được phát hiện lần đầu tiên ở dòng nguyên bào sợi chuột nhất bị biến đổi tự phát, mà khi bị khuếch đại hoặc biểu hiện quá mức sẽ làm tăng khả năng phát sinh khối u của tế bào.

1.2.2.1. Cấu trúc MDM2

Gen MDM2 còn được gọi là HDM2 (Human double minute 2) gồm 12 exon và 11 intron, nằm trên nhánh dài của NST số 12 (12q14.3-12q15). Được xác định lần đầu tiên năm 1980 [122]. Phân tử protein MDM2 được tổng hợp có 491 acid amin, khối lượng phân tử 56 kDa, gồm 5 vùng cấu trúc chức năng [122],[123],[124].

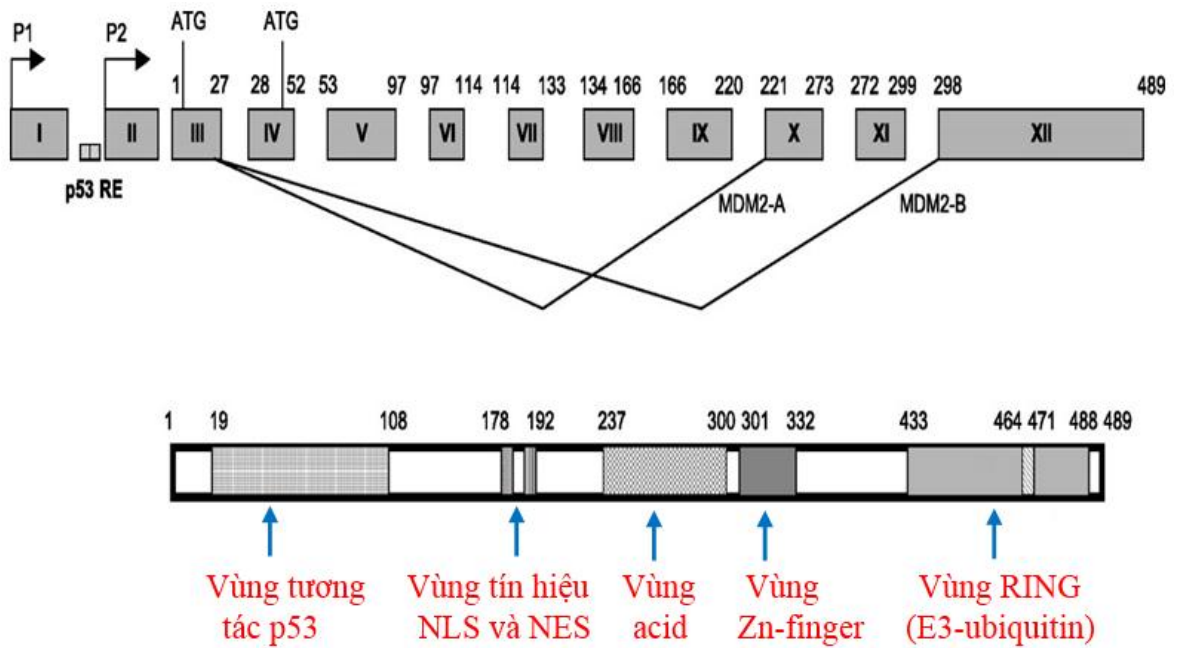
- Vùng tương tác với p53 (p53 interacting domain): nằm ở đầu N-tận của phân tử MDM2, gắn kết các vùng hoạt hóa sao chép của protein p53. Sự gắn kết này làm mất đi chức năng hoạt hóa sao chép của p53 với các mục tiêu phiên mã, đồng thời cũng giúp MDM2 vận chuyển p53 ra khỏi nhân tế bào qua con đường phụ thuộc RING.

- Vùng RING: nằm ở đầu C-tận của phân tử MDM2, có chức năng vận chuyển p53 ra khỏi nhân thông qua quá trình E3 ubiquitin hóa.

- Chuỗi tín hiệu NLS (Nuclear localization signal) và NES (Nuclear export signal) giúp MDM2 có thể di chuyển qua lại giữa nhân và bào tương.

- Vùng acid (Acidic domain): nằm ở vùng trung tâm, giúp MDM2 gắn kết với protein ribosom L5, và với p300/CBP (CREB-binding protein).

- Vùng Zn (Zn finger): chức năng chưa được biết rõ.



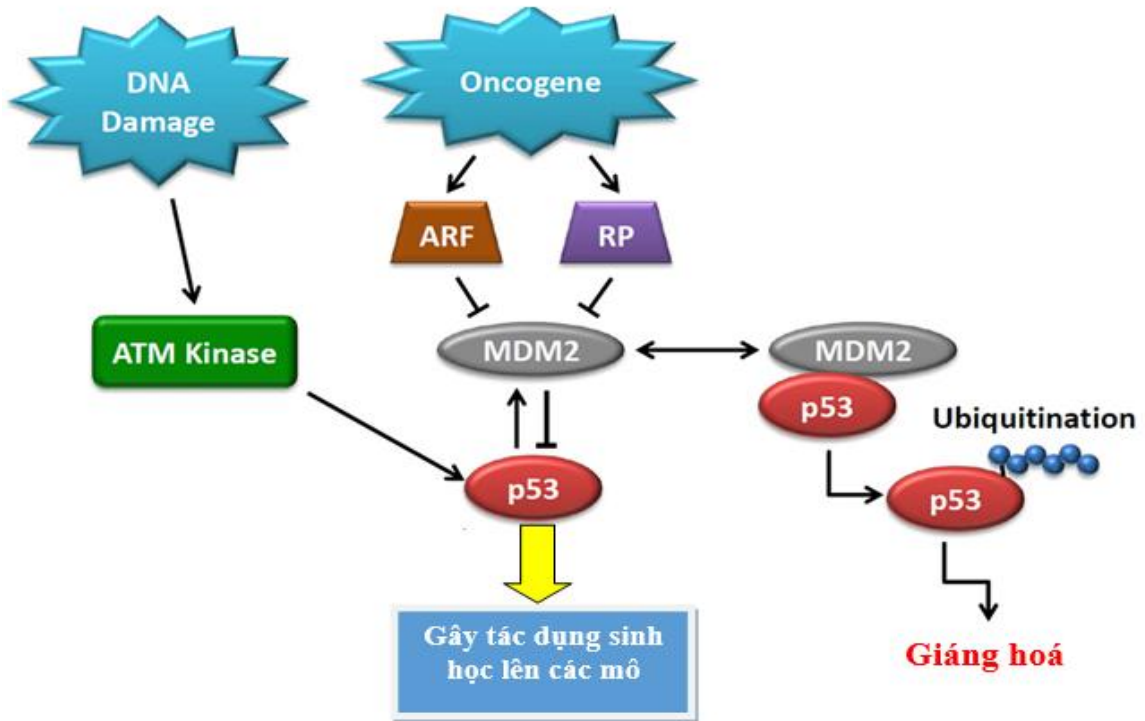
Hình 1.9. Cấu trúc phân tử MDM2

Nguồn: Mol Cancer Res, số 14, 2003.

1.2.2.2. Chức năng MDM2

Vai trò quan trọng nhất của MDM2 là điều hòa hoạt động của p53 trong con đường tín hiệu p53. Trong điều kiện bình thường thì MDM2 ức chế sự biểu hiện của p53 bằng hai cơ chế. Một là bám trực tiếp vào vùng hoạt hoá N-tận của p53, tạo một phức hợp bền vững (cả p53 đột biến và p53 bình thường). Quá trình này làm che phủ vùng hoạt hoá trên p53. Thứ hai là, MDM2 tác động đến p53 thông qua hệ thống ubiquitination (một thành tố trong con đường tín hiệu p53). Được xem như là một E3 ubiquitin ligase, MDM2 có vai trò trong tương tác giữa các ubiquitin và p53. Các mảnh ubiquitin gắn vào phân tử protein p53, đưa chúng đến các proteasome và bắt đầu quá trình giáng hoá p53. Trong điều kiện bình thường, nồng độ p53 được duy trì ở mức rất thấp do MDM2 liên tục khởi động quá trình giáng hoá [123],[125]. Khi p53 bị kích hoạt bởi các tín hiệu nguy hiểm đến bộ gen, hiện

tượng phosphoryl hoá sẽ làm thay đổi cấu trúc bậc IV của p53, làm đứt gãy liên kết giữa MDM2 và p53. Phân tử p53 được giải phóng sẽ hoạt hoá sao chép hàng loạt gen đích trong nhân tế bào, để gây nên các tác dụng sinh học cần thiết.



Hình 1.10. Vai trò điều hoà p53 của MDM2.

Nguồn BioModels Database, 2007.

MDM2 tăng cường biểu hiện, sẽ đồng nghĩa với việc bộ gen tế bào sẽ có nguy cơ bất ổn, do lượng p53 giảm sút. Hậu quả là p53 không kiểm soát được sự ổn định di truyền của tế bào, tạo cơ hội cho các tế bào ác tính phát sinh phát triển. Chính điều này đã làm MDM2 được xem như một gen sinh ung thư (oncogene). Tuy nhiên, khi p53 hoạt hóa lại thúc đẩy quá trình sao chép MDM2. Thực chất đây là một quá trình điều hoà ngược âm tính giữa MDM2 và p53 (hình 1.10). Tế bào sẽ luôn giữ được trạng thái ổn định thông qua quá trình điều hòa ngược giữa MDM2 và p53 [122],[123],[124].

1.2.3. Biến đổi của gen TP53 và MDM2 trong ung thư

Khiếm khuyết của con đường tín hiệu p53 là điểm nổi bật trong biến đổi phân tử ở hầu hết các loại hình ung thư [12]. Các đột biến gen TP53 ở tế bào sinh dưỡng gây suy giảm hoặc mất chức năng p53. Đây là nguyên nhân thường gặp nhất, đánh sập mạng lưới p53 trong tiến trình khởi phát ung thư. Sự không nguyên vẹn chức năng của p53 còn được xem như yếu tố tiên lượng trực tiếp của nhiều bệnh ung thư. Thực tế, những biến đổi tại locus TP53 trong ung thư có ba loại: 1) đột biến tế bào sinh dưỡng (somatic mutations) liên quan ung thư, 2) đột biến di truyền qua dòng tế bào mầm (germline) liên quan hội chứng rối loạn di truyền cận ung thư (Li-Fraumeni), 3) đa hình kiểu gen (polymorphisms) được thừa hưởng từ thế hệ trước làm tăng nguy cơ mắc ung thư [11].

Tỷ lệ đột biến somatic của TP53 trong ung thư dao động trong khoảng 50-80%. Tỷ lệ này tùy thuộc vào loại hình, giai đoạn tiến triển, nguyên nhân của ung thư. Trong đó 87,2% là đột biến sai nghĩa (missense mutations) [126]. Việc thay thế nucleotid đơn làm thay đổi trình tự acid amin sẽ ảnh hưởng đến chức năng p53. Vùng gắn kết DNA của gen p53 là vùng có tần suất đột biến cao nhất. Chiếm khoảng 93%. Số liệu này phù hợp với kết quả của nhiều nghiên cứu cho thấy, hầu hết các đột biến xuất hiện ở đoạn từ exon 5 đến exon 8 [9],[126]. Đây là vùng trung tâm của gen TP53. Đột biến sai nghĩa xảy ra nhiều ở vùng gắn kết DNA trong các tế bào ung thư cho thấy, gắn kết DNA từ đó kích hoạt sao chép hay ức chế các gen đích là cơ chế quan trọng nhất để p53 kiểm soát sự ổn định bộ gen tế bào. Điều này được minh chứng bằng thực tế là có năm trong sáu codon xảy ra đột biến nhiều nhất của p53, mã hoá cho arginin tại vùng gắn kết DNA (175, 248, 249, 273, 282), chiếm 25% tổng số đột biến của p53 [127]. Các arginin này là các vị trí p53 gắn trực tiếp hay gián tiếp vào các DNA. Các bộ ba mã hoá này khi đột biến

sẽ làm mất vị trí gắn với DNA, hoặc mất ổn định bề mặt tiếp xúc dẫn đến DNA không thể tiếp xúc được với p53. Còn hầu hết các đột biến khác thì lại làm thay đổi cấu trúc không gian khu vực gắn kết DNA của p53 làm che phủ vị trí gắn với các DNA [127]. Đột biến được ghi nhận nhiều nhất, liên quan đến ung thư, trong đó có UTTBGNP, là tại codon 249. Đây là đột biến thay thế 1 nucleotid (G thành T). Hậu quả của đột biến là sự thay thế acid amin trên phân tử protein p53 từ Arginine (AGG) thành Serine (AGT). Đột biến này thường được tìm thấy ở những bệnh nhân UTTBGNP có chế độ ăn uống phơi nhiễm với chất AFB1, tỷ lệ cao hơn khi phơi hợp với tình trạng nhiễm virus HBV [128].

Đột biến TP53 di truyền (germline mutations), đã được phát hiện trong những gia đình có hội chứng rối loạn di truyền cận ung thư Li-Fraumeni [129]. Đây là một bệnh lý di truyền có nguy cơ cao, mắc sarcoma, ung thư vú, ung thư não và u tuyến thượng thận. Những cá nhân trong các gia đình này, thường mắc ung thư khi tuổi còn rất trẻ. Cũng giống như đột biến tế bào sinh dưỡng liên quan ung thư, các germline mutations liên quan hội chứng Li-Fraumeni cũng gặp chủ yếu là đột biến thay thế nucleotid. Vùng thường xảy ra nhất cũng là vùng gắn kết DNA đích. Đột biến TP53 di truyền (germline mutations) góp phần trong chẩn đoán hội chứng Li-Fraumeni.

Là một gen trong con đường tín hiệu p53, với vai trò là yếu tố điều hoà ngược âm tính của p53, MDM2 liên quan trực tiếp đến tất cả các chức năng của p53. Trong hầu hết các nghiên cứu, biến đổi của MDM2 trong ung thư luôn đi kèm với gen TP53. Chúng như một cặp gen nghiên cứu. MDM2 tự nó không trực tiếp gây những biến đổi ung thư, nhưng sự biểu hiện quá mức của MDM2 lại là một nguy cơ rất lớn. Những nghiên cứu ban đầu về MDM2 trong ung thư cho thấy, có sự tăng cường biểu hiện của gen MDM2 trong hầu hết các loại bệnh ác tính [130].

Một biến đổi nữa của TP53 và MDM2 liên quan đến ung thư, là các đa hình kiểu gen (polymorphisms). Các biến thể (variants) sinh ra từ các đa hình sẽ tạo ra các kiểu gen khác nhau trong cộng đồng. Hơn 200 đa hình của TP53 đã được tìm thấy, trong đó hầu hết là các thay thế nucleotid đơn (SNP). Chỉ một số trong các SNP đó, liên quan đến ung thư. Đối với gen TP53, SNP được nghiên cứu nhiều nhất là R72P. Đây là vị trí liên quan đến chức năng kích hoạt apoptosis của TP53. Kiểu gen P72P được ghi nhận làm tăng nguy cơ ung thư, và làm hội chứng Li-Fraumeni chuyển ác tính sớm hơn [18], [131],[132]. Nghiên cứu tính đa hình thái của MDM2 cho thấy SNP quan trọng nhất nằm ở bộ ba mã hóa 309 (SNP309 T/G). Kiểu gen đồng hợp tử G/G có sự gia tăng tổng hợp MDM2 cao gấp 2,5 lần so với kiểu gen nguyên thủy T/T. Khi kết hợp với những người mang đột biến trên gen TP53 thì kiểu gen G/G này có khả năng phát triển ung thư sớm hơn nhiều năm so với kiểu gen T/T. [17],[133],[134].

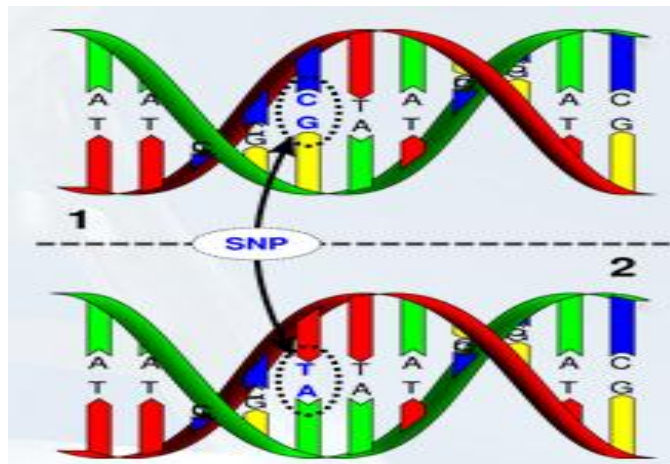
1.3. ĐA HÌNH KIỂU GEN TP53 VÀ MDM2 LIÊN QUAN UNG THƯ TẾ BÀO GAN NGUYÊN PHÁT

1.3.1. Hiện tượng đa hình nucleotid đơn (SNP)

Sự khác biệt cho mỗi cá thể được tạo bởi đa hình thái của các gen. Hiện tượng đa hình thái nucleotid đơn là sự khác nhau về trình tự DNA xảy ra khi một nucleotid đơn A, T, G, C ở trong bộ gen (hay trong các trình tự được phân lập khác) khác nhau giữa các cá thể của một loài hay giữa các cặp nhiễm sắc thể của một người. Bộ gen người với 23 cặp NST (22 NST thường và cặp NST giới tính) chứa khoảng 3,2 tỉ bp. Giống nhau giữa các cá thể đến trên 90% và khoảng 1% sự khác biệt còn lại chủ yếu biểu hiện bởi các SNP [135].

Đa hình nucleotid đơn là một hiện tượng phổ biến, được coi là hậu quả của những đột biến điểm thay thế một cặp nucleotid. Để phân biệt đột biến và SNP thì người ta dựa vào tần số xuất hiện trong cộng đồng. Nếu những đột

biến xuất hiện $> 1\%$ trong quần thể dân cư thì được coi là SNP. Theo dữ liệu của NCBI tính đến tháng 6/2012 có khoảng gần 19 triệu SNPs trong bộ gen người. Các đa hình nucleotid đơn có tính chủng tộc. Cùng một SNP nhưng tỷ lệ các biến thể (variant) trong quần thể, khác nhau giữa các tộc người. Thậm chí có những SNP có và không có, trong bộ gen của những tộc người khác nhau.



Hình 1.11. Mô phỏng hiện tượng đa hình nucleotid đơn

Nguồn từ <http://www.dnabaser.com/>

Hiện tượng đa hình nucleotid đơn có thể xảy ra trên vùng mã hoá (exon) và không mã hoá (intron) của gen. Có những SNPs làm thay đổi acid amin, dẫn đến có thể ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng phân tử protein. Những SNPs này thường là do thay đổi nucleotid tại vị trí đầu tiên hoặc thứ hai của bộ ba mã hoá. Ví dụ CGC chuyển thành CCC, hay GCT chuyển thành CCT. Còn những thay thế nucleotid ở vị trí thứ 3 trong bộ ba mã hoá thường không làm thay đổi acid amin. Ví dụ CCT chuyển thành CCG. Những thay thế này được gọi là các *Silent* SNPs. Các *Silent* SNPs không làm thay đổi trình tự acid amin, nhưng nếu nằm trên các vùng chức năng quan trọng, cũng có thể gây ra các tác động đến chức năng sinh học của gen đó.

Sự khác biệt trong trình tự DNA ở người có thể ảnh hưởng đến sự phát triển bệnh tật; sự đáp ứng các tác nhân gây bệnh, hóa chất, thuốc, vaccin, stress.... Tuy nhiên, ứng dụng lớn nhất của SNP trong nghiên cứu y sinh học là so sánh các vùng gen giữa các nhóm người với nhau (chẳng hạn giữa nhóm người bị bệnh và không bị bệnh), từ đó xác định mối liên quan giữa SNP với sự hình thành và phát triển của bệnh. Tiến hành sàng lọc, tư vấn di truyền cho các cá nhân mang những biến thể có nguy cơ mắc bệnh cao [136].

1.3.2. Tính đa hình của gen TP53

Theo kết quả của các nghiên cứu đã được công bố thì có khoảng hơn 200 SNP được tìm thấy trên vùng mã hóa và không mã hóa của gen TP53. Một số SNP đã được chứng minh là có liên quan đến 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 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. Đây cũng chính là các SNP được tiến hành phân tích trong nghiên cứu này.

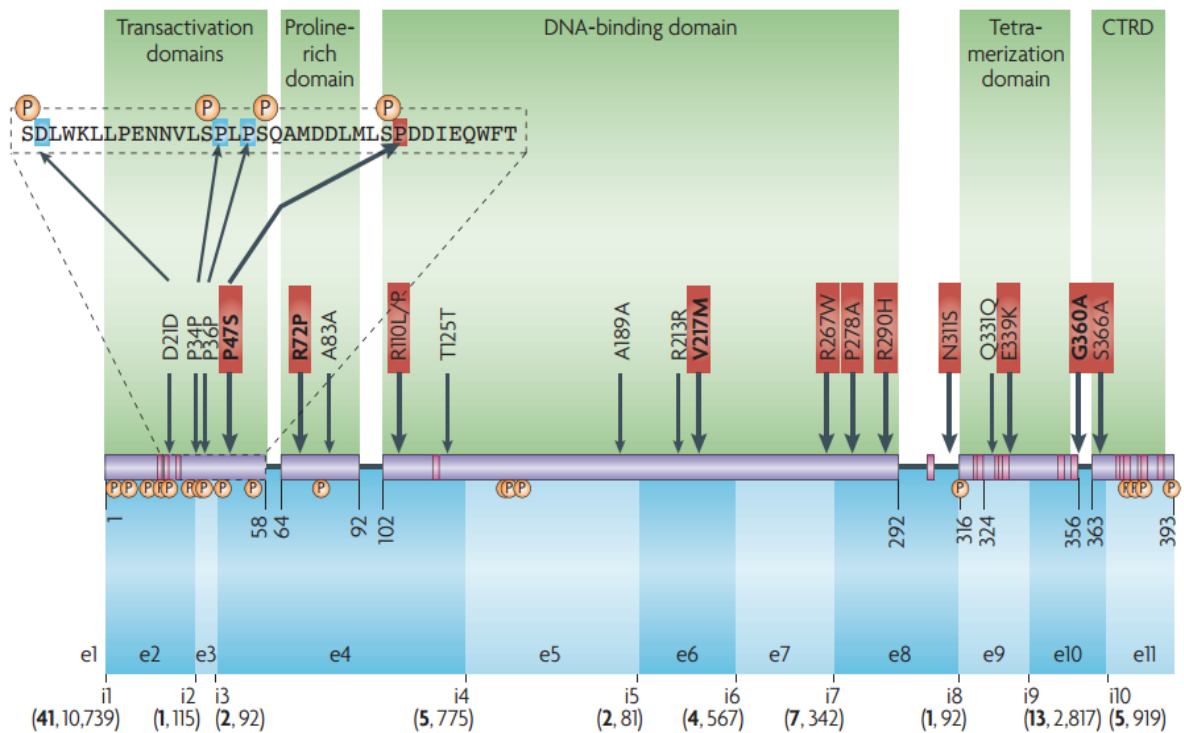
Đầu tiên phải kể đến là hiện tượng đa hình thái do sự thêm 16 base pair tại vùng không mã hóa thứ 3 (intron-3) của TP53. Những người mang kiểu gen này thì sự biểu hiện protein p53 trong tế bào ở mức thấp và có nguy cơ cao mắc một số loại ung thư bao gồm ung thư phổi, ung thư vú và ung thư đại trực tràng. Điều này chứng tỏ rằng SNP có khả năng thay đổi quá trình hoàn thiện mRNA [11], [137].

Tiếp sau đó là các SNPs trên vùng mã hóa của TP53. Đầu tiên là tại các bộ ba mã hóa 21 (GAC → GAT), 34 (CCC → CCA) và 36 (CCG → CCT). Mặc dù không làm thay đổi trình tự acid amin nhưng cũng làm giảm sự biểu hiện của protein p53. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các SNPs này nằm tại

vùng hoạt hoá N-tận của TP53 chứa vị trí tương tác của với MDM2 và làm giảm khả năng dịch mã của TP53 mRNA [11],[138].

Đối với 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 p53 đối với đoạn trình tự đặc hiệu tại gen đích, thay đổi quá trình hoàn thiện, tính ổn định của protein cũng như thay đổi khả năng tương tác của p53 với các protein nội bào. Đây là những SNPs nằm tại các bộ ba mã hóa 47 (P47S), 72 (R72P), 217 (V217M) và 360 (G360A). Trong điều kiện bình thường, dưới tác động của protein p38 và homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) p53 được phosphoryl hóa tại vị trí S46 dẫn đến sự tăng cường sao chép các gen liên quan đến quá trình thực bào (apoptosis). Và khi alen p53-P47 được thay thế bởi alen p53-S47, sự phosphoryl hóa tại vị trí S46 bị giảm sút, làm giảm khả năng hoạt hoá p53, dẫn đến suy giảm tác động lên các gen đích của quá trình thực bào thực bào và tăng khả năng mắc ung thư [11],[139].

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 p53-R72 và p53-P72. SNP R72P nằm trên vùng exon 4, ngay rìa vùng gắn kết DNA của p53. Đây là vùng giàu proline và được cho là liên quan đến chức năng kích hoạt apoptosis của p53. Biến thể p53-P72 làm thay đổi cấu trúc bậc 3 của p53, ảnh hưởng đến bề mặt tiếp xúc tại vùng gắn kết DNA. Kiểu gen R72/R được ghi nhận là có khả năng kích hoạt apoptosis rõ ràng hơn so với kiểu gen P72P.



Hình 1.12. Các SNPs trên các vùng mã hóa và không mã hóa của TP53

Nguồn: Nature Reviews Cancer, số 9, 2009.

- Các SNP đánh dấu màu đỏ làm thay đổi acid amin.
- Các SNP không đánh dấu màu không làm thay đổi acid amin.
- Các khoanh tròn màu vàng (P) là các vị trí xảy ra hiện tượng phosphoryl hoá. SNP P47S nằm ngay sau một điểm phosphoryl hoá (S46) nên có thể làm giảm hiện tượng phosphoryl hoá tại đây. Từ đó làm ảnh hưởng đến khả năng hoạt hoá của p53.
- Các vạch màu hồng, tím trên phân tử DNA là các vị trí xảy ra hiện tượng methyl hoá và acetyl hoá. Các hiện tượng góp phần kích hoạt p53.

Đối với 2 dạng SNPs còn lại, V217M nằm trên vùng bám vào DNA của p53 (DNA binding domain), SNPs này có khả năng làm giảm hoạt động của p53 và các gen bị ảnh hưởng trực tiếp gồm có CDKN1A, BAX và PMAIP1. Nghiên cứu chức năng cho thấy kiểu gen p53-M217 có sự biểu hiện của

những gen trên cao gấp nhiều lần kiểu gen p53-V217. Như vậy kiểu gen p53-M217 có khả năng bảo vệ tế bào chống lại các tác nhân gây ung thư tốt hơn kiểu gen p53-V217. Tuy nhiên cơ chế phân tử của hiện tượng này vẫn chưa thực sự rõ ràng. SNPs G360A nằm tại vùng nối của p53. SNP này tác động lên sự biểu hiện của BAX và MDM2, đây là những gen quan trọng trong con đường tín hiệu p53 [11].

1.3.3. Tính đa hình thái của gen MDM2

MDM2 là một gen đa hình thái. Nhiều SNP đã được phát hiện, phân bố trải dài trong cả 11 intron và 12 exon của MDM2 (Bảng 1.1). Những nghiên cứu tính đa hình thái của MDM2 thời gian gần đây cho thấy, SNPs quan trọng nhất nằm ở nucleotid 309, rs2279744. Sự thay đổi tại codon 309 khi nucleotid T chuyển thành G. Đây là vùng intron 1, liên quan đến sự kích hoạt phiên mã của MDM2. Đây cũng là vùng có vị trí gắn của p53. Kết quả của SNP này, biến thể đồng hợp tử G/G làm tăng sự gắn kết của yếu tố phiên mã Sp1 vào vùng promoter của MDM2. Dẫn đến MDM2 tăng cường phiên mã và giải mã. Nồng độ MDM2 protein tăng cao sẽ ức chế các chức năng sinh học của p53, tăng nguy cơ xuất hiện các biến đổi ung thư [140], [141].

Khi nghiên cứu SNP 309 T>G trong các mô hình bệnh chứng giữa nhóm bị ung thư và không bị đối chứng cho thấy, biến thể G/G tăng nguy cơ mắc một số bệnh ung thư. Ngoài ra, kiểu gen đồng hợp tử G/G có sự gia tăng tổng hợp MDM2 cao gấp 2,5 lần so với kiểu gen nguyên thủy T/T. Đồng thời đối với những người mang đột biến di truyền trên gen TP53 khi kết hợp với kiểu gen G/G có khả năng phát triển ung thư sớm hơn nhiều năm so với kiểu gen T/T [17],[133],[134].

Bảng 1.1. Một số SNP trên gen MDM2

Kiểu gen (Genotype)	Vị trí	SNPs	Vùng
rs3730485(-758+)	67487073	-/+	Promoter
rs937282(C1797G)	67488064	C/G	Promoter
rs937283(A2164G)	67488431	A/G	Exon1
rs2870820(C2326T)	67488593	C/T	Intron1
rs2279744(SNP309)	67488847	T/G	Intron1
rs1470383	67493429	A/G	Intron3
rs1846402	67494845	A/C	Intron4
rs3730536	67498277	A/G	Intron5
rs1625525	67499098	T/C	Intron5
rs3730556	67502788	T/G	Intron6
rs2291857	67504305	G/T	Intron6
rs3730581	67505759	G/A	Intron8
rs3730590	67506903	C/T	Intron8
rs3730635	67515390	A/G	Intron9
rs3730646	67518247	G/A	Intron11

(Nguồn: <http://clincancerres.aacrjournals.org>)

1.3.4. Tính đa hình thái của gen TP53 và MDM2 trong ung thư tế bào gan nguyên phát.

Các biến thể (variants) sinh ra từ các SNP sẽ tạo ra các kiểu gen khác nhau trong cộng đồng. Các nghiên cứu bệnh-chứng so sánh tỷ lệ các kiểu gen ở hai nhóm ung thư và không ung thư, sẽ cho biết sự liên quan của SNPs với nguy cơ mắc bệnh. Từ đó sẽ tư vấn di truyền cho các cá nhân mang những

biến thể có nguy cơ. Trong hơn một thập kỷ trở lại đây, các SNPs của hai gen TP53 và MDM2 đã được nghiên cứu trên nhiều loại hình ung thư, trong đó có ung thư tế bào gan nguyên phát.

1.3.4.1. Đa hình kiểu gen TP53 liên quan UTTBGNP

Năm 2009, Catherine Whibley đã hệ thống lại tất cả các SNPs quan trọng của TP53 trong một review đăng trên tạp chí *Nature* [11]. Nhiều nghiên cứu sau đó đã đi tìm sự liên quan của các SNPs này với tỷ lệ mắc ung thư, trong đó có UTTBGNP. Kết quả thu được, chỉ duy nhất SNP tại bộ ba mã hoá 72, rs1042522 (R72P) là có liên quan UTTBGNP. SNP R72P nằm trên vùng exon 4, ngay rìa vùng gắn kết DNA của p53. Đây là vùng giàu proline và được cho là liên quan đến chức năng kích hoạt apoptosis của p53. Tại codon 72, cytosine (C) thay thế cho guanin (G), kết quả là acid amin arginin chuyển thành proline. Biến thể prolin, làm thay đổi cấu trúc bậc 3 của p53, ảnh hưởng đến bề mặt tiếp xúc tại vùng gắn kết DNA. Kiểu gen R72/R được ghi nhận là có khả năng kích hoạt apoptosis rõ ràng hơn so với kiểu gen P72P.

Từ năm 1999, tại Đài Loan, vùng lãnh thổ có tỷ lệ mắc ung thư gan cao liên quan HBV, người ta đã tìm kiếm sự liên quan giữa R72P và ung thư tế bào gan, trong 80 bệnh nhân [142]. Kết quả thu được không như mong đợi, biến thể P72 không làm tăng nguy cơ mắc UTTBGNP. Tuy nhiên khi kết hợp với các yếu tố nguy cơ khác, thì allele P72 và viêm gan mạn tính đã làm tăng nguy cơ mắc bệnh. OR = 7,60 (95% CI = 2.28-25.31). Cũng như vậy khi kết hợp với tiền sử gia đình có người mắc UTTBGNP và allele P72 đã làm tăng có ý nghĩa nguy cơ mắc bệnh. OR = 3,29 (95% CI = 1.10-9.85).

Tại Trung Quốc, quốc gia có số ca mắc mới UTTBGNP chiếm 50% toàn cầu. Trong nhiều nỗ lực nhằm giảm tỷ lệ mắc, cũng đã nghiên cứu các SNPs của TP53. Một nghiên cứu năm 2005, ở 507 bệnh nhân mắc UTTBGNP và 541 đối chứng, kết quả đã có nhiều khác biệt so với nghiên cứu trước đó

tại Đài Loan. Số liệu ghi nhận từ nghiên cứu cho thấy, SNP R72P liên quan đến UTTBGNP. Cụ thể, allele P72 làm tăng nguy cơ mắc bệnh hơn so với allele R72, OR = 1.19 (95% CI 1.00-1.41). Kiểu gen đồng hợp tử P72P tăng nguy cơ gấp 1,79 lần so với kiểu gen nguyên thủy R72R. OR = 1.7 (P = 0.03). Khi kết hợp các kiểu gen lại cho thấy, mô hình P72P + R72P tăng nguy cơ mắc bệnh hơn kiểu gen đồng hợp chỉ mang mỗi Arginin [16]. Sự khác biệt còn cần phải kiểm chứng bằng những nghiên cứu được thiết kế bài bản, nhưng một điều dễ nhận thấy là cỡ mẫu của nghiên cứu tại Trung Quốc đã lớn hơn rất nhiều so với nghiên cứu trước đó tại Đài Loan. Đây là điều kiện để các nghiên cứu bệnh chứng về SNP đưa ra các số liệu thuyết phục.

Châu Phi cũng là vùng dịch tễ có tỷ lệ mắc UTTBGNP cao, người gốc Phi cũng được ghi nhận là có tỷ lệ mắc cao hơn các chủng tộc khác tại Mỹ. Các nghiên cứu SNPs của TP53 trong UTTBGNP cũng đã được tiến hành tại một số quốc gia châu Phi. Nghiên cứu của Ezzikouri năm 2007 tại vùng Bắc Phi cho thấy, SNP R72P liên quan UTTBGNP. Khi phân tích kiểu gen đã chỉ ra rằng, kiểu gen P72P làm tăng nguy cơ lên 2,3 lần. OR = 2.304 (95% CI 1.014-5.234). Một điều đáng chú ý là khi so sánh giữa các giới cho thấy, kiểu gen P72P làm tăng nguy cơ cao hơn ở nữ so với nam giới. OR = 4.4; 95% CI, 1.18-16.42 so với OR = 1,57 ở nam [143]. Ngược lại với nghiên cứu này, một sự tìm kiếm ở người Thổ Nhĩ Kỳ lại cho một kết quả rất khác. Nguy cơ kiểu gen P72P mang lại cho nam giới nguy cơ mắc UTTBGNP cao hơn và có ý nghĩa hơn nữ. OR = 3.01, (95% CI: 1.14–7.97, P = 0.03) [144].

Cho đến hiện tại R72P vẫn là SNP duy nhất của gen TP53 liên quan ung thư tế bào gan nguyên phát. Tuy nhiên các kết quả nghiên cứu còn khác biệt. Một số nghiên cứu lại ghi nhận sự liên quan yếu hoặc không liên quan [145] [146]. Điều này cũng dễ hiểu khi mà nền tảng di truyền của mỗi dân tộc là khác nhau và cơ chế phân tử của UTTBGNP liên quan đến rất nhiều gen,

trong nhiều con đường tín hiệu khác nhau. Một trong số đó là MDM2 trong con đường tín hiệu p53.

1.3.4.2. Đa hình kiểu gen MDM2 liên quan UTTBGNP

So với TP53 gen MDM2 có ít hơn các đa hình nucleotid đơn. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, cũng giống gen TP53, MDM2 chỉ có duy nhất SNP là 309 T>G liên quan UTTBGNP. Đầu tiên người ta phát hiện tần suất kiểu gen G/G tăng cao một cách có ý nghĩa trên bệnh nhân UTTBGNP so với những người khoẻ mạnh. Một nghiên cứu ở Trung Đông cho thấy, tỷ lệ G/G ở bệnh nhân UTTBGNP là 26%, trong khi ở người bình thường là 14% ($p=0,01$). Khi so sánh các allele G và T cũng ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa. Nhóm bệnh có sự phân bố allele (T, 0.48; G, 0.52). Nhóm chứng (T, 0.65; G, 0.35) với ($p = 0.003$). Đánh giá nguy cơ mắc ung thư tế bào gan, kết quả thấy, kiểu gen GG làm tăng có ý nghĩa nguy cơ mắc bệnh $OR = 3.63$ (95% CI, 1.65–8.00) [147].

Vị trí của SNP 309 T>G là tại vùng hoạt hoá sao chép của MDM2. Biến thể G làm tăng sự gắn kết của yếu tố phiên mã Sp1 vào vùng promoter của MDM2. Hậu quả là tăng tổng hợp MDM2 protein, sau đó là tăng ức chế hoạt động chức năng của p53. Cơ chế này phù hợp với nhiều nghiên cứu bệnh chứng về SNP 309 T>G. Một nghiên cứu ở châu Âu đã ghi nhận sự tăng có ý nghĩa nguy cơ mắc UTTBGNP khi mang kiểu gen G/G và G/T, $OR = 3.56$, (95% CI = 1.3-9.7) và $OR = 2.82$, (95% CI = 1.3-6.4). Hai tỷ xuất chênh đều khá cao, gần ba lần, khoảng tin cậy đều cách xa 1.0 cho thấy một sự liên quan khá chặt của SNP 309 với UTTBGNP cũng như nguy cơ mắc bệnh rõ rệt ở những người mang hai kiểu gen này [148].

Cũng giống như R72P của TP53, SNP 309 T>G cũng có những khác biệt giữa các nghiên cứu trước sau và giữa các dân tộc. Có những kết quả ghi nhận sự liên quan yếu hoặc không liên quan [149]. Tuy nhiên vấn đề cỡ mẫu vẫn là một hạn chế của nhiều nghiên cứu. Hơn nữa sự khác nhau về nền tảng

di truyền cũng như các mô hình yếu tố nguy cơ ở mỗi quốc gia cần phải được tính đến. Gần đây có một xu hướng mới trong nghiên cứu các SNP. Đó là đánh giá nguy cơ mắc bệnh khi tổ hợp ngẫu nhiên các kiểu gen của các SNP khác nhau lại.

1.3.4.3. Kết hợp các SNP của TP53, MDM2

Sự tổ hợp một cách ngẫu nhiên của chọn lọc tự nhiên sẽ tạo ra nhiều tổ hợp gen khác nhau từ các SNP, dành cho mỗi cá thể. Trung bình mỗi SNP có 3 kiểu gen, khi tổ hợp giữa n SNP sẽ tạo ra 3^n kiểu gen tổ hợp. Những nghiên cứu SNP của TP53 và MDM2 trên UTTBGNP gần đây cũng có những ghi nhận theo hướng này. Các nghiên cứu chỉ chọn hai SNPs liên quan nhiều nhất đến UTTBGNP để tổ hợp. Kết quả là khi tổ hợp lại đã làm tăng một cách rất ý nghĩa nguy cơ mắc bệnh. Kiểu gen P72P khi kết hợp với 309G/G làm nguy cơ mắc ung thư gan lên đến 10 lần so với kiểu gen R72R kết hợp với 309T/T [20],[150]. Kiểu gen kết hợp này, cũng làm tăng rất cao nguy cơ mắc ung thư tế bào gan và khởi phát sớm hơn trong những bệnh nhân viêm gan B mạn tính [151],[152].

1.3.4.4. Tương tác giữa các SNP của TP53, MDM2 với các yếu tố nguy cơ từ môi trường

Sự tương tác giữa các kiểu gen và các môi trường sẽ quyết định kiểu hình. Một thực tế là gan của chúng ta đang hàng ngày chịu vô vàn những tác động bất lợi từ các yếu tố nguy cơ của môi trường. Rất khó khăn để một kiểu gen, mình nó đủ để giải thích cho cơ chế phân tử của UTTBGNP. Những nghiên cứu SNP trong UTTBGNP gần đây đã có những cách tiếp cận mới, đó là nghiên cứu các SNPs trong các nguy cơ UTTBGNP khác như HCV, HBV, nghiện rượu, NASH, hút thuốc lá... Cách tiếp cận mới này trả lời cho câu hỏi tại sao, rất nhiều người phơi nhiễm với yếu tố nguy cơ nhưng không mắc UTTBGNP. Đánh giá sự tương tác giữa các kiểu gen và yếu tố nguy cơ từ

môi trường sẽ mang lại các thông tin giá trị, giúp tư vấn phòng tránh mắc ung thư gan cho những đối tượng có nguy cơ cao trong cộng đồng.

Các nghiên cứu SNP của TP53 và MDM2 và các yếu tố nguy cơ của UTTBGNP chỉ tập trung vào R72P và 309T>G. Yếu tố nguy cơ được nghiên cứu nhiều nhất là nhiễm HBV mạn tính, HCV mạn tính. Đây là hai nguy cơ lớn của UTTBGNP trên toàn cầu. Ngoài ra hai yếu tố nguy cơ này cũng dễ kiểm soát, dễ lượng giá khi chọn đối tượng nghiên cứu. Không có nhiều nghiên cứu ở người nghiện rượu vì khó khăn khi chọn nhóm chứng. Đặc biệt chưa có nghiên cứu nào liên quan đến phơi nhiễm Aflatoxin. Thực tế có những khó khăn khi xác định có hay không tình trạng phơi nhiễm Aflatoxin. Ngoài ra Aflatoxin là chất gây đột biến mạnh, trong đó có gen TP53. Ở đây, sự tương tác gen-môi trường là mạnh mẽ và gây hậu quả tổn thương không hồi phục cho bộ gen. Hay có thể nói đây là tương tác một phía, và phải có cách tiếp cận nghiên cứu hoàn toàn khác.

Kết quả các nghiên cứu cho thấy, các biến thể của SNP R72P và 309T>G làm tăng nguy cơ mắc UTTBGNP một cách có ý nghĩa, cho những đối tượng nhiễm HBV, HCV mạn tính. Ngoài ra, kiểu gen P72P và 309 G/G làm thời gian khởi phát UTTBGNP sớm hơn nhiều năm cho những bệnh nhân nhiễm HBV, HCV. Có thể xem các kiểu gen biến thể P72P và 309G/G là các nguy cơ cần sàng lọc sớm để ngăn ngừa mắc UTTBGNP cho những đối tượng nhiễm HBV, HCV mạn tính trong cộng đồng [19],[153],[154], [155],[156].

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nhóm bệnh

280 bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát, đã được chẩn đoán xác định và đang điều trị tại Khoa Nội Tiêu Hoá, Bệnh viện Bạch Mai và Trung tâm Ung Bướu Thanh Hoá từ tháng 11 năm 2013 đến tháng 3 năm 2015.

2.1.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân

Bệnh nhân được chẩn đoán xác định UTTBGNP khi có một trong những tiêu chuẩn sau:

- Có bằng chứng về mô bệnh học hoặc tế bào học.
- Hình ảnh điển hình trên phim chụp cắt lớp vi tính (CT scan) ổ bụng có tiêm thuốc cản quang, hoặc cộng hưởng từ (MRI) ổ bụng có cản từ + AFP > 400ng/ml.
- Hình ảnh điển hình trên CT scan ổ bụng cản quang hoặc cộng hưởng từ (MRI) ổ bụng có cản từ + AFP tăng cao hơn bình thường (nhưng chưa đến 400 ng/ml) + có nhiễm virus viêm gan B hoặc C.

2.1.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Ung thư gan di căn từ cơ quan khác tới.
- Bệnh nhân có ung thư cả những cơ quan khác ngoài gan.
- Bệnh nhân không đồng ý hợp tác nghiên cứu.

2.1.2. Nhóm chứng

267 đối chứng được lựa chọn từ những người đến khám sức khoẻ tại Khoa khám bệnh, Bệnh viện Đa Khoa tỉnh Thanh Hoá năm 2014. Những bệnh nhân này được khám, kiểm tra cận lâm sàng và kết luận là không mắc UTTBGNP hay bất kỳ một loại hình ung thư nào khác. Nhóm chứng được

chọn lựa kỹ, để có độ tuổi và tỷ lệ giới tính gần giống với nhóm bệnh, theo nguyên tắc của một nghiên cứu bệnh chứng.

2.1.3. Các đa hình kiểu gen được phân tích

2.1.3.1. Gen TP53

Tiến hành phân tích kiểu gen TP53 tại 08 SNP. Đây là những đa hình nằm trên các vùng chức năng quan trọng của gen TP53, như hoạt hoá sao chép, vùng apoptosis, vùng gắn kết với các gen đích... Các SNP này đã được chứng minh là có liên quan đến một số loại hình ung thư trên thế giới [11].

- Thêm đoạn 16 cặp base pair tại intron 3 (dup 16).
- SNP D21D, tại codon 21, exon 2, (GAC→GAT), mã hoá Aspartate.
- 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.

2.1.3.2. Gen MDM2

Tiến hành phân tích kiểu gen MDM2 tại một đa hình nucleotid đơn của vùng promoter. Không những là vùng khởi động của gen MDM2, đây còn là vùng có vị trí gắn của TP53. Vị trí tại nucleotid 309, intron 3 (309 T>G). Đây cũng là SNP duy nhất cho tới hiện tại của gen MDM2 được ghi nhận là có liên quan đến ung thư, trong đó có ung thư tế bào gan nguyên phát [64],[65],[70].

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Mô hình nghiên cứu mô tả cắt ngang có đối chứng.

2.2.2. Cỡ mẫu

Cỡ mẫu nghiên cứu được tính theo công thức tính cỡ mẫu trong nghiên cứu mô tả cắt ngang có đối chứng của Tổ chức Y Tế Thế Giới:

$$n = \frac{\{Z_{2\alpha} \sqrt{2pq} + Z_{2\beta} \sqrt{p_1q_1 + p_2q_2}\}^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

n: cỡ mẫu,

lấy $\alpha=0.05$ thì $z_{2\alpha}=1.96$, $\beta=0.2$ thì $z_{2\beta}=1.04$.

p_1 : tỷ lệ mang biến thể liên quan đến ung thư của nhóm chứng, $q_1=1- p_1$

lấy $p_1=0.20$ là tỷ lệ lưu hành được lấy từ một số nghiên cứu ban đầu tại Việt Nam [80],[81].

p_2 : tỷ lệ mang biến thể có liên quan đến ung thư của nhóm bệnh, $q_2=1- p_2$

$p = (p_1+p_2)/2$, $q=1-p$

$$OR = \frac{p_2}{1-p_2} / \frac{p_1}{1-p_1}$$

Ước lượng $OR=2.5$ ta tính được $p_2=0.38$

Thay vào công thức ta có:

$$n = \frac{(1.96 * \sqrt{2 * 0.29 * 0.71} + 1.04 * \sqrt{0.2 * 0.8 + 0.38 * 0.62})^2}{(0.2 - 0.38)^2} = 175$$

Cỡ mẫu của nghiên cứu tối thiểu phải được 175 bệnh nhân và 175 đối chứng.

2.2.3. *Dụng cụ, trang thiết bị*

- Máy Gene Amp PCR System 9700 (USA).
- Máy Realtime PCR của hãng Eppendorf.
- Tủ lạnh sâu: -30°C; -80°C (SANYO).
- Máy điện di: Mupid (Nhật Bản).
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động: Chemidoc EQ-Bio-Rad (USA).
- Máy ly tâm lạnh Beckman (USA) và ly tâm để bàn Eppendorf (Đức).
- Máy quang phổ kế Thermo Electron Corporation của hãng Biomate.
- Máy đo nồng độ acid nucleic Nano Drop 1000 (Mỹ).
- Lò vi sóng (Samsung).
- Tủ ẩm.
- Pipet, đầu côn các loại, găng tay, giấy thấm
- Ống Eppendorf, ống Falcon
- Máy đọc trình tự gen 3100-Avant Genetic Analyzer của hãng ABI-PRISM.

2.2.4. *Hóa chất dùng trong nghiên cứu.*

- *Hóa chất tách chiết DNA:* (Kit Promega)
 - + Dung dịch Cell Lysis
 - + Dung dịch Nuclei Lysis
 - + Dung dịch Rnase
 - + Dung dịch Protein precipitation
 - + Dung dịch Isopropanol
 - + Dung dịch cồn 70%
 - + Dung dịch rehydration
- *Hóa chất cho phản ứng PCR*
 - + Nước cất 2 lần vô trùng
 - + Gold Taq chứa: 4 loại dNTP, Taq polymerase, MgCl₂, buffer, loading dye
 - + Mồi xuôi và mồi ngược

- *Hóa chất chạy điện di.*

+ Dung dịch đệm TBE 1X gồm: Tris base, boric acid và EDTA (pH 8,0)

+ Agarose

+ Thang DNA chuẩn 100 bp (marker 100bp)

+ Dung dịch ethidium bromide 10 mg/mL.

- *Hoá chất tinh sạch sản phẩm PCR:*

Sử dụng bộ sản phẩm Promega Wizard SV gel clean-up (Promega Inc) Gồm dung dịch gắn kết màng, dung dịch giữa màng, nước cất không có nuclease.

- *Enzym cắt giới hạn:*

+ Enzym *MspAI* nhận biết điểm cắt (CCG↓CTG) có vị trí nucleotid 309 của gen MDM2. Sản xuất bởi Promega-USA.

+ Enzym *BstUI* (CG↓CG) tại vị trí codon 72 của gen TP53. Đây là một sản phẩm của ThermoFisher scientific-Phần Lan.

2.2.5. Cách thức tiến hành nghiên cứu

Cách thức tiến hành nghiên cứu được xây dựng theo các bước sau:

Bước 1. Lựa chọn đối tượng nghiên cứu, tiến hành lấy mẫu.

- Các đối tượng phù hợp và đồng ý tham gia nghiên cứu sẽ được lựa chọn và lấy thông tin theo phiếu (phụ lục 7).

- Mẫu máu của 280 bệnh nhân ung thư gan và 267 người đối chứng được lấy từ tĩnh mạch ngoại vi, và được chống đông bằng EDTA.

- Mẫu máu được bảo quản trong tủ lạnh âm sâu (-80°C) cho đến khi phân tích mẫu.

Bước 2: Tách chiết DNA từ máu ngoại vi

- Tách chiết DNA từ máu toàn phần theo kit Promega (phụ lục 1).

- Đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch của DNA bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang (OD: Optical Density) bước sóng A260/A280 trên máy

Nanodrop 1000. Kết quả OD của mẫu DNA được coi là đạt khi nồng độ từ 20 ng/μl trở lên. Với những mẫu có nồng độ quá cao >300 ng/μl sẽ được pha loãng để đưa nồng độ <100ng/μl. Độ tinh sạch DNA được đo bằng tỷ số A260/A280, và mẫu DNA tinh sạch khi tỷ số này từ 1,8-2,0.

- Điện di DNA trên gel Agarose để kiểm tra sự toàn vẹn của DNA.

Bước 3: Phân tích các đa hình kiểu gen TP53

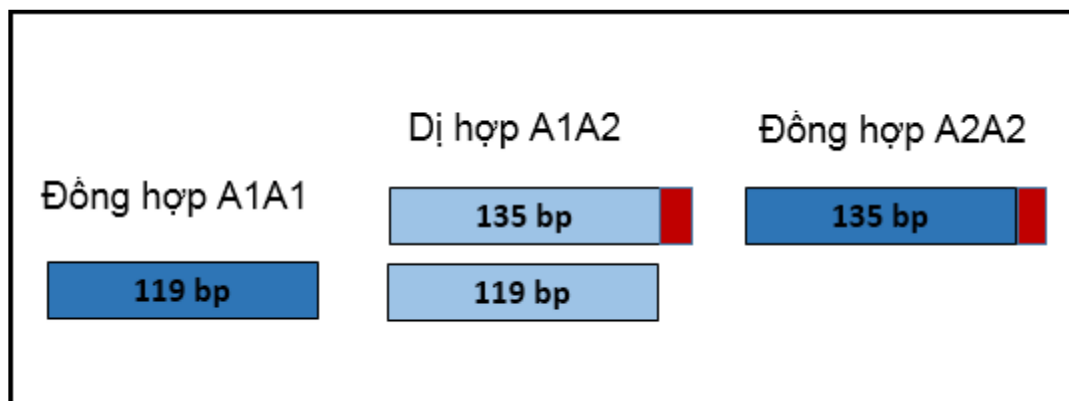
- Thêm đoạn 16 base (*dup16*)

Sử dụng kỹ thuật PCR xác định hiện tượng thêm 16 bp tại vùng intron 3 của gen TP53: DNA sau khi tách chiết sẽ được khuếch đại đoạn gen vùng intron 1, nhờ phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR sẽ được điện di trên gel agarose 1,5% cùng với thang chuẩn 100→1000. (Quy trình tại phụ lục 2, phụ lục 3). Mồi được cung cấp bởi Intergrated DNA Technologies-US.

F 5'-TGGGACTGACTTTCTGCTCTT-3'

R 5'-TCAAATCATCCATTGCTTGG-3'

Hình ảnh điện di nếu có thêm đoạn 16 sẽ có kích thước 135 bp so với đoạn gen nguyên thủy với kích thước chỉ 119 bp. Kiểu gen đồng hợp A1A1 sẽ chỉ có 1 băng 119bp, kiểu gen A1A2 sẽ có hai băng 119 và 135 bp, còn kiểu gen A2A2 sẽ chỉ có một băng với kích thước 135bp.



Hình 2.1. Mô hình phân tích hình ảnh điện di dup 16 của gen TP53

- *SNP D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A.*

Sử dụng kỹ thuật giải trình tự để phân tích kiểu gen của các đa hình nucleotid trên. Danh sách các cặp mồi đặc hiệu thực hiện phản ứng khuếch đại các đoạn gen chứa các SNP D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A được giới thiệu trong bảng 2.1

Bảng 2.1. Trình tự mồi cho phản ứng PCR khuếch đại các SNP

STT	Đa hình thái	Trình tự mồi (5'-3')	Sản phẩm PCR (bp)
1	SNP tại codon 34; 36; 47 gen TP53	F: CAACGTTCTGGTAAGGACAA R: GCCAGGCATTGAAGTCTCAT	511
2	21(GAC→GAT) gen TP53	F: CTGTCTCAGAACCTGGCATG R: GAGCAGTCAGAGGACCAGG	420
3	V217M gen TP53	F: GTTGCAGGAGGTGCTTACG R: CATGGGGTTATAGGGAGGTC	606
4	SNP G360A gen TP53	F: GCTGTATAGGTACTTGAAGTGC R: CTGTTCGATACTGAGGCAAG	433

Sản phẩm PCR giải trình tự sau khi tinh sạch được giải trình tự bằng máy ABI-3100 và được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench. (Quy trình chi tiết tại phụ lục 5, 6). Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự chuẩn của gen TP53 trên GeneBank.

- *R72P của gen TP53.*

Sử dụng kỹ thuật enzym cắt giới hạn PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) xác định SNP R72P của gen TP53 (phụ lục 4). DNA sau khi tách chiết, được khuếch đại nhờ phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu được cung cấp bởi Intergrated DNA Technologies-US.

F 5'-C TG GTA AGG ACA AGG GTT GG-3'

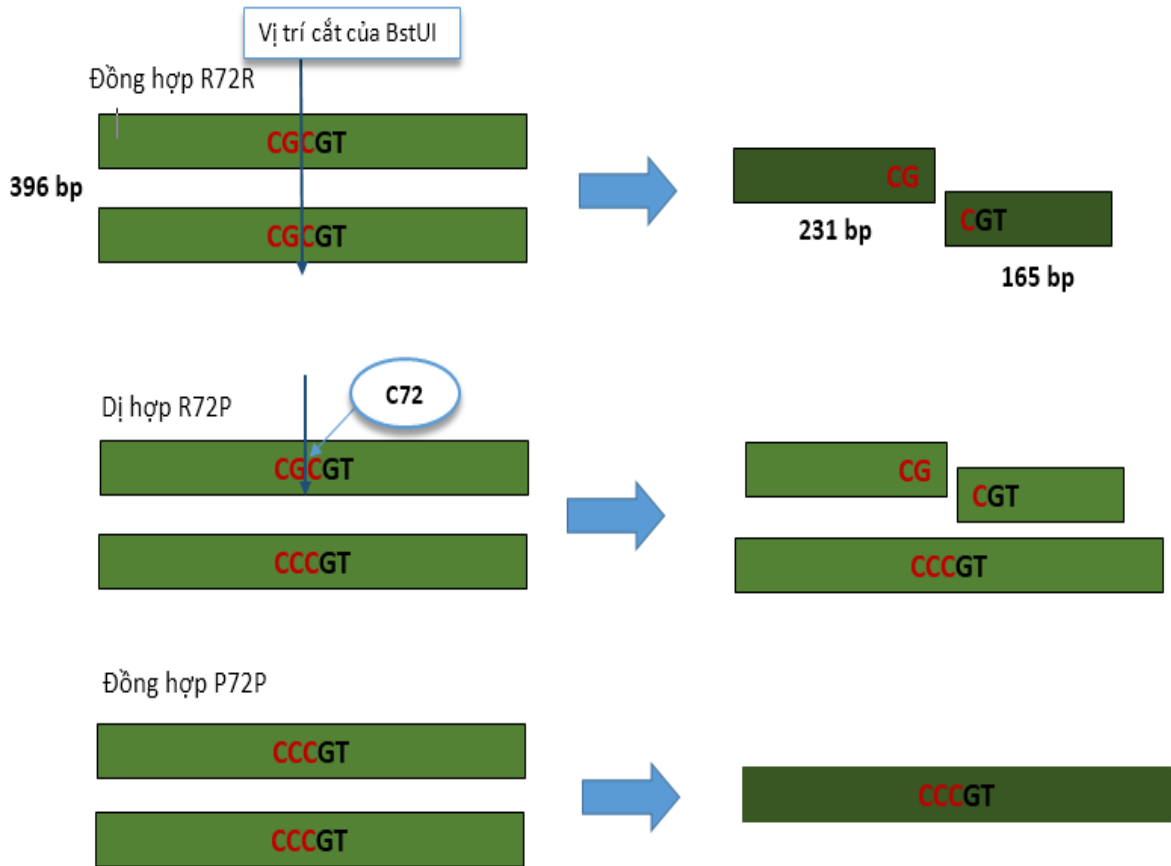
R 5'-ACT GAC CGT GCA AGT CAC AG-3'

Thành phần phản ứng PCR (thể tích 10 μ l) gồm: 1X đệm PCR; 2,5mM dNTP, 0,2 μ M mỗi xuôi và ngược, 0,5U *Taq* polymerase, 20-50ng DNA và H₂O. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C - 5 phút, 35 chu kỳ [94°C - 30 giây, 55°C - 30 giây, 72°C - 30 giây], 72°C - 5 phút. Bảo quản mẫu ở 15°C. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên agarose 1.5% để kiểm tra chất lượng. Kết quả khuếch đại DNA tốt, cho một băng duy nhất có trọng lượng phân tử 396 bp, phù hợp với tính toán lý thuyết.

Sản phẩm PCR được ủ với enzym cắt giới hạn *Bst*UI. Cắt 8 μ l sản phẩm PCR bằng 8U enzym giới hạn *Bst*UI ở điều kiện 37°C trong khoảng thời gian 18-22 giờ. Sản phẩm cắt được điện di cùng với thang chuẩn 100-1000 bp trên gel agarose 2%. Các băng DNA được nhuộm ethidium bromide và chụp ảnh bằng hệ thống máy EC3 Imaging system.

Đoạn gen được nghiên cứu chứa trình tự nhận biết của enzyme *Bst*UI (CG↓CG). Đó chính là vị trí codon 72 của gen TP53. Khi *Bst*UI cắt đoạn gen sẽ tạo ra các đoạn DNA có kích thước 165 bp và 231 bp, tương ứng với allen 72R (GG). Khi base G bị thay thế bởi base C sẽ làm mất trình tự nhận biết của enzyme *Bst*UI, do đó đoạn gen sẽ không bị cắt, tương ứng với kiểu allen 72P (CC) (Hình 2.2). Kiểu gen đồng hợp R72R có hai băng 165bp và 231bp. Kiểu gen dị hợp R72P có 3 băng 165bp, 231bp và 396 bp. Kiểu gen P72P chỉ có một băng 396 bp.

Kết quả được kiểm tra lại bằng giải trình tự trực tiếp.



Hình 2.2. Mô tả hình ảnh điện di sản phẩm cắt giới hạn của R72P

Bước 4. Phân tích kiểu gen MDM2.

Sử dụng kỹ thuật enzym cắt giới hạn (PCR-RELP) để xác định kiểu gen SNP 309 T>G của gen MDM2. Dùng phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen có chứa SNP 309 T>G của gen MDM2 bằng cặp mồi đặc hiệu của Intergrated DNA Technologies-US. Đoạn gen thu được có kích thước 157 bp.

F: 5'-CGCGGGAGTTCAGGGTAAAG-3'

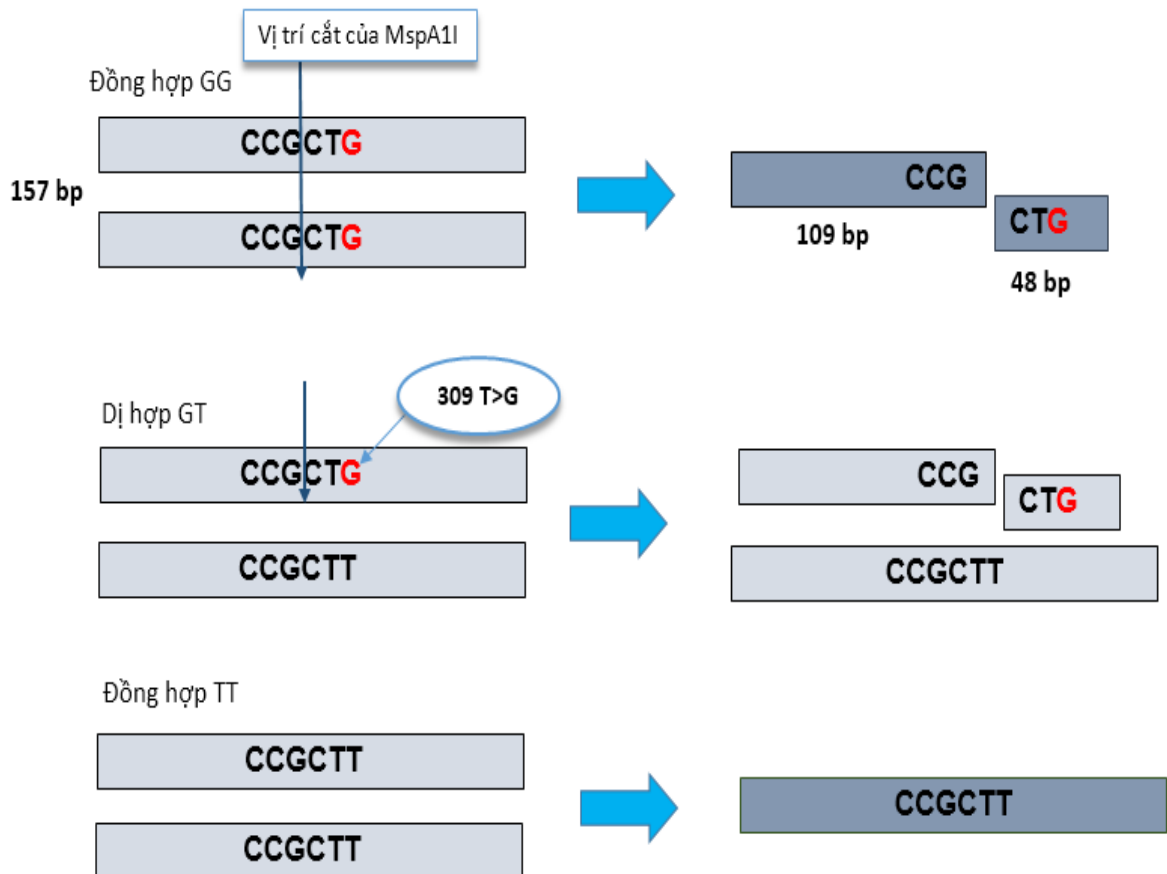
R: 5'-CTGAGTCAACCTGCCCACTG-3'

Phân tích RFLP: Sản phẩm PCR được ủ với enzym cắt giới hạn MspAI ở điều kiện 37°C từ 18 đến 22 giờ. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose

2% cùng với thang chuẩn 100bp. Các băng DNA được nhuộm ethidium bromide và chụp ảnh bằng hệ thống máy EC3 Imaging system. Đoạn gen được nghiên cứu chứa trình tự nhận biết của enzym MspAI (CCG↓CTG) tại vị trí nucleotid 309. Khi MspAI cắt đoạn gen sẽ tạo ra các đoạn DNA có kích thước 109 bp và 48 bp, tương ứng với allen G. Khi G bị thay thế bởi T sẽ làm mất trình tự nhận biết của enzym MspAI, do đó đoạn gen sẽ không bị cắt, tương ứng với allen T có kích thước 157 bp.

Kiểu gen đồng hợp TT có một băng duy nhất 157 bp. Nếu hình ảnh điện di có 3 băng 157, 109 và 48 bp, tương ứng với kiểu gen dị hợp GT. Nếu kết quả có 2 băng 109 bp và 48 bp thì tương ứng với kiểu gen đồng hợp GG (hình 2.3).

Kết quả được kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp.



Hình 2.3. Mô tả hình ảnh điện di sản phẩm cắt giới hạn MDM2 309 T>G

Bước 5. Xử lý số liệu tìm ra sự khác biệt của tỷ lệ phân bố các kiểu gen giữa nhóm bệnh và nhóm chứng, sự liên quan đến UTTBGNP của các kiểu gen TP53 và MDM2.

Sử dụng phần mềm thống kê SPSS 16,0 để phân tích số liệu. Dùng kiểm định χ^2 để so sánh tỷ lệ kiểu gen TP53 của hai nhóm UTTBGNP và không bị UTTBGNP. Để ước tính mối liên quan giữa các kiểu gen và khả năng mắc UTTBGNP dùng tỷ suất OR với khoảng tin cậy 95%. Dùng mô hình hồi quy logistic đa biến để loại trừ ảnh hưởng của các biến là yếu tố nguy cơ từ môi trường. Sử dụng kiểm định T test để so sánh trung vị của tuổi mắc bệnh. Các kiểm định có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Bước 6. Đánh giá mối tương quan giữa các kiểu gen TP53, MDM2 và một số các yếu tố nguy cơ gây UTTBGNP.

- Sử dụng phiếu thông tin bệnh nhân (phụ lục 7) và hồi cứu bệnh án điều trị, để ghi nhận, thu thập các thông tin về các yếu tố nguy cơ.

- Tiến hành so sánh tìm sự khác biệt tỷ lệ kiểu gen trong nhóm bệnh nhân có liên quan và không liên quan đến các yếu tố nguy cơ. Các yếu tố nguy cơ được chọn để đánh giá gồm: nhiễm HBV, HCV, tình trạng lạm dụng bia rượu, xơ gan, tuổi, giới, nồng độ AFP. Các yếu tố nhiễm HBV, HCV, xơ gan, lạm dụng bia rượu đánh giá dựa trên có hoặc không có. Tuổi, được đánh giá theo mức chia trên và dưới 40 tuổi và khác biệt độ tuổi trung bình mắc bệnh của các kiểu gen. Giới tính, được đánh giá theo nam so với nữ. Nồng độ AFP, được đánh giá ở trên và dưới 400 ng/ml và khác biệt nồng độ trung bình giữa các kiểu gen.

- Xác định xơ gan khi bệnh nhân có triệu chứng của hội chứng suy tế bào gan và hội chứng tăng áp lực tĩnh mạch cửa + hình ảnh điển hình trên siêu âm hoặc phim chụp cắt lớp vi tính.

- Xác định nhiễm HBV, HCV bằng test nhanh của Abbott.

- Tiêu chuẩn xác định đối tượng có lạm dụng rượu bia. Nam > 61g/24 giờ. Nữ > 41g/24 giờ. Quy đổi thực tế, hàm lượng rượu nguyên chất 20g rượu (50ml rượu Vodka), 15g rượu (330ml bia), 12.5g rượu (100ml rượu vang). Đối tượng uống rượu hằng ngày trong hơn 10 năm liên tục.

- Nồng độ AFP được xác định bằng máy xét nghiệm miễn dịch điện hoá phát quang, Elecsys 601 của Roche.

Quy trình nghiên cứu



Hình 2.4. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Thời gian thực hiện đề tài từ 11/2013 đến 11/2016.

Địa điểm nghiên cứu: Bộ môn Hóa Sinh trường Đại học Y Hà Nội.
Trung tâm nghiên cứu Gen và Protein, trường Đại Học Y Hà Nội.

2.4. ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

- ❖ Việc thực hiện nghiên cứu này đã được thông qua bởi Hội Đồng Đạo Đức theo Quyết định số 188/HĐĐĐĐHYHN, ngày 31/1/2013 của Hội đồng Đạo đức Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- ❖ Các đối tượng tham gia nghiên cứu là hoàn toàn tự nguyện và có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia nghiên cứu.
- ❖ Các thông tin liên quan đến bệnh nhân được đảm bảo bí mật.
- ❖ Các kỹ thuật, thao tác liên quan đến bệnh nhân được bảo đảm đúng chuyên môn.
- ❖ Đề tài nghiên cứu này được thực hiện hoàn toàn vì mục đích khoa học chứ không vì mục đích nào khác.

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”.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. ĐẶC ĐIỂM NHÓM ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Nhóm bệnh nhân UTTBGNP được thu thập ngẫu nhiên, theo các tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ của nghiên cứu. Nhóm chứng được lựa chọn có độ tuổi và tỷ lệ giới gần tương đồng với nhóm bệnh, phù hợp với một nghiên cứu bệnh chứng.

Bảng 3.1. Đặc điểm tuổi của nhóm đối tượng nghiên cứu

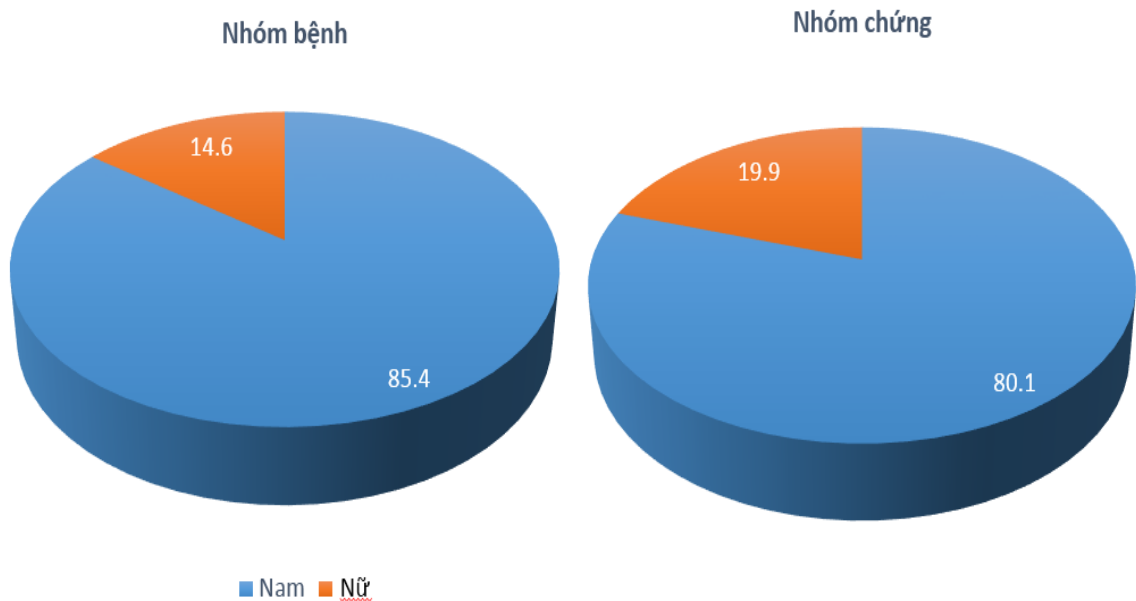
Đặc điểm	Bệnh (<i>n</i> = 280)	Chứng (<i>n</i> = 267)	<i>p</i>-value
Độ tuổi trung bình (<i>năm</i>)	57 ± 11,6	56 ± 15,5	0,2
<40	23 (8,2%)	45 (16,9%)	
>40	257 (91,8%)	222 (83,1%)	
Khoảng tuổi	23 – 82	19 – 96	
Tuổi gặp nhiều nhất (mode)	60	64	

Nhận xét:

Trong 547 đối tượng nghiên cứu có 280 bệnh nhân UTTBGNP và 267 người đối chứng. Kết quả cho thấy độ tuổi độ tuổi trung bình của nhóm bệnh cao hơn nhóm chứng, tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Ngoài ra, tỷ lệ đối tượng có độ tuổi trên 40 của nhóm bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát cao hơn nhóm chứng. Biến độ tuổi của nhóm đối tượng nghiên cứu tuân theo quy luật chuẩn Gauss, với độ tuổi thường gặp là 60. Bệnh nhân nhỏ tuổi nhất mắc bệnh được ghi nhận là 23 tuổi, cao tuổi nhất là 82.

Bảng 3.2. Đặc điểm giới tính nhóm đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm giới	Bệnh (<i>n</i> = 280)	Chứng (<i>n</i> = 267)	<i>p</i>-value
Nam	239 (85,4%)	214 (80,1%)	0,06
Nữ	41 (14,6%)	53 (19,9%)	
Tỷ lệ Nam/Nữ	5,8/1	4,0/1	

**Hình 3.1. Biểu đồ tỷ lệ giới tính của nhóm nghiên cứu**

Nhận xét:

Kết quả cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ giới tính của nhóm bệnh và nhóm chứng ($p = 0,06$). Tuy nhiên hai tỷ lệ cũng khá xa nhau. Thể hiện là giá trị p tiệm cận mức ý nghĩa 95%. Kết quả cũng cho thấy, trong nhóm ung thư tế bào gan nguyên phát, số bệnh nhân nam giới cao hơn nhiều so với nữ giới. Tỷ lệ nam/nữ là 5,8/1.

Bảng 3.3. Một số yếu tố nguy cơ ghi nhận ở bệnh nhân UTTBGNP

Yếu tố nguy cơ	Bệnh nhân (n = 280)		Chứng (n = 267)	
	n	%	n	%
Lạm dụng bia rượu	23	8,2	9	3,3
Nhiễm HBV	171	61,1	36	13,5
Nhiễm HCV	12	4,3	4	1,5
Có xơ gan	194	69,3	0	0
Nồng độ AFP > 400ng/ml	143	51,1	0	0

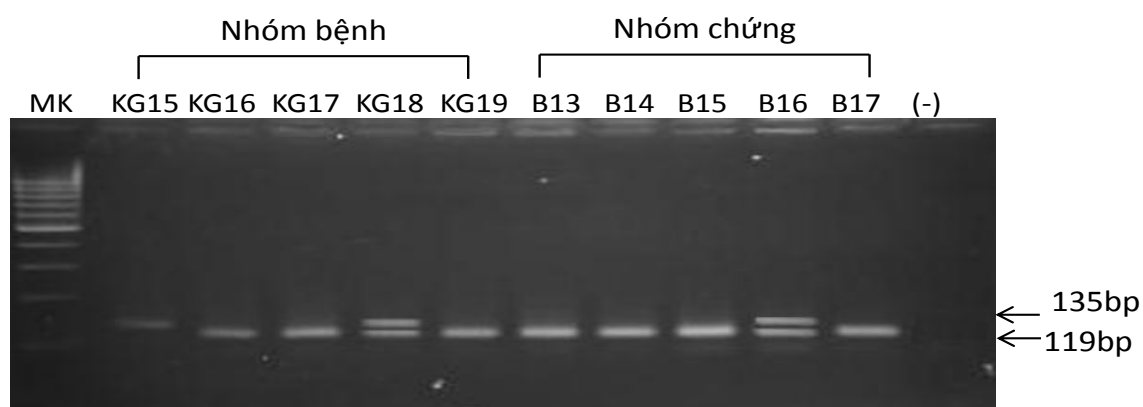
Nhận xét:

Từ những thông tin thu thập được trong bệnh án điều trị và qua phỏng vấn bệnh nhân cho thấy, bệnh nhân UTTBGNP có HBV dương tính khá cao, 171/280 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 61,1%, cao nhất trong số các yếu tố nguy cơ ung thư tế bào gan nguyên phát được phân tích. Tỷ lệ nhiễm HCV và nghiện rượu thấp, lần lượt là 4,3% và 8,2%. Tỷ lệ bệnh nhân UTTBGNP có tình trạng xơ gan là 69,3%. Kết quả xét nghiệm AFP > 400ng/ml được ghi nhận ở 143 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 51,1%.

3.2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐA HÌNH KIỂU GEN TP53

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

DNA sau khi tách chiết được khuếch đại đoạn gen vùng gen không mã hoá thứ 3 của gen TP53 bằng kỹ thuật PCR. Đa hình kiểu gen có thêm đoạn hay không có, được xác định bằng hình ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 3%. Tiến hành trên tổng số 547 mẫu DNA của nhóm chứng và nhóm bệnh, kết quả được minh hoạ trong hình 3.2 và tổng hợp trong bảng 3.4.



Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của đoạn gen intron 3 có chứa đa hình dup 16 của gen TP53

MK: Marker 100-1000bp; (-) nước cất làm chứng âm.

Nhận xét:

Mẫu bệnh nhân mã số KG15 có một vạch kích thước 135bp tương ứng với kiểu gen đồng hợp A2A2. Mẫu bệnh nhân mã số KG18 và mẫu chứng B16 có hai vạch 135bp và 119bp tương ứng với kiểu gen dị hợp A2A1. Các mẫu còn lại là kiểu gen A1A1 do chỉ có một vạch kích thước 119bp.

Bảng 3.4. Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của đa hình dup16 gen TP53

Kiểu gen	Nhóm bệnh (n = 280)		Nhóm chứng (n = 267)		Tổng số nhóm nghiên cứu (n = 547)	
	N	%	n	%	n	%
Alen A2	17	3,0	5	0,9	22	2,0
Alen A1	543	97,0	529	99,1	1072	97,8
A2A2	1	0,3	0	0	1	0,2
A2A1	15	5,0	5	1,9	20	3,6
A1A1	264	94,7	262	98,1	526	96,2

Nhận xét:

Tỷ lệ kiểu gen có thêm đoạn 16bp tại vùng không mã hoá thứ ba của gen TP53, gặp rất thấp trong nhóm đối tượng nghiên cứu. Đặc biệt kiểu gen đồng hợp có thêm đoạn A2A2 chỉ gặp duy nhất một trường hợp ở nhóm bệnh nhân ung thư gan. Kiểu gen dị hợp A1A2 cũng chỉ có 20 trường hợp, chiếm 3,6% tổng số đối tượng tham gia nghiên cứu. Khi tách riêng các alen, thì alen có thêm đoạn 16bp (A2) cũng chỉ có tần xuất 2,0%. Kiểu gen và alen nguyên thủy vẫn chiếm đa số trong nhóm đối tượng nghiên cứu.

Bảng 3.5. Đa hình kiểu gen dup16 liên quan đến UTTBGNP

Kiểu gen	Nhóm bệnh (280)		Nhóm chứng (267)		OR <i>CI (95%)</i>	OR* <i>CI (95%)</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
A2A1	15	5,0	5	1,9	2,97 (1,07-8,3)	2,1 (0,8-6,4)
A1A1	264	94,7	262	98,1	1,00	1,00

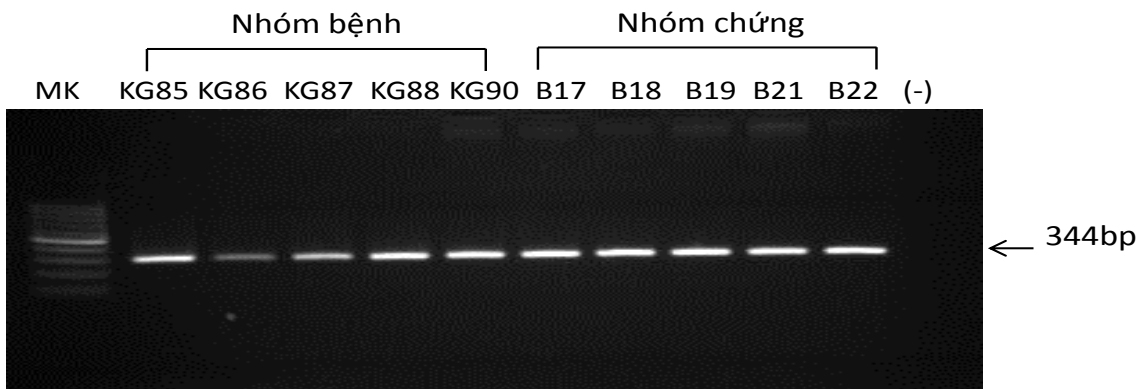
OR được điều chỉnh từ các biến: tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu, theo mô hình hồi quy logistic đa biến.*

Nhận xét:

Kiểu gen đồng hợp có thêm đoạn A2A2, chỉ gặp một trường hợp tại nhóm bệnh, nên không thể tính được tỷ xuất chênh OR cũng như kiểm định χ^2 không có giá trị. Tuy nhiên khi so sánh hai kiểu gen còn lại thì phát hiện, kiểu gen dị hợp A1A2 gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh ($p = 0,02$). Phân tích khả năng mắc UTTBGNP thấy, có khả năng mắc ung thư cao hơn kiểu gen đồng hợp không có đột biến A1A1. OR = 2,97; 95%; CI (1,03-6,4). Tuy nhiên khi đưa vào mô hình hồi quy logistic đa biến thấy không có ý nghĩa thống kê. Ngoài ra, ý nghĩa của số liệu bị hạn chế bởi tần xuất quá thấp của kiểu gen có thêm đoạn 16bp tại vùng không mã hoá thứ ba, gen TP53.

3.2.2. Đa hình kiểu gen tại SNP D21D

Sử dụng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp để phân tích kiểu gen tại SNP 21 (GAC>GAT) của gen TP53. Trước tiên, sản phẩm khuếch đại gen được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%, kết quả như sau:

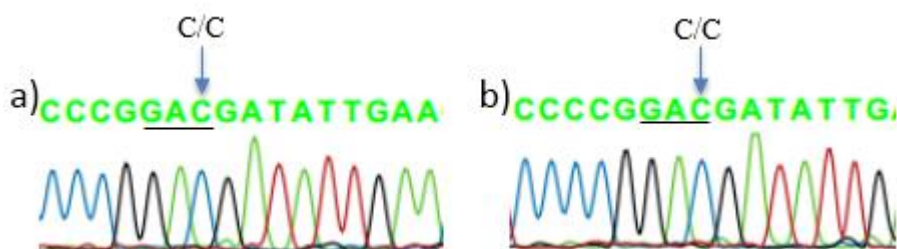


Hình 3.3. Hình ảnh PCR khuếch đại exon 2 có chứa vùng SNP D21D của gen TP53

MK: Marker 100-1000bp; (-) nước cất làm chứng âm.

Nhận xét:

Hình ảnh điện di cho thấy, đã khuếch đại được đoạn gen đặc hiệu kích thước 344 bp. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch, giải trình tự bằng máy ABI-3100 và được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự chuẩn của gen TP53 trên GeneBank (hình 3.4).



Hình 3.4. Hình ảnh giải trình tự các kiểu gen của SNP D21D gen TP53

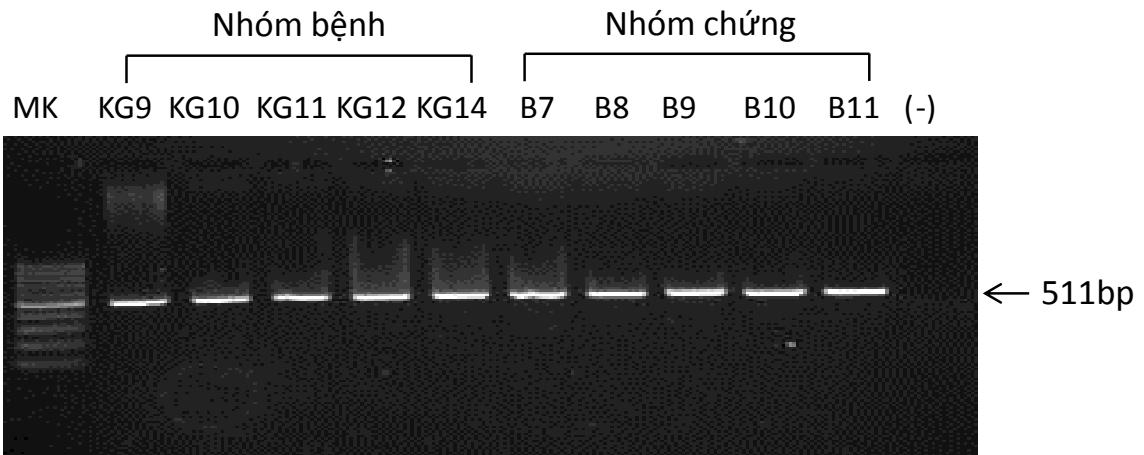
a) Mẫu đại diện bệnh nhân ung thư gan mã số KG85; b) mẫu đại diện cho nhóm chứng mã số B17

Nhận xét:

Hình ảnh giải trình tự cho thấy mẫu bệnh nhân ung thư gan và mẫu chứng đều có kiểu gen D21D (CC), khi so với trình tự gốc. Không có sự thay đổi trình tự nucleotid C thành A tại vị trí số 3 của codon 21. Kết quả tương tự khi phân tích ở các đối tượng nghiên cứu khác trong nhóm chứng và nhóm bệnh nhân.

3.2.3. Đa hình kiểu gen của SNP P34P, P36P và P47S

Cả ba SNP, P34P (CCC>CCA), P36P (CCG>CCA) và P47S (CCG>CTG) cùng nằm trên exon 4 của TP53 nên được xác định bằng 1 phản ứng giải trình tự gen. Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen exon 4 có kích thước 511bp với cặp mồi đặc hiệu được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5% như sau:

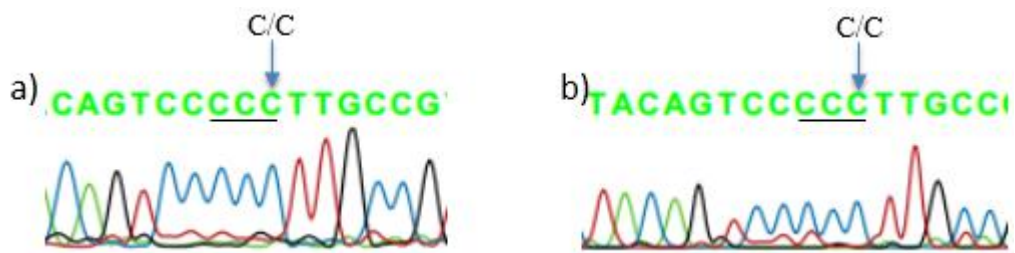


Hình 3.5. Hình ảnh PCR khuếch đại exon 4 của gen TP53

MK: Marker 100-1000bp; (-) nước cất làm chứng âm.

Nhận xét:

Hình ảnh điện di cho thấy, đã khuếch đại được đoạn gen đặc hiệu kích thước 511 bp. Sản phẩm PCR giải trình tự sau khi tinh sạch được giải trình tự bằng máy ABI-3100 và được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự chuẩn của gen TP53 trên GeneBank.

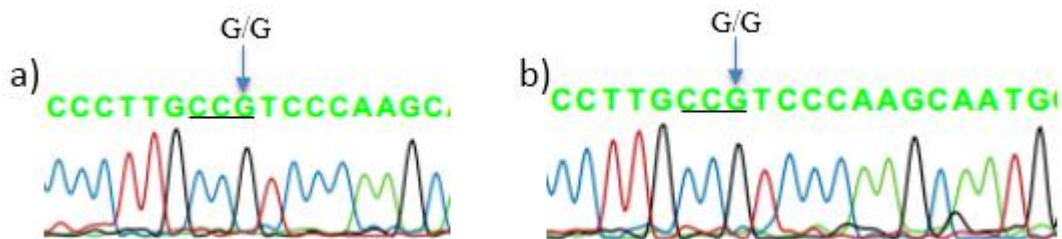


Hình 3.6. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen của SNP P34P gen TP53

a) Mẫu đại diện bệnh nhân ung thư gan mã số KG9; b) mẫu đại diện cho nhóm chứng mã số B7

Nhận xét:

Hình ảnh giải trình tự cho thấy mẫu bệnh nhân ung thư gan và mẫu chứng đều có kiểu gen P34P (CC), khi so với trình tự gốc. Không có sự thay đổi trình tự nucleotid C thành A tại vị trí số 3 của codon 34. Kết quả tương tự khi phân tích ở các đối tượng nghiên cứu khác trong nhóm chứng và nhóm bệnh nhân.



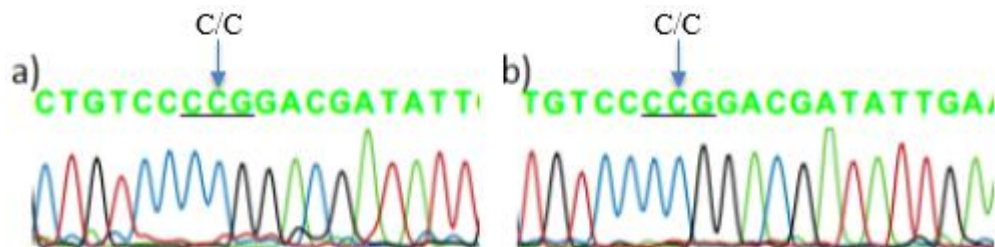
Hình 3.7. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen của SNP P36P gen TP53

a) Mẫu đại diện bệnh nhân ung thư gan mã số KG9; b) mẫu đại diện cho nhóm chứng mã số B7

Nhận xét:

Hình ảnh giải trình tự cho thấy mẫu bệnh nhân ung thư gan và mẫu chứng đều có kiểu gen P36P (GG), khi so với trình tự gốc. Không có sự thay

đổi trình tự nucleotid G thành A tại vị trí số 3 của codon 36. Kết quả tương tự khi phân tích ở các đối tượng nghiên cứu khác trong nhóm chứng và nhóm bệnh nhân.



Hình 3.8. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen của SNP P47S gen TP53

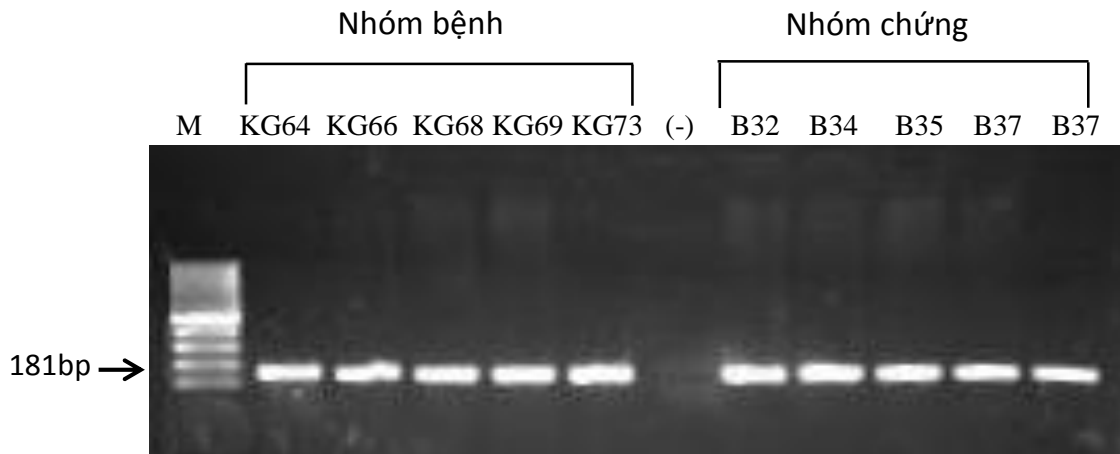
a) Mẫu đại diện bệnh nhân ung thư gan mã số KG9; b) mẫu đại diện cho nhóm chứng mã số B7

Nhận xét:

Hình ảnh giải trình tự cho thấy mẫu bệnh nhân ung thư gan và mẫu chứng đều có kiểu gen P47P (CC), khi so với trình tự gốc. Không có sự thay đổi trình tự nucleotid C thành T tại vị trí số 2 của codon 47. Kết quả tương tự khi phân tích ở các đối tượng nghiên cứu khác trong nhóm chứng và nhóm bệnh nhân. Kết quả phân tích kiểu gen của nhóm đối tượng nghiên cứu cho thấy, cả ba SNP này đều không xuất hiện trên quần thể nghiên cứu (bảng 3.6).

3.2.4. Kết quả phân tích kiểu gen của SNP V217M

SNP V217M (GTG>ATG) tại exon 6, được phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp. Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen exon 6 có kích thước 181 bp với cặp môi đặc hiệu và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%.

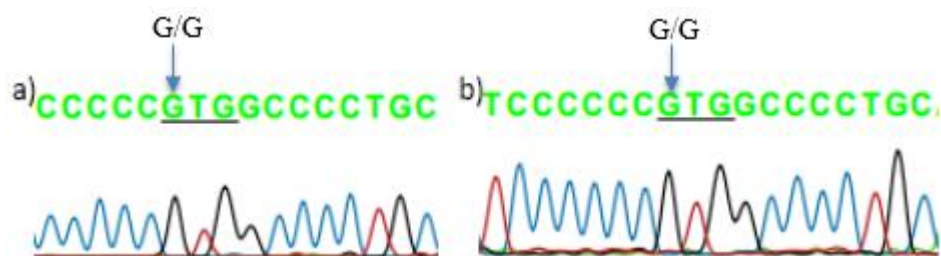


Hình 3.9. Hình ảnh PCR khuếch đại exon 6 chứa vùng SNP V217M của gen TP53.

MK: Marker 100-1000bp; (-) nước cất làm chứng âm.

Nhận xét:

Hình ảnh điện di cho thấy, đã khuếch đại được đoạn gen đặc hiệu kích thước 181bp. Sản phẩm PCR giải trình tự sau khi tinh sạch được giải trình tự bằng máy ABI-3100 và được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự chuẩn của gen TP53 trên GeneBank.



Hình 3.10. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen của SNP V217M gen TP53

a) Mẫu đại diện bệnh nhân ung thư gan mã số KG64;

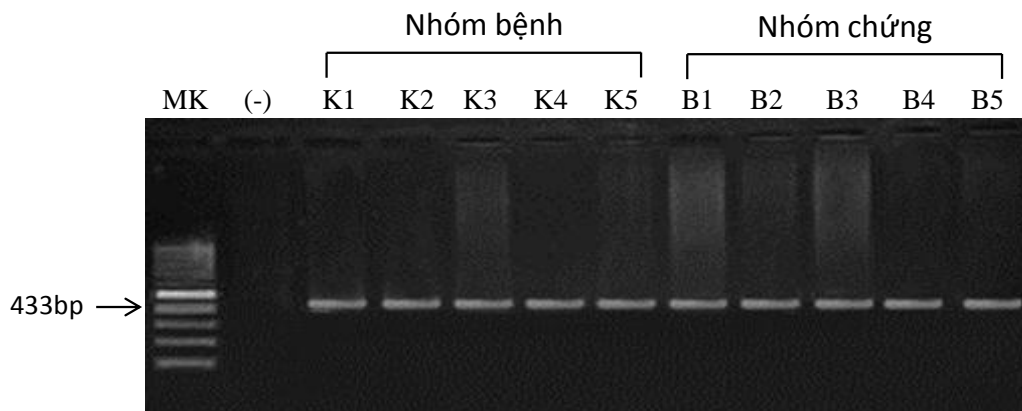
b) mẫu đại diện cho nhóm chứng mã số B32

Nhận xét:

Hình ảnh giải trình tự cho thấy mẫu bệnh nhân ung thư gan và mẫu chứng đều có kiểu gen V217V (GG), khi so với trình tự gốc. Không có sự thay đổi trình tự nucleotid G thành A tại vị trí số 1 của codon 217. Kết quả tương tự khi phân tích ở các đối tượng nghiên cứu khác trong nhóm chứng và nhóm bệnh nhân.

3.2.5. Kết quả phân tích kiểu gen của SNP G360A (GGG>GCG)

Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen exon 10 của TP53, có chứa codon 360 để phân tích. Sản phẩm khuếch đại tương ứng có kích thước 433bp, được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%.

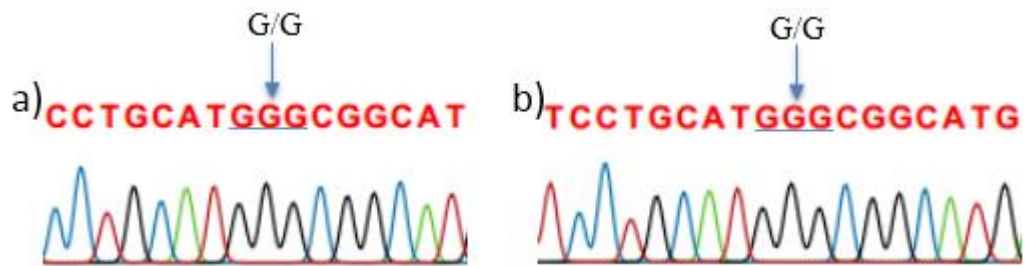


Hình 3.11. Hình ảnh PCR khuếch đại exon 10 chứa vùng SNP G360A của gen TP53.

MK: Marker 100-1000bp; (-) nước cất làm chứng âm.

Nhận xét:

Hình ảnh điện di cho thấy, đã khuếch đại được đoạn gen đặc hiệu kích thước 433bp. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch, giải trình tự bằng máy ABI-3100 và được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự chuẩn của gen TP53 trên GeneBank.



Hình 3.12. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen của SNP G360A gen TP53

a) Mẫu đại diện bệnh nhân ung thư gan mã số K4; b) mẫu đại diện cho nhóm chứng mã số B4

Nhận xét:

Hình ảnh giải trình tự cho thấy mẫu bệnh nhân ung thư gan và mẫu chứng đều có kiểu gen G360G (GG), khi so với trình tự gốc. Không có sự thay đổi trình tự nucleotid G thành C tại vị trí số 2 của codon 360. Kết quả tương tự khi phân tích ở các đối tượng nghiên cứu khác trong nhóm chứng và nhóm bệnh nhân.

Bảng 3.6. Bảng tổng hợp kiểu gen của các SNP tại codon 21, 34, 36, 47, 72, 217, 360 gen TP53

Thay thế nucleotid của các SNP	Kiểu gen đồng hợp nguyên thủy		Kiểu gen dị hợp		Kiểu gen đồng hợp đột biến	
	n	%	n	%	n	%
D21D(C>T)	C/C		C/T		T/T	
	547	100	0	0	0	0
P34P(C>A)	C/C		C/A		A/A	
	547	100	0	0	0	0
P36P(G>A)	G/G		G/A		A/A	
	547	100	0	0	0	0
P47S(C>T)	C/C (P47P)*		C/T (P47S)*		T/T (S47S)*	
	547	100	0	0	0	0
V217M(G>A)	G/G (V217V)*		G/A (V217M)*		A/A (M217M)*	
	547	100	0	0	0	0
G360A(G>C)	G/G (G360G)*		G/C (G360A)*		C/C (A360A)*	
	547	100	0	0	0	0

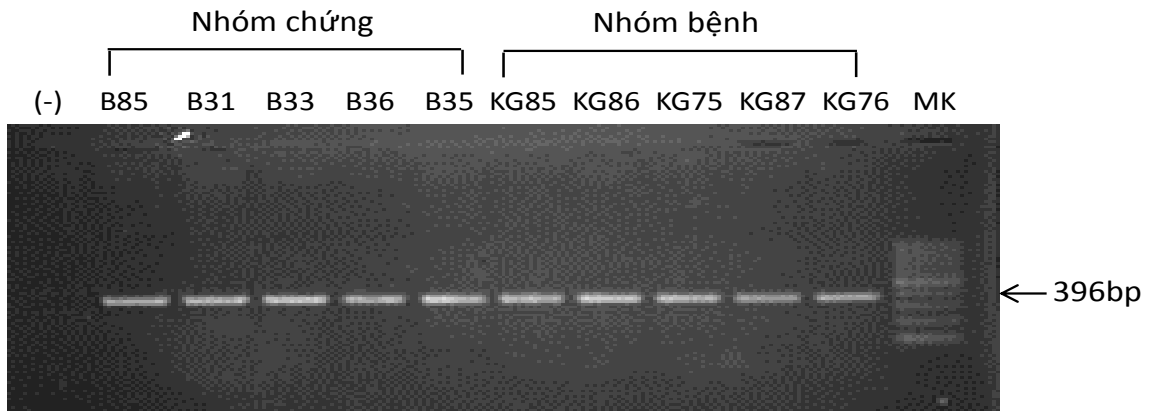
(*) Kiểu gen theo acid amin được mã hoá ở những SNP có thay đổi trình tự acid amin.

Nhận xét:

Kết quả bảng 3.6 cho thấy, tất cả các SNP này đều không xuất hiện trên nhóm đối tượng nghiên cứu và không có liên quan với ung thư tế bào gan nguyên phát.

3.2.6. Kết quả phân tích kiểu gen của SNP R72P

Sử dụng kỹ thuật enzym cắt giới hạn (PCR-RFLP) để xác định đa hình nucleotid đơn R72P. Thực hiện phản ứng PCR để khuếch đại đoạn gen có chứa R72P. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,5% để kiểm tra.

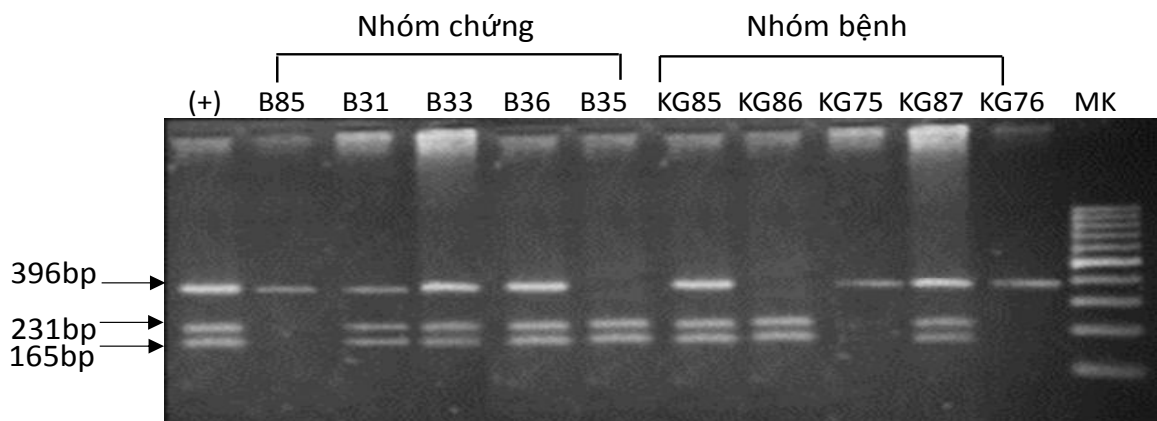


Hình 3.13. Hình ảnh PCR khuếch đại đoạn gen mang SNP R72P của gen TP53.

MK: Marker 100-1000bp; (-) nước cất làm chứng âm

Nhận xét:

Hình ảnh điện di cho thấy, đã khuếch đại được đoạn gen đặc hiệu với kích thước 396bp. Sử dụng enzym cắt giới hạn để cắt đoạn gen vừa khuếch đại, tại vị trí nucleotid đặc hiệu (CG↓CG). Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 3% (hình 3.14).

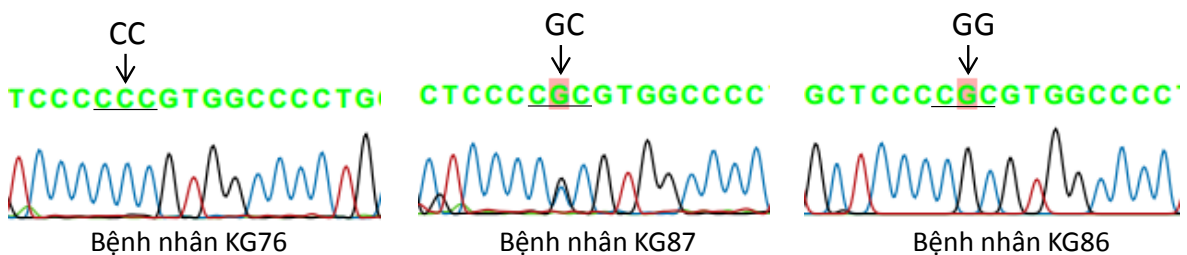


Hình 3.14. Sản phẩm cắt đoạn gen mang SNP R72P bằng enzym *Bst*UI.

MK: Thang chuẩn 100-1000bp; (+) mẫu đã biết trước kiểu gen dị hợp R72P (GC) làm chứng dương. Kiểu gen đồng hợp tử P72P (CC) có một vạch, xuất hiện ở mẫu chứng B85 và mẫu bệnh KG75, KG76. Kiểu gen dị hợp tử R72P (GC) có ba vạch, xuất hiện tại mẫu chứng B31, B33, B36 và mẫu bệnh KG85, KG87. Kiểu gen đồng hợp tử R72R (GG) có hai vạch xuất hiện tại mẫu chứng B35 và mẫu bệnh KG86.

Nhận xét:

Các băng điện di rõ nét và phù hợp với tính toán lý thuyết. Kết quả thu được cả ba kiểu gen với ba kiểu băng tương ứng, ở cả nhóm bệnh nhân ung thư gan và nhóm chứng. Kết quả cắt bằng enzym giới hạn được kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự với các mẫu đại diện cho mỗi kiểu gen.



Hình 3.15. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen SNP R72P

Kiểu gen P72P (CC) có một đỉnh nucleotid C duy nhất tại vị trí nucleotid thứ hai của condon 72 (bệnh nhân KG76); Kiểu gen R72P (GC) có hai đỉnh nucleotid G và nucleotid C (bệnh nhân KG87); Kiểu gen R72R (GG) có một đỉnh nucleotid G duy nhất (bệnh nhân KG86).

Nhận xét:

Các mẫu được kiểm tra lại bằng kỹ giải trình tự trực tiếp cho kết quả tương đồng với kết quả phân tích kiểu gen bằng PCR-RFLP. Các băng chứng thăm tra này khẳng định sự tin cậy của phương pháp PCR-RFLP.

Tiến hành trên tất cả 547 mẫu DNA của cả nhóm bệnh nhân ung thư gan và nhóm chứng chúng tôi thu được kết quả trình bày ở bảng 3.7.

Bảng 3.7. Tỷ lệ các kiểu gen của SNP R72P ở nhóm đối tượng nghiên cứu

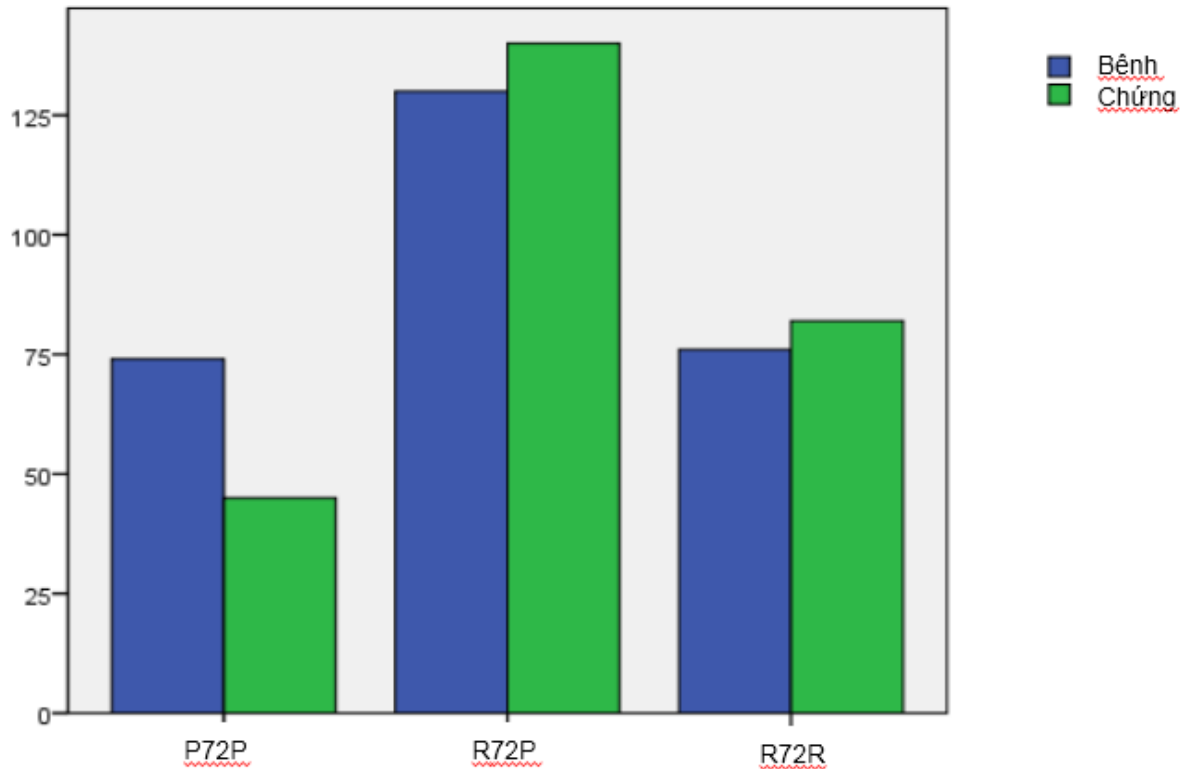
Kiểu gen	Tổng số nhóm nghiên cứu (n = 547)	
	n	%
Alen P	508	46,4
Alen R	586	53,6
P72P	119	21,7
P72R	270	49,3
R72R	158	29,0

Nhận xét:

Trong tất cả các đa hình nucleotid đơn của gen TP53, SNP R72P có tỷ lệ các biến thể khá cân bằng. Tuy nhiên alen R xuất hiện trong nhóm nghiên cứu cao hơn alen P (53,6% và 46,4%). Kiểu gen đồng hợp P/P cũng có tần xuất thấp hơn kiểu gen đồng hợp R/R. Kiểu gen dị hợp R/P là gặp nhiều nhất (49,3%).

Bảng 3.8. Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của SNP TP53-R72P giữa nhóm bệnh và chứng

Kiểu gen	Nhóm bệnh (280)		Nhóm chứng (267)		p
	n	%	n	%	
Alen P	278	49,6	230	43,0	0,08
Alen R	282	50,4	304	57,0	
P72P	74	26,4	45	16,9	0,02
P72R	130	46,4	140	52,4	
R72R	76	27,1	82	30,7	



Hình 3.16. Biểu đồ phân bố tỷ lệ kiểu gen của SNP R72P ở nhóm bệnh nhân ung thư gan và nhóm chứng

Nhận xét:

Có sự khác biệt có ý nghĩa tỷ lệ kiểu gen giữa nhóm bệnh và nhóm chứng ($p = 0,02$). Kiểu gen P/P có tần xuất cao hơn ở nhóm bệnh so với nhóm chứng. 26,4% so với 16,9%. Trong khi kiểu gen R/R lại xuất hiện với tần xuất cao hơn ở nhóm chứng, 30,7% so với 27,1% ở nhóm bệnh. Kiểu gen dị hợp R/P chiếm tỷ lệ lớn nhất trong cả nhóm bệnh và nhóm chứng 46,4% và 52,4%. Allel P gặp nhiều hơn trong nhóm bệnh nhưng ở mức tiệm cận ý nghĩa 95%. Kết quả cho thấy, có một mối liên quan giữa đa hình nucleotid đơn TP53 R72P với khả năng mắc ung thư tế bào gan nguyên phát.

Bảng 3.9. Các kiểu gen của SNP TP53-R72P với khả năng mắc ung thư tế bào gan nguyên phát

Kiểu gen		OR	OR*, CI (95%)
Allen	R	1,00	1,00
	P	1,30	1,24 (0,78-3,45)
Kiểu gen	R72R	1,00	1,00
	R72P	1,02	1,66 (0,99-2,79)
	P72P	1,77	1,77 (1,03-3,14)
Tổ hợp các kiểu gen	R72R + R72P	1,00	1,00
	P72P	1,77	1,76 (1,08-2,86)
	R72R	1,00	1,00
	R72P + P72P	1,19	1,24 (0,80-1,92)

OR* được điều chỉnh từ các biến: tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu, theo mô hình hồi quy logistic đa biến.

Nhận xét:

Bảng 3.9 cho thấy, kiểu gen P72P có khả năng mắc UTTBGNP cao hơn 1,77 lần, CI (1,03 – 3,14) so với kiểu gen R72R. Phân tích riêng rẽ allen cho thấy: allen P có khả năng mắc bệnh cao hơn allen R. Nhưng không có ý nghĩa thống kê, OR = 1,24; CI (0,78 - 3,45). Tổ hợp các kiểu gen theo mô hình lặn (R72R + R72P) cho thấy người mang kiểu gen đồng hợp trội P72P có khả năng mắc bệnh cao hơn 1,77 lần, CI (1,08 - 2,86) so với người mang hai kiểu gen còn lại. Tuy nhiên khi kết hợp mô hình trội (P72P + P72R) so với kiểu gen lặn R72R, không thấy có ý nghĩa thống kê.

Để phân tích sâu hơn về liên quan giữa kiểu gen và khả năng mắc bệnh, chúng tôi tìm kiếm sự khác biệt độ tuổi trung bình của các kiểu gen. Độ tuổi

là một biến liên tục, tuân theo quy luật chuẩn Gauss nên chúng tôi dùng kiểm định *T* test để so sánh độ tuổi trung bình của các kiểu gen TP53-R72P trong nhóm bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát.

Bảng 3.10. Độ tuổi trung bình của bệnh nhân UTTBGNP mang các kiểu gen TP53-R72P

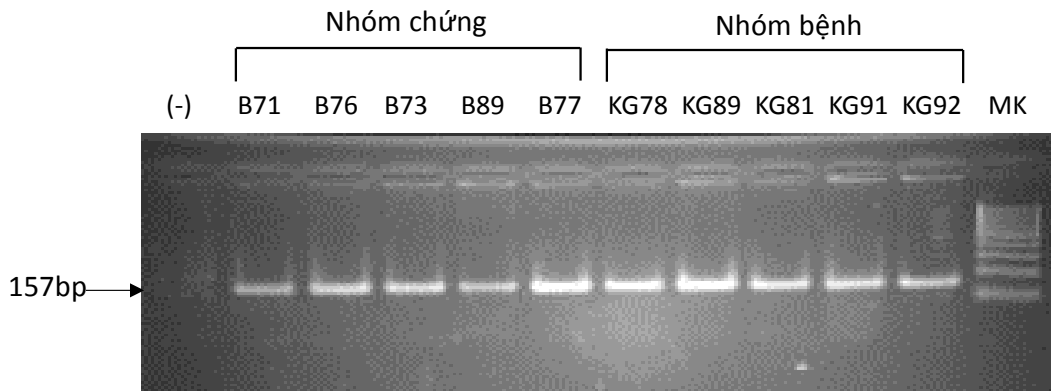
		Độ tuổi trung bình <i>(Mean ± SD)</i>	<i>p</i>
Kiểu gen TP53-R72P	P72P	53,1 ± 14,3	0,01
	R72P	57,6 ± 9,9	
	R72R	60,8 ± 10,2	

Nhận xét:

Khi so sánh tuổi trung bình của các nhóm bệnh nhân mang ba kiểu gen của TP53-R72P thấy, bệnh nhân mang kiểu gen P72P có độ tuổi trung bình là thấp nhất (53,1). Bệnh nhân mang kiểu gen nguyên thủy R72R có độ tuổi trung bình cao nhất (60,8) và nhiều hơn kiểu gen P72P là 7,7 năm ($p = 0,01$).

3.3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐA HÌNH KIỂU GEN MDM2

SNP 309T>G nằm ở vùng khởi động (promoter) và là vùng có vị trí liên kết với p53 của MDM2. SNP 309T>G của gen MDM2 được phân tích bằng kỹ thuật enzym cắt giới hạn (PCR-RFLP). Sử dụng phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen intron 1 của MDM2 với với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm khuếch đại gen được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%.

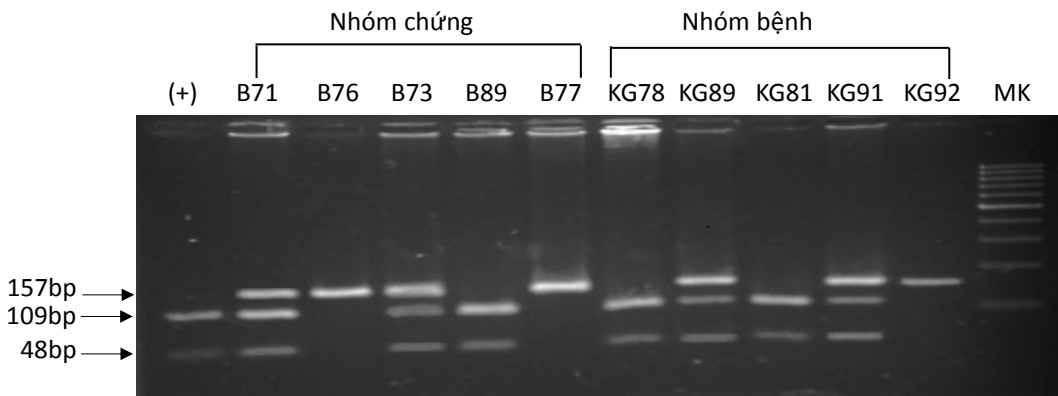


Hình 3.17. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại đoạn gen chứa SNP 309T>G của gen MDM2.

(MK) Thang chuẩn 100-1000bp; (1) Nước cất làm chứng âm.

Nhận xét:

Hình ảnh điện di sản phẩm PCR cho một băng đặc hiệu và có kích thước đúng như tính toán lý thuyết. Sản phẩm khuếch đại gen, sau đó được cắt bằng enzym giới hạn MspAI và điện di trên gel agarose 3% cùng với thang chuẩn 100bp. Các băng DNA được nhuộm ethidium bromide và chụp ảnh bằng hệ thống máy EC3 Imaging system.



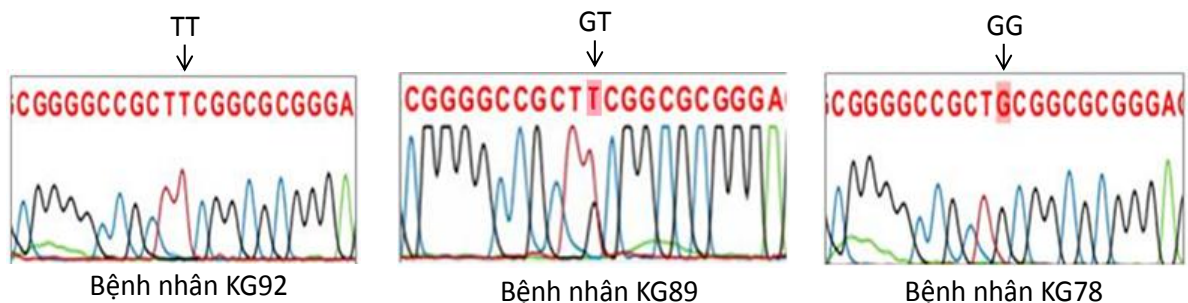
Hình 3.18. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt enzym của SNP 309T>G gen MDM2

(MK) thang chuẩn 100-1000bp; (+) mẫu biết trước kiểu gen đồng hợp GG làm chứng dương. Kiểu gen đồng hợp GG có hai vạch xuất hiện ở mẫu nhóm chứng B89 và mẫu nhóm bệnh KG78, KG81. Kiểu gen dị hợp GT có ba vạch, xuất hiện ở mẫu nhóm chứng B71, B73 và nhóm bệnh KG89, KG91. Kiểu gen đồng hợp TT chỉ có một vạch, xuất hiện ở mẫu nhóm chứng B76, B77 và nhóm bệnh KG92.

Nhận xét:

Hình ảnh điện di sản phẩm cắt enzyme đoạn gen có chứa SNP 309T>G của gen MDM2 phù hợp với tính toán lý thuyết. Kết quả thu được cả ba kiểu gen với ba kiểu băng tương ứng trong cả nhóm bệnh nhân ung thư gan và nhóm chứng.

Kết quả cắt enzyme đoạn gen chứa SNP 309T>G của gen MDM2 được kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự. Các mẫu đại diện cho mỗi loại kiểu gen. Sản phẩm khuếch đại đoạn gen chứa SNP 309T>G, sau khi tinh sạch được giải trình tự bằng máy ABI-3100 và được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự chuẩn của gen MDM2 trên GeneBank.



Hình 3.19. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen SNP 309T>G của gen MDM2

Kiểu gen TT có một đỉnh nucleotid T duy nhất (bệnh nhân KG92); Kiểu gen GT có hai đỉnh nucleotid G và nucleotid T (bệnh nhân KG89); Kiểu gen GG có một đỉnh nucleotid G duy nhất (bệnh nhân KG78)

Nhận xét:

Kết quả giải trình tự tương đồng với kết quả cắt bằng enzyme *MspAI*. Các bằng chứng thăm tra này khẳng định sự tin cậy của phương pháp PCR-RFLP, khi dùng để phân tích kiểu gen của SNP 309T>G gen MDM2.

Thực hiện trên toàn bộ 547 mẫu DNA của nhóm đối tượng nghiên cứu, chúng tôi thu được kết quả tỷ lệ các kiểu gen (bảng 3.11).

Bảng 3.11. Tỷ lệ các kiểu gen MDM2 309T>G trong nhóm đối tượng nghiên cứu

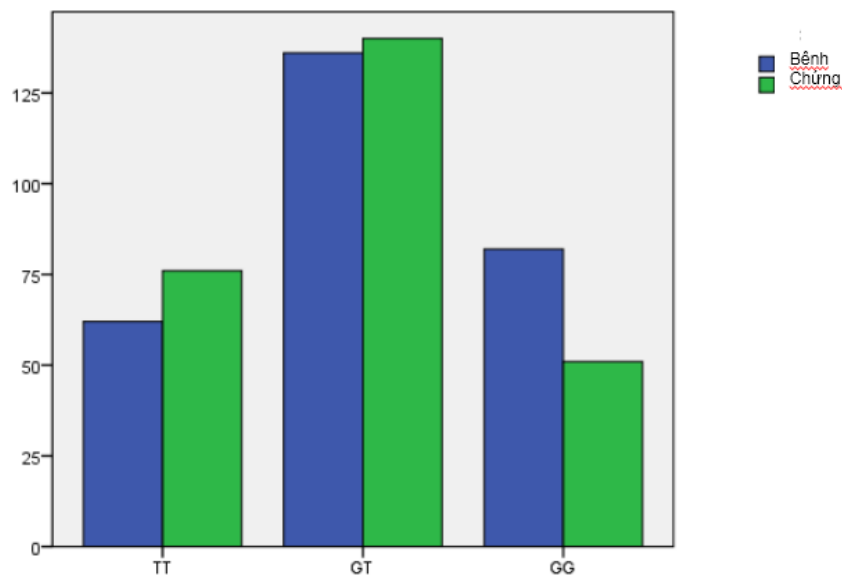
Kiểu gen	Tổng số nhóm nghiên cứu (<i>n</i> = 547)	
	n	%
Alen G	542	49,5
Alen T	552	50,5
GG	133	24,3
GT	276	50,4
TT	138	25,3

Nhận xét:

Kết quả phân tích kiểu gen của nhóm đối tượng nghiên cứu cho thấy tỷ lệ hai biến thể T và G là khá cân bằng, lần lượt là 50,5 và 49,5%. Điều này phù hợp với trình tự gốc cũng như các nghiên cứu trên thế giới khi biến thể T chiếm hơn 50%. Đây được cho là kiểu gen nguyên thủy của SNP309T>G MDM2 309T>G. Kiểu gen đồng hợp GG cũng có tần xuất thấp hơn kiểu gen đồng hợp TT, lần lượt là 24,3% và 25,3%.

Bảng 3.12. Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của SNP MDM2-309T>G giữa nhóm bệnh và chứng

Kiểu gen	Nhóm bệnh (280)		Nhóm chứng (267)		p
	n	%	n	%	
Alen G	300	53,6	242	45,3	0,02
Alen T	260	46,4	292	54,7	
GG	82	29,3	51	19,1	0,015
GT	136	44,6	140	52,4	
TT	62	22,1	76	28,5	



Hình 3.20. Biểu đồ phân bố kiểu gen của MDM2 309T>G

Nhận xét:

Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ phân bố kiểu gen giữa nhóm bệnh và chứng ($p = 0,015$). Kiểu gen GG có tần xuất cao hơn ở nhóm bệnh (29,3%) so với nhóm chứng (19,1%). Đây cũng là kiểu gen cần quan tâm vì có liên quan đến một số loại hình ung thư trên thế giới. Kết quả tại bảng 3.12

cũng cho thấy, tỷ lệ phân bố allel G và T có sự khác biệt có ý nghĩa, allel G gặp nhiều hơn trong nhóm bệnh nhân ung thư tế bào gan. Có một mối liên quan giữa đa hình nucleotid đơn MDM2 309T>G với khả năng mắc ung thư tế bào gan nguyên phát.

Bảng 3.13. Đa hình kiểu gen MDM2-SNP309 và nguy cơ mắc UTTBGNP

Kiểu gen		OR (95%)	OR*
Allel	T	1,00	1,00
	G	1,39	1,27 (0,87-2,91)
Kiểu gen	TT	1,00	1,00
	TG	1,03	1,12 (0,69-1,84)
	GG	1,95	2,77 (1,56-4,94)
Tổ hợp các kiểu gen	TT + TG	1,00	1,00
	GG	1,75	2,56 (1,59-4,11)
	TT	1,00	1,00
	TG + GG	1,40	1,50 (0,95-2,38)

* OR được điều chỉnh từ các biến: tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu, theo mô hình hồi quy logistic đa biến.

Nhận xét:

Tỷ suất chênh (OR) để xác định khả năng mắc ung thư tế bào gan nguyên phát của các kiểu gen. Tỷ suất OR được điều chỉnh loại bỏ sự ảnh hưởng nhiễu của các biến, tuổi, giới, nhiễm HBV, HCV, tình trạng nghiện rượu, thông qua mô hình hồi quy logistic đa biến. Kết quả cho thấy, người mang kiểu gen GG có khả năng mắc UTTBGNP cao hơn người mang kiểu gen TT, một cách có ý nghĩa, OR = 2,77, 95%, CI (1,56-4,94). Trong khi kiểu

gen dị hợp tử TG có nguy cơ mắc ung thư cao hơn kiểu gen TT chỉ có 1.12 lần và không có ý nghĩa thống kê. Phân tích kết hợp các kiểu gen cho thấy kiểu gen GG có khả năng mắc UTTBGNP cao hơn kết hợp kiểu gen TG + TT, OR= 2,56, 95%, CI (1,59-4,11). Kết hợp kiểu gen GT và GG so với TT cũng làm tăng nguy cơ mắc bệnh hơn, nhưng không có ý nghĩa thống kê. So sánh khả năng mắc bệnh của các allele cho kết quả; allele G có khả năng mắc bệnh cao hơn allele T, nhưng không có ý nghĩa thống kê.

Để phân tích sâu hơn về liên quan giữa kiểu gen và độ tuổi mắc bệnh, chúng tôi tìm kiếm sự khác biệt độ tuổi trung bình của các kiểu gen. Độ tuổi là một biến liên tục, tuân theo quy luật chuẩn Gauss, nên chúng tôi dùng kiểm định *T* test để so sánh độ trung bình của các kiểu gen MDM2-309T>G trong nhóm bệnh nhân ung thư tế bào gan.

Bảng 3.14. Độ tuổi trung bình của bệnh nhân UTTBGNP mang kiểu các kiểu gen của SNP 309T>G

Kiểu gen MDM2 309T>G	Độ tuổi trung bình (Mean ± SD)	<i>p</i>
TT	60,6 ± 9,9	0,02
GT	57,9 ± 10,5	
GG	53,9 ± 13,7	

Theo kết quả ở bảng trên ta thấy độ tuổi trung bình ở kiểu gen nguyên thủy TT là cao nhất (60,6). Trong khi, độ tuổi trung bình của những bệnh nhân mang kiểu gen GG là trẻ nhất (53,9). Sự chênh lệch về độ tuổi mắc bệnh giữa hai kiểu gen là 6,7 năm ($p = 0,02$). Độ tuổi trung bình tăng dần tỷ lệ nghịch với khả năng mắc bệnh của các kiểu gen của SNP 309T>G.

3.4. TƯƠNG QUAN GIỮA ĐA HÌNH KIỂU GEN TP53, MDM2 VÀ MỘT SỐ YẾU TỐ NGUY CƠ UTTBGNP

3.4.1. Sự kết hợp các kiểu gen của TP53 với MDM2

Kết quả thu được từ phân tích đa hình kiểu gen của TP53 và MDM2 chỉ ra 3 SNP: dup16 và R72P của gen TP53, 309T>G của MDM2 liên quan đến UTTBGNP. Nếu xem các kiểu gen TP53 và MDM2 là một yếu tố nguy cơ của UTTBGNP thì sự kết hợp hai yếu tố nguy cơ có làm tăng khả năng mắc bệnh. Tuy nhiên đa hình kiểu gen dup16 của TP53 không đánh giá được kiểu gen đồng hợp có thêm đoạn, A2A2 do chỉ có một trường hợp. Vì vậy sự kết hợp hai SNP: R72P của TP53 và MDM2 309T>G được phân tích để xác định sự tương tác giữa hai gen, đối với nguy cơ ung thư tế bào gan.

Bảng 3.15. Kết hợp kiểu gen TP53 R72P + MDM2 309T>G và nguy cơ mắc UTTBGNP

TT	Kiểu gen TP53 R72P	Kiểu gen MDM2 309T>G	OR* 95% CI
1	R/R	TT	1,00
2	R/R	GT	1,45 (0,59 - 3,59)
3	R/R	GG	2,26 (0,77 - 6,62)
4	R/P	TT	1,10 (0,43 - 2,16)
5	R/P	GT	1,33 (0,56 - 3,12)
6	R/P	GG	3,24 (1,25 - 8,39)
7	P/P	TT	2,62 (0,76 - 9,06)
8	P/P	GT	1,51 (0,57 - 3,98)
9	P/P	GG	6,01 (1,96 - 18,42)

* OR được điều chỉnh từ các biến: tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu, theo mô hình hồi quy logistic đa biến.

Nhận xét:

Bảng 3.15, tổ hợp các kiểu gen của hai đa hình nucleotid đơn TP53 R72P và MDM2 309T>G, được sắp xếp theo trình tự tăng dần khả năng mắc bệnh theo lý thuyết. Kết hợp kiểu gen R/R của TP53-R72P và TT của MDM2-309T>G được coi là không có nguy cơ (OR = 1). Các kiểu gen kết hợp còn lại, lần lượt so sánh với kiểu gen không nguy cơ trên. Kết quả cho thấy, khả năng mắc bệnh tăng cao một cách có ý nghĩa khi kết hợp hai kiểu gen nguy cơ cao nhất của SNP TP53 R72P và MDM2 309T>G, (P/P + GG). Tỷ suất OR = 6,01, 95%, CI (1,96 - 18,42). Sự kết hợp hai kiểu gen này, đã làm tăng khả năng mắc bệnh hơn rất nhiều so với khi chúng đứng riêng rẽ (so với bảng 3.9 và 3.13). Ngoài ra, kết quả tại bảng 3.15 còn cho thấy, sự kết hợp hai kiểu gen R/P của TP53 R72P và GG của SNP MDM2 309T>G cũng tăng có ý nghĩa khả năng mắc bệnh, OR = 3,24, 95%, CI (1,25 - 8,39).

3.4.2. Kiểu gen TP53-R72P và MDM2-309T>G với nhiễm HBV

Trong nghiên cứu này, sự kết hợp giữa các kiểu gen TP53 R72P và MDM2 309T>G và tình trạng nhiễm HBV với nguy cơ ung thư tế bào gan được phân tích và đánh giá cho kết quả như sau:

Bảng 3.16. So sánh nguy cơ mắc UTTBGNP của các kiểu gen và HBV

Yếu tố nguy cơ	OR*	CI (95%)
TP53-P72P	1,77	(1,03 - 3,14)
MDM2-309GG	2,77	(1,56 - 4,94)
HBV (+)	11,67	(7,48 - 18,23)

* OR được điều chỉnh từ các biến: tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu, theo mô hình hồi quy logistic đa biến.

Nhận xét:

Qua bảng 3.15 cho thấy, khả năng mắc UTTBGNP của người nhiễm HBV so với người không nhiễm HBV cao hơn rất nhiều so với khả năng mắc bệnh của các kiểu gen TP53 R72P và MDM2 309T>G.

Bảng 3.17. Kiểu gen TP53, MDM2 và nhiễm HBV trong khả năng mắc UTTBGNP

Đa hình kiểu gen		Có HBV		Không HBV	
		OR*	CI (95%)	OR*	CI (95%)
TP53 R72P	R72R	1,00		1,00	
	R72P	1,43	(0,51 – 4,01)	1,07	(0,95 – 3,31)
	P72P	3,23	(1,12 – 9,45)	1,39	(0,99 – 2,71)
MDM2 309T>G	TT	1,00		1,00	
	TG	1,63	(0,72 – 3,69)	1,04	(0,50 – 1,64)
	GG	4,38	(1,26 – 15,30)	2,28	(1,18 – 4,41)

* OR được điều chỉnh từ các biến: tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu, theo mô hình hồi quy logistic đa biến.

Nhận xét:

Kết quả tại bảng 3.17 cho thấy, kiểu gen của hai SNP TP53 R72P và MDM2-309T>G có liên quan với nguy cơ mắc UTTBGNP của người nhiễm virus HBV. Đặc biệt là kiểu gen GG của SNP MDM2 309T>G làm tăng khả năng mắc bệnh của những người nhiễm HBV lên một cách rất có ý nghĩa, OR = 4,38, 95%, CI (1,26 – 15,30). Các kiểu gen của SNP TP53 R72P cũng tăng khả năng mắc bệnh cho người nhiễm HBV, tuy nhiên không rõ rệt như SNP MDM2 309T>G.

Khi so sánh giữa nhóm nhiễm HBV với nhóm không nhiễm HBV, thấy có sự khác biệt tỷ suất OR của các kiểu gen TP53 và MDM2 309T>G. Nhiễm HBV làm tăng khả năng mắc UTTBGNP của các kiểu gen.

3.4.3. Tương quan giữa các kiểu gen TP53 R72P và MDM2 309T>G với một số yếu tố nguy cơ UTTBGNP khác

3.4.3.1. Tuổi

Nhiều nghiên cứu đã khẳng định, tuổi cao làm tăng nguy cơ của ung thư tế bào gan nguyên phát. Nếu lấy > 40 tuổi là một nguy cơ mắc ung thư tế bào gan nguyên phát, vậy nguy cơ mắc bệnh của người trên 40 so với các kiểu gen có nguy cơ cao nhất của gen TP53 và MDM2.

Bảng 3.18. So sánh nguy cơ mắc UTTBGNP của các kiểu gen và độ tuổi >40

Yếu tố nguy cơ	OR*	CI (95%)
TP53-P72P	1,77	(1,03 - 3,14)
MDM2-309GG	2,77	(1,56 - 4,94)
> 40 tuổi	2,26	(1,33 - 2,86)

* OR được điều chỉnh từ các biến: tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu, theo mô hình hồi quy logistic đa biến.

Nhận xét: Khả năng mắc UTTBGNP của người trên 40 tuổi cao hơn so với người dưới 40 tuổi là 2,26 lần CI (1,33 – 2,86). Nguy cơ mắc bệnh từ độ tuổi hơn 40, cao hơn nguy cơ từ các kiểu gen P/P của SNP TP53 P72P, nhưng lại thấp hơn kiểu gen GG của SNP MDM2 309GG.

3.4.3.2. Phân bố kiểu gen theo giới

Trong nghiên cứu này tỷ lệ nam/nữ trong nhóm bệnh nhân UTTBGNP là 5,8/1. Liên quan giữa kiểu gen, giới và nguy cơ UTTBGNP như sau:

Bảng 3.19. Tỷ lệ phân bố kiểu gen SNP R72P gen TP53 và 309T>G gen MDM2 theo giới trong nhóm bệnh nhân UTTBGNP

Kiểu gen		Nam		Nữ		p
		n	%	n	%	
SNP R72P gen TP53	P72P	64	26,8	10	24,4	0,8
	R72P	109	45,6	21	51,2	
	R72R	66	27,6	10	24,4	
SNP 309 T>G gen MDM2	TT	53	22,2	9	22,0	0,1
	TG	121	50,6	15	36,6	
	GG	65	27,2	17	41,5	

Nhận xét: Không thấy có sự khác biệt tỷ lệ phân bố kiểu gen TP53 R72P và MDM2 309T>G giữa hai giới trong nhóm bệnh nhân ung thư bào gan. Các kiểu gen TP53 và MDM2 không ảnh hưởng đến việc nam mắc UTTBGNP nhiều hơn nữ trong nhóm đối tượng nghiên cứu.

3.4.3.3. Kiểu gen TP53 R72P, MDM2 309T>G với tình trạng xơ gan.

Mối liên quan giữa kiểu gen TP53 R72P và MDM2 309T>G và xơ gan với nguy cơ UTTBGNP được phân tích, kết quả thể hiện trong bảng sau:

Bảng 3.20. Tỷ lệ phân bố kiểu gen SNP R72P và MDM2 309T>G giữa bệnh nhân UTTBGNP có và không có xơ gan

Kiểu gen		Có xơ gan		Không xơ gan		p
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
TP53 R72P	R72R	53	27,3	23	26,7	0,4
	R72P	94	48,5	36	41,9	
	P72P	47	24,2	27	31,4	
MDM2 309T>G	TT	38	19,6	24	27,9	0,03
	TG	104	53,6	32	37,2	
	GG	52	26,8	30	34,9	

Nhận xét: Không có sự khác biệt có ý nghĩa, tỷ lệ kiểu gen của SNP TP53-R72P và MDM2 309T>G, giữa nhóm bệnh nhân UTTBGNP có xơ gan và không có xơ gan. Các kiểu gen TP53-R72P và MDM2-309T>G không liên quan đến với tình trạng xơ gan ở nhóm đối tượng nghiên cứu.

3.4.3.4 Kiểu gen TP53 R72P, MDM2 309T>G với nồng độ AFP

Bảng 3.21. Kiểu gen TP53 R72P và MDM2 309T>G và nồng độ AFP

AFP	Kiểu gen TP53-R72P			Kiểu gen MDM2-309T>G			p
	R72R	R72P	P72P	TT	TG	GG	
Median	109	538	656	346	236	617	0,2* 0,07**
< 400ng/ml	39	61	33	29	74	34	0,3* 0,1**
> 400ng/ml	25	64	39	29	55	44	

* So sánh giữa các kiểu gen TP53

** So sánh giữa các kiểu gen MDM2

Nhận xét:

Không có sự khác biệt có ý nghĩa, tỷ lệ kiểu gen của hai SNP TP53 R72P và MDM2 309T>G, giữa hai nhóm bệnh nhân ung thư tế bào gan có AFP > 400 và nhỏ hơn 400ng/ml. Khi so sánh trung vị của nồng độ AFP của các kiểu gen TP53-R72P và MDM2-309T>G cũng không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa. Các kiểu gen TP53 và MDM2 không có liên quan đến nồng độ AFP của bệnh nhân UTTBGNP trong nhóm đối tượng nghiên cứu.

3.4.3.5. Kiểu gen TP53 R72P và MDM2 309T>G với nhiễm HCV

So sánh tương quan nguy cơ UTTBGNP của HCV với các kiểu gen TP53 R72P và MDM2 309T>G được thể hiện qua bảng sau:

Bảng 3.22. So sánh các kiểu gen và nhiễm HCV

Yếu tố nguy cơ	OR*	CI (95%)
TP53-P72P	1,77	(1,03 - 3,14)
MDM2-309GG	2,77	(1,56 - 4,94)
HCV	7,15	(2,10 - 24,3)

* OR được điều chỉnh từ các biến: tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu, theo mô hình hồi quy logistic đa biến.

3.4.3.6. Kiểu gen TP53 R72P, MDM2 309T>G với nghiện rượu

Liên quan giữa kiểu gen TP53 R72P, MDM2 309T>G và tình trạng lạm dụng rượu bia với nguy cơ mắc UTTBGNP được thể hiện trong bảng sau:

Bảng 3.23. So sánh nguy cơ mắc UTTBGNP của các kiểu gen và nghiện rượu

Yếu tố nguy cơ	OR*	CI (95%)
TP53-P72P	1,77	(1,03 - 3,14)
MDM2-309GG	2,77	(1,56 - 4,94)
Nghiện rượu	3,72	(1,50 - 9,21)

* OR được điều chỉnh từ các biến: tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu, theo mô hình hồi quy logistic đa biến.

Qua kết quả bảng 3.23, người nghiện rượu có khả năng mắc UTTBGNP cao hơn người không nghiện rượu 3,72 lần. Tỷ suất OR của nghiện rượu cao hơn cả hai kiểu gen nguy cơ cao là TP53-P72P và MDM2-309GG.

Bảng 3.24. Tỷ lệ phân bố kiểu gen SNP R72P và MDM2 309T>G giữa bệnh nhân UTTBGNP có và không có nghiện rượu

Kiểu gen		Nghiện rượu		Không nghiện rượu		p
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
TP53 R72P	R72R	9	39,1	65	25,3	0,07
	R72P	10	43,5	120	46,7	
	P72P	4	17,4	72	28,0	
MDM2 309T>G	TT	6	26,1	56	21,8	0,2
	TG	14	60,9	122	47,5	
	GG	3	13,0	79	30,7	

Nhận xét:

Không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa, tỷ lệ kiểu gen giữa hai nhóm bệnh nhân UTTBGNP có nghiện rượu và không có nghiện rượu. Hay các kiểu gen của SNP TP53 R72P và MDM2 309T>G không liên quan đến khả năng mắc UTTBGNP của những người nghiện rượu trong nhóm đối tượng nghiên cứu.

Bảng 3.25. So sánh nguy cơ mắc UTTBGNP của các kiểu gen TP53, MDM2 và các yếu tố nguy cơ

Yếu tố nguy cơ	OR*	CI (95%)
Nam giới	1,35	(0,78 – 2,30)
> 40 tuổi	2,26	(1,33 - 2,86)
HBV (+)	11,67	(7,48 - 18,23)
HCV (+)	7,15	(2,10 - 24,3)
Nghiện rượu	3,72	(1,50 – 9,21)
TP53-72P/P	1,77	(1,03 - 3,14)
MDM2-309GG	2,77	(1,56 - 4,94)

* OR được điều chỉnh từ các biến: tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu, theo mô hình hồi quy logistic đa biến.

Nhận xét:

Tình trạng xơ gan và nồng độ AFP không xác định trên nhóm chứng nên không đánh giá được tỷ suất OR. Giới tính nam so với nữ cho kết quả không có ý nghĩa vì sự tương đồng tỷ lệ giới của nhóm chứng và nhóm bệnh. HBV là nguy cơ mắc UTTBGNP cao nhất.

Chương 4

BÀN LUẬN

Bệnh ung thư nói chung và ung thư tế bào gan nguyên phát, đang là một vấn đề thời sự trong nghiên cứu y học. Những số liệu gia tăng tỷ lệ mắc, tỷ lệ tử vong do căn bệnh quái ác này, đang được liên tục công bố, tạo nên sự bức thiết phải tìm ra những công cụ chẩn đoán sớm hiệu quả, hay tầm soát được các yếu tố nguy cơ gây bệnh. Việc phát hiện sớm và phòng ngừa, vẫn là một hướng đi đúng đắn, nhằm ngăn ngừa sự hình thành và phát triển ung thư cũng như giảm thiểu tối đa những mất mát về người và thiệt hại về kinh tế trong điều trị bệnh. Trong chiến lược tầm soát các yếu tố nguy cơ gây bệnh, di truyền học ngày càng chiếm một vị trí quan trọng. Gần đây, một trong những hướng nghiên cứu rất đáng chú ý, đó là nghiên cứu về nhóm gen ức chế ung thư (tumor suppressor gene). Nhóm gen này, thông qua các con đường tín hiệu nội bào kiểm soát sự phát sinh, phát triển ung thư. Sự khác biệt trong trình tự nucleotid (SNP) của những gen này, có thể ảnh hưởng đến sự đáp ứng của tế bào với các tác nhân gây bệnh, hóa chất, thuốc, vaccin, stress..... So sánh các vùng gen giữa các nhóm người với nhau (chẳng hạn giữa nhóm người bị bệnh và không bị bệnh), sẽ xác định được mối liên quan giữa SNP với sự hình thành và phát triển của ung thư. Từ đó có thể ứng dụng các SNP này như là một marker tầm soát nguy cơ mắc ung thư. Đây cũng là mục đích cao nhất của đề tài nghiên cứu này.

4.1. Đặc điểm nhóm đối tượng nghiên cứu

Tuổi của nhóm nghiên cứu: Nhóm nghiên cứu bao gồm 280 bệnh nhân UTTBGNP có độ tuổi trung bình là $57 \pm 11,6$ năm. Người trẻ nhất là 23 tuổi. Người cao tuổi nhất là 82 tuổi. Độ tuổi hay gặp nhất là 60. Tỷ lệ gặp cao nhất

là độ tuổi từ 40 đến 60. Tỷ lệ mắc bệnh tăng dần theo tuổi và giảm dần từ lứa tuổi 60. Ngoài ra, trong nghiên cứu của chúng tôi còn thấy, độ tuổi 40 trở đi bắt đầu ghi nhận, sự tăng lên nhanh chóng tỷ lệ mắc bệnh. Ghi nhận của chúng tôi cũng khá giống với một số nghiên cứu trong nước và nước ngoài. Tác giả Lê Minh Huy năm 2012, khi tổng kết 313 bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát cho thấy, độ tuổi trung bình mắc bệnh là 54.8 ± 12.9 , khoảng tuổi mắc bệnh là từ 11-84 [157]. Tại Trung Quốc, nghiên cứu của Zhang JY và cộng sự ghi nhận độ tuổi trung bình của bệnh nhân là 51.9 ± 12.5 , khoảng tuổi mắc bệnh là 17-86 tuổi [158]. Tuổi mắc bệnh thay đổi theo từng vùng địa lý khác nhau. Tuổi trung bình mắc bệnh của Mỹ, châu Âu khoảng 60 tuổi, ở châu Á tuổi mắc bệnh trẻ hơn, khoảng 50 tuổi. Điều này có thể lý giải bằng sự khác nhau của cơ cấu bệnh tật cũng như tình trạng nhiễm HBV, HCV. Những vùng có tỷ lệ mắc virus viêm gan cao thì tuổi mắc bệnh thường giảm hơn. Ở Việt Nam UTTBGNP thường gặp ở lứa tuổi 50-60 tuổi [4],[23],[157]. Tuy sự khác biệt không nhiều, nhưng độ tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân ung thư chúng tôi thu được, cao hơn các nghiên cứu của các tác giả trước đó. Điều này có thể lý giải, do chúng tôi lựa chọn các bệnh nhân một cách ngẫu nhiên, mà không chú ý đến kiểm soát tuổi bắt đầu khởi phát bệnh.

Giới tính của nhóm nghiên cứu: Trong 280 bệnh nhân ung thư tế bào gan có 239 bệnh nhân nam (85,4%) và 41 bệnh nhân nữ (14,6%). Tỷ lệ nam/nữ là 5,8/1. Kết quả cho thấy tỷ lệ mắc ung thư tế bào gan nguyên phát ở nam giới cao hơn nữ giới. Mặc dù đã cố gắng lựa chọn một nhóm chúng có tỷ lệ giới tính tương đồng, để phù hợp với thiết kế nghiên cứu, nhưng sự khác biệt tỷ lệ nam nữ giữa hai nhóm bệnh nhân ung thư gan và nhóm chúng vẫn tiệm cận mức có ý nghĩa ($p = 0,06$). Số liệu này, một lần nữa chứng minh nam giới mắc bệnh UTTBGNP nhiều hơn nữ. Kết quả của chúng tôi cũng không nhiều khác biệt so với số liệu của Lê Minh Huy (3,4/1) [157]. Tuy nhiên một nghiên

cứu của Lauwers GY và cộng sự ở người châu Âu thì tỷ lệ nam nữ lại thấp hơn nhiều so với ghi nhận của chúng tôi (2,3/1) [159]. Sự khác biệt cũng là dễ hiểu khi cơ cấu bệnh tật khác nhau, các yếu tố nguy cơ chính gây bệnh cũng khác nhau.

Nghiện rượu là một yếu tố nguy cơ được hàng đầu tại Việt Nam. Trong thiết kế bệnh án nghiên cứu của mình, chúng tôi ghi nhận là có hay không tình trạng lạm dụng bia rượu kéo dài. Nếu chẩn đoán nghiện rượu phải có các tiêu chuẩn chẩn đoán xác định (theo bộ tiêu chuẩn chẩn đoán ICD 10). Thực tế, thông tin mà nghiên cứu quan tâm chỉ là việc cơ thể bệnh nhân đã phải tiếp xúc với lượng bia rượu lớn, liên tục và kéo dài trong nhiều năm. Kết quả trong số 280 bệnh nhân UTTBGNP có 23 trường hợp (8,2%) sử dụng rượu bia số lượng >80g/ngày, trong nhiều năm liên tục. Tất cả đối tượng được ghi nhận là có lạm dụng rượu bia đều là nam giới, điều này là một trong những nguyên nhân làm cho tỷ lệ mắc ung thư gan ở nam cao hơn nữ. Sử dụng phân tích hồi quy đa biến, chúng tôi thấy khả năng mắc UTTBGNP của người nghiện rượu cao hơn khoảng 3,72 lần (bảng 3.24). Kết quả này thấp hơn một số nghiên cứu khác. Pagltaro và cộng sự thông báo nguy cơ UTTBGNP cao gấp 13 lần ở những bệnh nhân xơ gan uống rượu nhiều so với những bệnh nhân xơ gan không uống rượu [26]. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Kim Hoa và cộng sự năm 2010 ở miền trung Việt Nam cho thấy, bệnh nhân có tiền sử uống rượu có nguy cơ bị UTTBGNP cao gấp 7 lần so với người không [5].

Nhiễm virus viêm gan B là một yếu tố nguy cơ gây ung thư tế bào gan nguyên phát hàng đầu trên thế giới. Việt Nam nằm trong vùng dịch tễ có tỷ lệ nhiễm virus viêm gan B khá cao. Chính vì vậy, HBV là yếu tố nguy cơ đầu tiên cần phải tính đến trong tìm hiểu nguyên nhân gây bệnh. Trong 280 bệnh nhân UTTBGNP nghiên cứu, thì có 171 bệnh nhân nhiễm HBV, chiếm tỷ lệ (61,0%). Đây là một tỷ lệ khá cao. Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi còn thấp

hơn với một số nghiên cứu trong và ngoài nước. Tác giả Lê Minh Huy đưa ra tỷ lệ 66,1% nhiễm HBV trong số những bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát [157]. Theo các số liệu của Cougot và cộng sự, trong các yếu tố nguy cơ chính gây UTTBGNP, thì tình trạng viêm gan virút B là yếu tố quan trọng nhất, chiếm khoảng 70% các trường hợp ung thư tế bào gan [30]. Phân tích hồi quy đa biến chúng tôi thấy, khả năng mắc ung thư của những người nhiễm HBV cao gấp 11,67 lần người không mắc (bảng 3.16). Tỷ xuất chênh nghiên cứu thu được, một lần nữa khẳng định HBV là một nguy cơ của UTTBGNP tại Việt Nam. Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Kim Hoa và cộng sự năm 2010 chỉ ra, những bệnh nhân có tiền sử viêm gan virus B có nguy cơ bị UTTBGNP cao gấp 6,64 lần so với nhóm chứng [5]. Một số nghiên cứu thống kê cộng đồng (meta-analysis) dựa trên nhiều nghiên cứu đơn lẻ, tại nhiều quốc gia, nhiều chủng tộc khác nhau, với một cỡ mẫu lên đến hàng chục nghìn cho thấy, nguy cơ mắc UTTBGNP của người nhiễm HBV là khá cao, khoảng 15,6 đến 20,4 lần so với người bình thường [31],[32].

Nhiễm virus viêm gan C là một nguy cơ rất lớn gây ung thư tế bào gan. Tuy có tỷ lệ mắc thấp hơn HBV nhưng virus viêm gan C nguy hiểm hơn vì tỷ lệ chuyển mạn tính rất cao, khoảng hơn 80%. Chuyển mạn tính lại đồng hành cùng với những biến đổi ung thư hoá tại tế bào gan. Ngoài ra, HCV còn nguy hiểm vì bệnh hầu như không có biểu hiện gì rõ rệt, không bao giờ có thể tối cấp. Nhiều người chỉ biết mình nhiễm virus khi đã bị xơ gan, ung thư gan. Trong nhóm bệnh nhân UTTBGNP chúng tôi ghi nhận 12 (4,6%) trường hợp nhiễm HCV. Đây là một tỷ lệ thấp hơn so với các nghiên cứu khác trên thế giới. Các nghiên cứu lớn tại châu Âu, tìm thấy 40-44% số bệnh nhân bị UTTBGNP có nhiễm HCV [37],[38]. Một nghiên cứu khác tại Nhật Bản, cho kết quả là 80-90% số ca UTTBGNP có viêm gan C mạn tính [39]. Ngoài các nguyên nhân về vùng dịch tễ khác nhau của HCV thì hạn chế của phương pháp

thu thập số liệu chỉ dựa vào hồi cứu bệnh án và phỏng vấn bệnh nhân cũng được tính đến. Phân tích nguy cơ UTTBGNP thông qua tỷ suất OR, chúng tôi thấy một nguy cơ mắc bệnh cao hơn 7,15 lần của tình trạng nhiễm HCV ở nhóm nghiên cứu. Kết quả này cũng thấp hơn các nghiên cứu trên thế giới. Một nghiên cứu tại Nhật Bản, Donato và cộng sự đã thực hiện một phân tích cộng đồng, dựa trên số liệu thu được từ 21 nghiên cứu bệnh chứng đã thực hiện. Kết quả cho thấy, nguy cơ ung thư tế bào gan nguyên phát cao gấp 17 lần ở những người nhiễm HCV so với người bình thường làm chứng [40]. Virus viêm gan C đang mang lại nguy cơ UTTBGNP nghiêm trọng hơn ở các nước phát triển.

Xơ gan được xem như tình trạng tiền ung thư gan. Phần lớn UTTBGNP phát triển trên nền gan xơ. Xơ gan càng nặng thì khả năng UTTBGNP càng cao. Đã có nhiều nghiên cứu tiến hành trên thế giới cũng như tại Việt Nam đều kết luận, có một tỷ lệ lớn UTTBGNP phát triển trên nền gan xơ. Nghiên cứu của Okuda (2007) và Nordenstedt (2010) cho thấy tỷ lệ này là khoảng 70%-90% [21],[22]. Ở Việt Nam, tỷ lệ này là khoảng 80%-90% [23]. Kết quả của chúng tôi có 194 bệnh nhân UTTBGNP có xơ gan, chiếm 69,3%. Đây là một tỷ lệ thấp hơn không đáng kể so với các nghiên cứu đã công bố. Tình trạng xơ gan không phải là một yếu tố nguy cơ gây ung thư tế bào gan, nhưng khả năng mắc bệnh là rất cao khi có xơ gan.

AFP, là protein của huyết tương bào thai do gan, túi noãn hoàng sản xuất, có cấu trúc chuỗi giống với albumin. Mức bình thường của AFP là dưới 10 ng/ml. AFP tăng cao trong máu là một nguy cơ rõ rệt mắc ung thư tế bào gan nguyên phát. Trên thực tế, chưa có một bằng chứng nào về mối liên hệ giữa AFP và các gen TP53 và MDM2. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ muốn đưa AFP vào cùng với các yếu tố nguy cơ khác để tạo nên một bức tranh tổng thể, nhiều góc nhìn về các nguy cơ UTTBGNP. Đây không hoàn toàn là một yếu tố nguy cơ của UTTBGNP, nhưng AFP cao hơn 400 ng/ml dự

đoán cho ung thư tế bào gan nguyên phát gan với độ đặc hiệu > 95%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thu được có 143 trường hợp bệnh nhân UTTBGNP có AFP > 400 ng/ml chiếm 51,1%. Kết quả cho thấy, tỷ lệ AFP dưới 400ng/ml cũng rất nhiều. Điều này đồng nghĩa với có một số lượng đáng kể các trường hợp có AFP thấp hoặc bình thường nhưng vẫn được xác định là UTTBGNP.

Nhóm chứng, được chúng tôi lựa chọn một cách cẩn thận để có các đặc điểm tương đối gần với nhóm bệnh. 267 mẫu chứng được chọn từ các bệnh nhân đến khám bệnh tại khoa khám bệnh bệnh viện Đa Khoa tỉnh Thanh Hoá. Độ tuổi trung bình là $56 \pm 15,5$. Tỷ lệ giới nam/nữ là 4,0/1. Do cơ cấu bệnh tật nên độ tuổi trung bình, tỷ lệ giới của nhóm chứng có thấp hơn nhóm UTTBGNP, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Điều này đảm bảo điều kiện cần cho một nghiên cứu bệnh chứng. Tỷ lệ các yếu tố nguy cơ UTTBGNP được ghi nhận trong nhóm chứng ít hơn so với nhóm bệnh. Điều này cũng dễ hiểu, mặc dù chúng tôi đã phải lựa chọn tương đối cẩn thận Về bản chất, nghiên cứu này tìm sự khác biệt tỷ lệ kiểu gen TP53 và MDM2 của nhóm người mắc UTTBGNP và không mắc UTTBGNP, trong điều kiện hai nhóm người này cùng có độ tuổi như nhau, tỷ lệ giới như nhau, có tỷ lệ phơi nhiễm với một số yếu tố nguy cơ như nhau. Tuy nhiên rất khó để tìm được một nhóm chứng có đầy đủ các đặc điểm như mong muốn. Trên thực tế nhóm chứng được lựa chọn một cách ngẫu nhiên trong các bệnh nhân đi khám bệnh định kỳ, khá phù hợp về độ tuổi và tỷ lệ giới với nhóm bệnh nhân ung thư gan. Còn các yếu tố nguy cơ sau đó được xác định là có hay không qua phỏng vấn. Ảnh hưởng từ sự khác biệt của các yếu tố nguy cơ giữa hai nhóm bệnh và chứng, đã được hạn chế bởi mô hình hồi quy logistic đa biến mà chúng tôi sử dụng để phân tích số liệu.

Riêng tình trạng xơ gan và nồng độ AFP, nghiên cứu không tiến hành thu thập ở nhóm chứng. Bản chất đây không phải là các yếu tố nguy cơ gây

bệnh từ môi trường. Hơn nữa, phân biệt rạch ròi giữa xơ gan đơn thuần và xơ gan đã có ung thư hoá không phải là lúc nào cũng dễ dàng trên thực hành lâm sàng. Chính vì thế, chúng tôi không chọn những bệnh nhân có xơ gan vào nhóm chứng, để đảm bảo mục tiêu chính của nghiên cứu là so sánh tỷ lệ phân bố kiểu gen TP53 và MDM2 giữa người bị UTTBGNP và người bình thường đối chứng.

4.2. Đa hình kiểu gen TP53

Con đường tín hiệu p53 được biết đến là một hệ thống các tín hiệu chi phối hàng loạt các hoạt động chức năng của tế bào. Các tín hiệu từ ngoại bào tác động lên các thụ thể làm hoạt hóa p53. Khi được hoạt hóa p53 điều hòa hoạt động của một loạt các gen và kiểm soát hoạt động chức năng của tế bào. P53 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 ôxy huyết, rối loạn chuyển hóa hay tăng cường hoạt động của các gen sinh ung thư [10],[12] Nên bất kỳ sự biến đổi nào của TP53 đều tạo nên nguy cơ hình thành các dòng tế bào ung thư. Kể từ năm 1979 khi Crawford phát hiện ra cấu trúc TP53 thì đã có rất nhiều nghiên cứu hoàn chỉnh hiểu biết về TP53.

Gần đây một trong các mảng nghiên cứu đáng chú ý là các đa hình thái đơn (SNPs) của TP53 liên quan đến nguy cơ mắc ung thư. Sau nghiên cứu của Catherine Whibley, công bố trên tạp chí *Nature* năm 2009, thì những SNPs quan trọng của TP53 đã được chỉ ra [11]. Hàng loạt nghiên cứu sau đó đã được công bố. Người ta tiến hành nghiên cứu trên nhiều loại hình ung thư và ở nhiều chủng tộc khác nhau. Tuy nhiên kết quả không nhất quán, có nhiều nghiên cứu khẳng định là có liên quan, nhưng cũng có nghiên cứu đưa ra kết luận không có liên quan giữa các đa hình kiểu gen của TP53 và nguy cơ mắc ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lần đầu đánh giá các SNP của TP53

ở người Việt Nam bị mắc ung thư tế bào gan nguyên phát so với người bình thường đối chứng.

Nghiên cứu sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử kinh điển, như phản ứng PCR, kỹ thuật enzym cắt giới hạn RFLP, kỹ thuật giải trình tự trực tiếp... Quy trình của các kỹ thuật này đã được chuẩn hoá và thực hiện thường quy tại Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội. Ngoài ra nhóm nghiên cứu cũng may mắn được tiếp cận với các máy móc trang thiết bị hiện đại, hoá chất của các hãng danh tiếng trên thế giới trong lĩnh vực sinh học phân tử. Chúng tôi đã tiến hành phân tích kiểu gen của hầu hết các SNP quan trọng của gen TP53.

Dup16 là đa hình kiểu gen đầu tiên của TP53 mà chúng tôi tiến hành phân tích. Đây là một đa hình được tạo bởi sự thêm đoạn 16bp vào phần không mã hoá thứ ba của gen TP53. Năm 2002, Gohrke S W cùng cộng sự công bố 16 bp duplication có liên quan đến ung thư vú ở phụ nữ Đức [160]. Đây gần như là đa hình quan trọng đầu tiên được biết đến của gen TP53. Kết quả nghiên cứu cho thấy kiểu gen nguyên thuỷ A1A1 ít có khả năng mắc ung thư vú hơn kiểu gen A1A2 (OR = 1.3, 95% CI = 1.0-1.7) và kiểu gen A2A2 OR=1.7 (95% CI 0.8-3.4). Về lý thuyết những người mang kiểu gen có thêm đoạn 16 base pair (alen A2) thì sự biểu hiện protein p53 trong tế bào ở mức thấp và có nguy cơ cao mắc ung thư. Điều này chứng tỏ rằng đa hình kiểu gen có khả năng thay đổi quá trình hoàn thiện các phân tử mRNA [11], [137].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi lại cho thấy, tỷ lệ kiểu gen có thêm đoạn 16 bp (A2A2 và A1A2) gặp rất ít ở người Việt Nam. Đặc biệt kiểu gen đồng hợp A2A2 chỉ gặp một trường hợp trong tổng số 547 đối tượng nghiên cứu (0,2%). Đây là một bệnh nhân UTTBGNP, nam giới, 24 tuổi, có nhiễm HBV. Kiểu gen dị hợp A1A2 có 19 trường hợp chiếm 3,5% nhóm đối tượng

nghiên cứu. Do tần xuất kiểu gen đột biến thấp nên chúng tôi không đánh giá sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng, mà chỉ đáng giá được khả năng mắc bệnh của kiểu gen A1A2 so với kiểu gen A1A1. Kết quả cho thấy kiểu gen A1A2 có khả năng mắc bệnh cao hơn A1A1 OR =2,76, 95% CI (1,17-2,37). Tuy nhiên, khi sử dụng mô hình phân tích hồi quy đa biến, để loại trừ ảnh hưởng của các biến, tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu thì kết quả không có ý nghĩa, OR = 1,23 , 95%, CI (0,33-4,97).

Gần đây nhất, C. Sagne và cộng sự năm 2013, đã tiến hành một nghiên cứu cộng đồng 25 nghiên cứu đã công bố thì kết quả cho thấy kiểu gen A2A2 tăng nguy cơ mắc ung thư so với kiểu gen A1A1 (OR = 1.45, 95% ,CI = 1.22–1.74) [161]. Tuy nhiên, nghiên cứu của C. Sagne cũng chỉ ra là có sự khác nhau giữa các chủng tộc. Ông phát hiện không liên quan đến ung thư ở người Ấn Độ, vùng Địa trung Hải và bắc Âu nhưng lại có ý nghĩa ở người Mỹ gốc Caucasian. Những số liệu cũng cho thấy, đột biến thêm 16 bp không giống nhau giữa các loại hình ung thư. Kiểu gen A2A2 là yếu tố nguy cơ cho ung thư vú, ung thư đại tràng nhưng không có ý nghĩa trong ung thư phổi [161]. Kết quả của chúng tôi lại một lần nữa chứng minh yếu tố chủng tộc và loại hình ung thư phải được tính đến trong nghiên cứu các đa hình thái đơn của gen ức chế khối u TP53.

D21D, P34P và P36P là các đa hình ở vùng hoạt hoá sao chép của gen TP53. Trong nghiên cứu của mình, Catherine Whibley có đề cập đến một khái niệm là *silent TP53 polymorphisms* [11]. Đây là khái niệm cho tập hợp các SNP nằm trên vùng mã hoá của TP53 nhưng không làm thay đổi trình tự acid amin. Sự thay thế nucleotid của các SNP này thường xảy ra ở vị trí thứ ba của bộ ba mã hoá. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích các *silent* SNP trên exon2 và exon4 của TP53. Đây là ba SNP không làm thay đổi trình tự acid amin, có các bộ ba mã hóa 21 (GAC→GAT), 34 (CCC → CCA) và 36 (CCG

→ CCT). Kết quả giải trình tự đoạn gen tương ứng, chúng tôi thấy một tỷ lệ lưu hành các kiểu gen hiếm là rất thấp trong quần thể nghiên cứu và phân bố tương đương cho cả nhóm bệnh và nhóm chứng. Cụ thể tại codon 21, 34, 36 không gặp các biến thể có thay thế nucleotid. Về lý thuyết khi tần xuất nhỏ hơn 1, không được xếp là đa hình kiểu gen, mà chỉ là các đột biến thay thế nucleotid. Vậy với tần xuất thu được từ nghiên cứu, các SNP trên, có tồn tại ở người Việt Nam. Thực tế với cỡ mẫu nghiên cứu 547 đối tượng, bao gồm cả bị bệnh và không, chưa đủ để đại diện cho cộng đồng. Phải là một mô hình nghiên cứu dịch tễ gen cộng đồng, với cỡ mẫu lên đến hàng chục nghìn đối tượng, và có phân tầng dân số, có đại diện vùng miền, mới có thể khẳng định chắc chắn các SNP này có tồn tại ở người Việt hay không. Tuy nhiên, nếu những nghiên cứu tiếp theo đây khẳng định, các SNP này không tồn tại trong nền tảng di truyền của người Việt thì cũng hoàn toàn có thể hiểu được. Vì các đa hình nucleotid đơn có tính chủng tộc rất cao, trong khi chưa có một nghiên cứu nào ở người Việt Nam.

Các *silent* SNP mặc dù không làm thay đổi trình tự acid amin nhưng cũng làm giảm sự biểu hiện của protein p53. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các SNP này nằm tại vùng N-tận của p53 chứa vị trí tương tác của với MDM2 và làm giảm khả năng dịch mã của TP53 mRNA [11] [138]. Điều này nói lên các *silent* SNP hoàn toàn có ảnh hưởng đến các đặc tính và chức năng sinh học của gen ức chế ung thư TP53. Tuy nhiên trên thực tế cũng chưa có nghiên cứu nào đánh giá sự liên quan giữa các SNP tại codon 21, 34, 36 của gen TP53 với nguy cơ ung thư trong đó có ung thư tế bào gan nguyên phát. Những số liệu mà chúng tôi thu được, với tỷ lệ các kiểu gen đột biến gặp rất thấp nên không thấy sự liên quan giữa codon 21, 34 và 36 với ung thư tế bào gan nguyên phát. Đây là một dữ liệu cần được tham khảo trước khi tiến hành

thiết kế các nghiên cứu tiếp theo về các đa hình nucleotid đơn của gen ức chế ung thư TP53.

P47S là một SNP ít gặp, nằm ở vùng mã hoá thứ tư, phía đầu N-tận của gen TP53. Khi trình tự nucleotid thay đổi C >T ở vị trí đầu tiên của bộ ba mã hoá thứ 47, sẽ làm Prolin chuyển thành Serin, dẫn đến có thể thay đổi khả năng bám của p53 đối với đoạn trình tự đặc hiệu tại gen đích, thay đổi quá trình hoàn thiện, tính ổn định của protein cũng như thay đổi khả năng tương tác của p53 với các protein nội bào. Ngoài ra, khi alen p53-P47 được thay thế bởi alen p53-S47, sự phosphoryl hóa tại vị trí S46 bị giảm sút, làm giảm khả năng hoạt hoá p53, dẫn đến suy giảm tác động lên các gen đích của quá trình thực bào thực bào và tăng khả năng mắc ung thư [11],[139].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, không gặp kiểu gen đột biến trong quần thể nhóm nghiên cứu. Thực tế các nghiên cứu về P47S trên thế giới là không nhiều. Đáng chú ý nhất là của Felley Bosco và cộng sự. Trong một nghiên cứu tại Mỹ ông đã công bố: tỷ lệ gặp kiểu gen đột biến thay thế nucleotid của SNP P47S TP53 là 4,7% trên người Mỹ gốc Phi và 0% trên người gốc Caucasian [139]. Như vậy cũng giống như người Mỹ da trắng trong nghiên cứu của Felley Bosco, chúng tôi không gặp kiểu gen đột biến, mang alen TP53-S47 trong nhóm đối tượng nghiên cứu của mình. Kết quả này là một minh chứng nữa, cho thấy các đa hình nucleotid đơn không giống nhau giữa các chủng tộc. Để khẳng định chắc chắn SNP P47S có thực sự tồn tại ở người Việt không những cần những nghiên cứu cộng đồng quy mô lớn hơn rất nhiều. Đối tượng nghiên cứu của chúng tôi đều lấy từ môi trường bệnh viện. Với kết quả này, chúng tôi cũng không thấy sự liên quan của đa hình nucleotid đơn P47S của gen TP53 với nguy cơ ung thư tế bào gan nguyên phát.

V217M là một đa hình nucleotid đơn thuộc exon 6, vùng trung tâm của gen TP53. Đây là một vùng chức năng quan trọng của gen TP53. Vùng gắn kết với các DNA đích để thực hiện các chức năng sinh học của TP53. Protein p53 thực hiện được chức năng sinh học của mình bằng việc gắn kết vào một loạt các gen đích trong tế bào, từ đó kích thích hay ức chế quá trình sao chép của chúng. Khi có những thay đổi ở vùng này có thể làm giảm khả năng gắn kết DNA, và giảm chức năng ức chế ung thư của p53. Sự thay đổi trình tự này có thể ảnh hưởng đến một số các gen hạ nguồn quan trọng trong con đường tín hiệu p53. Các gen bị ảnh hưởng trực tiếp gồm có CDKN1A, BAX và PMAIP1. Đây là các gen liên quan đến chức năng kích hoạt apoptosis của TP53. Nghiên cứu trên mô hình chuột cho thấy biến thể p53-M217 làm tăng sự biểu hiện của những gen trên cao gấp nhiều lần biến thể p53-V217. Như vậy, kiểu gen p53-M217 có khả năng bảo vệ tế bào chống lại các tác nhân gây ung thư tốt hơn kiểu gen p53-V217. Tuy nhiên trên thực tế, SNP V217M của gen TP53 chưa được nghiên cứu nhiều ngoài phòng thí nghiệm. Kết quả của chúng tôi cho thấy, V217M là một SNP hiếm gặp ở người Việt. Cần có các nghiên cứu dịch tễ gen cộng đồng để khẳng định SNP này có tồn tại trong nền tảng di truyền người Việt hay chỉ là đột biến thay thế nucleotid. Với kết quả này chúng tôi cũng không thấy có liên quan giữa SNP V217M với ung thư tế bào gan nguyên phát.

G360A là một đa hình nucleotid đơn ở khu vực tiếp giáp với các môi liên kết vùng C tận của p53. Đây là vùng có chức năng tạo cấu trúc bậc 4 của p53, vì vậy những đa hình gen tại codon này có thể ảnh hưởng tới chức năng tạo cấu trúc bậc 4 của protein p53. Biến thể 360 Alanin làm giảm sự biểu hiện của một số gen đích trong con đường tín hiệu p53, như yếu tố BAX, yếu tố điều hoà âm tính MDM2 và P53AIP, một protein có vai trò kích hoạt con đường apoptosis ty thể. Kết quả giải trình tự exon 10 của gen TP53, chúng tôi

không phát hiện sự khác biệt giữa hai nhóm bệnh và chứng, về đa hình kiểu gen G360A. Đây cũng là một SNP hiếm gặp nữa ở người Việt Nam.

R72P là một đa hình nucleotid đơn, được biết đến nhiều nhất của gen TP53. Đây cũng là SNP của TP53, được nghiên cứu nhiều nhất trong ung thư. Codon 72 nằm giữa vùng hoạt hoá N tận và vùng gắn kết DNA (DBD) của TP53. Tuy không ảnh hưởng trực tiếp đến sự gắn kết DNA đích nhưng R72P có thể ảnh hưởng đến cấu trúc bậc 3 của phân tử protein p53, làm che phủ vị trí gắn của các gen đích trên vùng DBD. Ngoài ra, codon 72 cũng nằm trên vùng giàu prolin thuộc exon 4, vùng được cho là có liên quan đến chức năng apoptosis của protein p53. Tại codon 72 tồn tại hai biến thể, bộ ba CGC mã hóa cho Arginin hoặc bộ ba CCC mã hóa cho Prolin. Biến thể Prolin (72P) làm giảm khả năng kích hoạt chết tế bào theo chương trình so với Arginin (72R). Hậu quả là biến thể 72R có khả năng bảo vệ tế bào tốt hơn biến thể 72P trước các tác nhân gây ung thư [11].

Chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật enzym cắt giới hạn (RFLP) để phân tích đa hình kiểu gen này. Đây là một kỹ thuật đã được thực hiện thường quy tại trung tâm gen-protein trường đại học Y Hà Nội. Với các máy phân tích hiện đại và quy trình đã được chuẩn hoá, các kết quả còn được đối chiếu bằng giải trình tự trực tiếp exon 4 nên các số liệu đưa ra là đáng tin cậy. PCR-RFLP là một kỹ thuật sinh học phân tử thông dụng nhưng hiệu quả, tương đối dễ thực hiện và giá thành hợp lý.

Trong tất cả các đa hình nucleotid đơn của gen TP53 mà chúng tôi phân tích, R72P có tỷ lệ các biến thể cân bằng nhất. Trong nhóm 547 đối tượng nghiên cứu, allele 72P chiếm 46,4% trong khi allele 72R chiếm 53,6%. Tỷ lệ các kiểu gen cũng cho thấy sự cân bằng P/P 26,4%; R/P 46,4%; R/R 27,1%. Kiểu gen đồng hợp P/P có tần xuất thấp hơn kiểu gen đồng hợp R/R. Kiểu gen

dị hợp R/P là gặp nhiều nhất. Với tỷ lệ các kiểu gen này, khó để phân định đâu là kiểu gen nguyên thủy đâu là kiểu gen hậu quả của đột biến thay thế nucleotid. Theo trình tự chuẩn trên gen bank hay theo tổng kết của Catherine Whebley, 72P mới là allen nguyên thủy [11]. Nhưng kết quả của chúng tôi lại cho thấy biến thể 72R mới vượt quá 50%. Vậy nên R72R có thể là kiểu gen nguyên thủy ở người Việt. Điều này cần phải kiểm chứng bằng các nghiên cứu khác nữa. Tuy nhiên, kết quả này cũng giống với các nghiên cứu khác tại đông Á như Nhật Bản, Đài Loan, Hàn quốc. Đây lại là một minh chứng nữa về tính chủng tộc của các đa hình nucleotid đơn.

Đánh giá SNP R72P liên quan UTTBGNP, chúng tôi so sánh tỷ lệ các kiểu gen giữa nhóm bệnh nhân ung thư gan và nhóm chứng. Kết quả cho thấy, nhóm bệnh nhân UTTBGNP có tỷ lệ các kiểu gen P72P, R72P, R72R lần lượt là 26,4%; 46,4%; 27,1%. So với nhóm chứng có tỷ lệ 16,9%; 52,45; 30,7%. Tỷ lệ kiểu gen của hai nhóm có một sự khác biệt có ý nghĩa ($p = 0,02$). Kiểu gen P/P gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh, trong khi kiểu gen R/R gặp nhiều hơn ở nhóm chứng. Kết quả này cho thấy một mối liên quan giữa các kiểu gen của SNP R72P với khả năng mắc UTTBGNP.

Để đánh giá khả năng mắc ung thư tế bào gan nguyên phát của các kiểu gen TP53-R72P, nghiên cứu sử dụng tỷ xuất chênh OR với khoảng tin cậy ở mức ý nghĩa 95%. Tỷ xuất OR được điều chỉnh bởi các biến tuổi, giới, HBV, HCV, nghiện rượu. Kết quả tại bảng 3.9 cho thấy, kiểu gen P/P có khả năng mắc UTTBGNP cao hơn kiểu gen R/R một cách có ý nghĩa. $OR = 1,77; 95%; CI (1,03 - 3,14)$. Phân tích riêng rẽ allen cho thấy: allen 72P có khả năng mắc bệnh cao hơn allen 72R. Nhưng không có ý nghĩa thống kê. $OR = 1,24; CI (0,78 - 3,45)$. Nếu xác định kiểu hình có liên quan đến UTTBGNP và tăng khả năng mắc bệnh mang tính trội, thì P là allen trội và R là lặn. Khi tổ hợp các kiểu gen theo mô hình lặn (R72R + R72P) thấy, người mang kiểu gen

đồng hợp trội P72P có khả năng mắc bệnh cao hơn 1,77 lần, CI (1,08 - 2,86) so với người mang hai kiểu gen còn lại. Tuy nhiên khi kết hợp mô hình trội (P/P + P/R) so với kiểu gen lặn R/R, không thấy có ý nghĩa thống kê.

So sánh với một số nghiên cứu khác, như của Yoon.Y.J và cộng sự tại Hàn Quốc thì kiểu gen P72P có nguy cơ mắc ung thư tế bào gan cao hơn R72R. OR = 2.1, 95% CI (1.25-3.24) [151]. Valeria Di Vuolo nghiên cứu ở người Italia, kết quả ghi nhận thì kiểu gen P/P có nguy cơ mắc ung thư tế bào gan cao hơn R/R. OR=3.56, 95% CI (1.3-9.7) [147]. Tại Châu Phi, vùng dịch tễ nhiễm virus viêm gan B và có tỷ lệ mắc UTTBGNP cao, cũng có các nghiên cứu SNP R72P trong UTTBGNP. Nghiên cứu của Ezzikouri năm 2007 tại vùng Bắc Phi cho thấy, kiểu gen P72P làm tăng nguy cơ mắc bệnh lên 2,3 lần. OR = 2.304 (95% CI 1.014-5.234). Điều quan trọng là khi ông so sánh giữa các giới cho thấy, kiểu gen P72P làm tăng nguy cơ cao hơn ở nữ so với nam giới. OR = 4.4; 95% CI, 1.18-16.42 so với OR = 1,57 ở nam [143]. Ngược lại với nghiên cứu này, một sự tìm kiếm ở người Thổ Nhĩ Kỳ lại cho một kết quả rất khác. Nguy cơ kiểu gen P72P mang lại cho nam giới nguy cơ mắc UTTBGNP cao hơn và có ý nghĩa hơn nữ. OR = 3.01, (95% CI: 1.14–7.97, P = 0.03) [144]. Tại Việt Nam đã có nghiên cứu của Nguyễn thu Thuý và cộng sự công bố trên Tạp chí nghiên cứu y học. Khi nghiên cứu TP53 R72P ở 100 bệnh nhân ung thư phổi và 100 người đối chứng thì tác giả đưa kết luận là chưa thấy liên quan giữa tỷ lệ mắc ung thư phổi và SNP R72P [162]. Tuy nhiên, chúng tôi thấy ngoài khác nhau do ở hai loại hình ung thư, thì việc chúng tôi làm trên một lượng mẫu lớn hơn nhiều so với Nguyễn thu Thuý cũng mang lại các thông tin khác biệt hơn. Hơn nữa, chúng tôi cũng cho rằng việc chọn lựa nhóm chứng một cách cẩn thận cũng hết sức quan trọng. Ít nhất cũng phải tương đương về độ tuổi và tỷ lệ giới với nhóm bệnh, vì các

loại hình ung thư như ung thư Gan, Phôi có tỷ lệ mắc rất khác biệt ở độ tuổi và giữa hai giới.

Sự không đồng nhất về kết quả nghiên cứu SNP R72P liên quan đến ung thư, đã được đưa ra bàn luận thời gian gần đây. Trong nghiên cứu tại Đài Loan, vùng lãnh thổ có tỷ lệ mắc ung thư gan cao liên quan HBV, người ta đã tìm kiếm sự liên quan giữa R72P và ung thư tế bào gan, trong 80 bệnh nhân [142]. Kết quả thu được không như mong đợi, biến thể 72P không làm tăng nguy cơ mắc UTTBGNP. Tuy nhiên, tại Trung Quốc, quốc gia có cùng nguồn gen di truyền dân tộc Hán như Đài Loan, và cũng thuộc vào số các nước có tỷ lệ nhiễm HBV lớn nhất thế giới, khi nghiên cứu ở 507 bệnh nhân mắc UTTBGNP và 541 đối chứng, kết quả đã có nhiều khác biệt so với nghiên cứu trước đó tại Đài Loan. Số liệu ghi nhận từ nghiên cứu cho thấy, SNP R72P liên quan đến UTTBGNP. Cụ thể, allele 72P làm tăng nguy cơ mắc bệnh hơn so với allele 72R, OR = 1.19 (95% CI 1.00-1.41). Kiểu gen đồng hợp tử P72P tăng nguy cơ gấp 1,79 lần so với kiểu gen nguyên thủy R72R. OR = 1.7 (P = 0.03). Khi kết hợp các kiểu gen lại cho thấy, mô hình P72P + R/P tăng nguy cơ mắc bệnh hơn kiểu gen đồng hợp R72R [16]. Sự khác biệt còn cần phải kiểm chứng bằng những nghiên cứu được thiết kế bài bản, nhưng một điều dễ nhận thấy là cỡ mẫu của nghiên cứu tại Trung Quốc đã lớn hơn rất nhiều so với nghiên cứu trước đó tại Đài Loan. Đây là điều kiện để các nghiên cứu bệnh chứng về SNP đưa ra các số liệu thuyết phục.

Trong nghiên cứu này, để phân tích sâu hơn về SNP R72P liên quan đến UTTBGNP, chúng tôi so sánh độ tuổi trung bình giữa các kiểu gen trong nhóm bệnh nhân ung thư gan. Kết quả thu được cũng rất đáng chú ý. Khi so sánh tuổi trung bình các nhóm bệnh nhân mang ba kiểu gen của SNP R72P, thì phát hiện kiểu gen nguyên thủy R72R có độ tuổi trung bình cao nhất ($60,8 \pm 10,2$), nhóm bệnh nhân mang kiểu gen P/P có độ tuổi trung bình thấp nhất

($53,1 \pm 14,3$). Kiểu gen đồng hợp P72P đã làm ung thư tế bào gan xuất hiện sớm hơn là 7.7 năm ($p = 0.01$) so với kiểu gen nguyên thủy R/R. Kết quả này cũng cố thêm cho thực tế là R72P làm tăng nguy cơ ung thư tế bào gan nguyên phát.

Từ tất cả các kết quả phân tích đa hình kiểu gen của TP53 đã thu được, chúng tôi thấy, các SNP dup16, D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A, có tỷ lệ gặp rất ít. Có thể gọi đây là các SNP hiếm gặp ở người Việt Nam. Để có số liệu đủ để phân tích nguy cơ mắc ung thư thì số lượng mẫu phải nhiều, như các nghiên cứu trong cộng đồng thì mới mang lại các thông tin có ý nghĩa. Riêng R72P, kết luận nghiên cứu của chúng tôi là có liên quan đến khả năng mắc ung thư gan nguyên phát. Tuy nhiên, các giá trị p đều ở mức tiệm cận ngưỡng ý nghĩa (0.02). Ước lượng khoảng tin cậy 95% đều không chứa 1 nhưng rất sát 1. Như vậy, sự liên quan ở đây chưa thật vững chắc. Để có những kết luận mạnh hơn, quả quyết hơn về vai trò của TP53- SNP trong nguy cơ mắc ung thư gan cần có những hướng tiếp cận nghiên cứu mới. Ví dụ như nghiên cứu các SNPs của TP53 với các yếu tố nguy cơ khác như viêm gan virus, nghiện rượu, xơ gan..., hay đặt trong các môi trường sống khác nhau. Nghiên cứu phải tiến hành trên số lượng bệnh nhân đủ lớn để những SNPs hiếm gặp cũng có thể đủ số liệu để tính toán nguy cơ mắc ung thư. Tuy nhiên, những kết quả nghiên cứu này cũng phần nào làm sáng tỏ cơ chế phân tử của UTTBGNP. Và kết quả nghiên cứu thêm một minh chứng nữa, khẳng định gen TP53 bị suy giảm chức năng bởi một nguyên nhân nào đó (ở đây là các kiểu gen đột biến) là một nguy cơ ung thư. Ngoài ra, các kết quả này còn mang đến các thông tin ban đầu về các SNP của gen TP53 ở người Việt Nam để từ đó định hướng cho các thiết kế nghiên cứu tiếp theo.

4.3. Đa hình kiểu gen MDM2

MDM2 là một gen quan trọng trong con đường tín hiệu p53. Dòng tín hiệu này là một cơ chế ức chế khối u quan trọng nhất của con người. MDM2 đóng vai trò điều hòa ngược âm tính của p53. Con đường chủ yếu, gen MDM2 kiểm soát p53 là kích hoạt giáng hoá protein p53 liên tục, làm suy giảm hàm lượng p53. Bất kỳ sự biểu hiện quá mức nào của MDM2 đều dẫn đến sự suy giảm chức năng p53 trong giữ ổn định di truyền cho tế bào trước các tác nhân gây tổn thương DNA. Tế bào sẽ mất kiểm soát các chu kỳ phân bào, mất khả năng tự sửa chữa DNA, và không còn khả năng kích hoạt chết tế bào theo chương trình. Hậu quả này, tạo điều kiện để hình thành nên các tế bào ung thư, trong đó có ung thư tế bào gan. Bất kỳ biến đổi nào trên phân tử DNA làm tăng cường biểu hiện của MDM2 đều có khả năng tác động đến quá trình biến đổi ung thư.

Một đa hình nucleotid đơn, tại intron 1, vùng khởi động (promoter), làm tăng cường biểu hiện của MDM2. Sự thay thế T>G tại codon 309 trong khu vực này làm tăng sự gắn kết với Sp1, một yếu tố hoạt hoá phiên mã của gen MDM2. Kết quả của sự thay thế nucleotid này, là mức độ biểu hiện của MDM2 RNA và protein tăng cao. Không những là vùng khởi động của MDM2, đây còn là vùng có vị trí gắn của phân tử protein p53. Nghiên cứu của Bond và cộng sự năm 2004, đã chỉ ra MDM2 SNP 309 T>G có thể làm tăng cường tổng hợp protein MDM2 ở những kiểu gen đột biến [140]. Cụ thể kiểu gen GG tăng hơn 4 lần và TG tăng hơn 1.9 lần so với kiểu gen nguyên thủy TT. Những ghi nhận này, cùng với nhiều bằng chứng khác của sự biểu hiện MDM2 quá mức, trong một loạt các bệnh ung thư của con người, đã củng cố cho lý thuyết rằng MDM2 biểu hiện quá mức trong kiểu gen GG của SNP 309T>G, có thể mang lại những thuận lợi nhất định cho sự hình thành khối u. Không những thế, kết quả nghiên cứu của Bond còn củng cố

cho lý thuyết, SNP 309T>G tăng cường sự gắn kết giữa yếu tố kích hoạt phiên mã Sp1 và vùng khởi động của gen MDM2. Kết quả, làm tăng cường quá trình phiên mã của gen MDM2. Đây là một nguy cơ của sự xuất hiện các tế bào ung thư.

Trong nghiên cứu này chúng tôi phân tích kiểu gen của SNP MDM2 309T>G ở 280 bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát và 267 người bình thường đối chứng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có sự khác biệt có ý nghĩa tỷ lệ kiểu gen của SNP 309T>G giữa nhóm bệnh nhân ung thư gan và nhóm chứng ($p=0,015$). Nhóm bệnh nhân UTTBGNP có tỷ lệ các kiểu gen GG, GT, TT lần lượt là 29,3%; 44,6%; 22,1% trong khi nhóm chứng là 19,1%; 52,4%; 28,5%. Kiểu gen GG gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh còn kiểu gen TT lại cao hơn ở nhóm chứng. Phân tích riêng rẽ các allele cũng thấy khác biệt có ý nghĩa, giữa hai nhóm đối tượng nghiên cứu ($p = 0,02$). Phân tích đa biến bằng mô hình hồi quy logistic cho thấy, kiểu gen GG của SNP 309T>G làm tăng một cách ý nghĩa, khả năng mắc UTTBGNP so với kiểu gen nguyên thủy TT (OR = 2,77; 95%; CI (1,56-4,94)). Kiểu gen GG so với sự kết hợp hai kiểu gen GT + TT cũng thấy một sự tăng có ý nghĩa khả năng mắc bệnh. OR = 2,56; 95%; CI (1,59-4,11).

Kết quả nhóm nghiên cứu thu được khá tương đồng với các nghiên cứu đã công bố trước đó. Đặc biệt là tại các nước trong khu vực Đông Á. Nghiên cứu của Y.J. Yoon và cộng sự ở người Hàn Quốc bị ung thư gan, cho kết quả (OR= 2.67, 95%, CI= 1.68- 4.22) [151]. Tỷ suất OR có một sự đồng nhất giữa nghiên cứu của Yoon và chúng tôi. Tại Nhật Bản nghiên cứu được biết đến nhiều nhất là của Dharel và cộng sự đã công bố, kiểu gen GG của SNP 309T>G tăng khả năng mắc UTTBGNP một cách ý nghĩa. OR = 2,27; 95%; CI (1,11 – 4,70) [19]. Một nghiên cứu khác ở Đài Loan năm 2009, đã công bố kết quả, kiểu gen GG tăng khả năng mắc bệnh lên 2,31 lần so với kiểu gen

nguyên thủy TT (OR = 2.31; 95%; CI (1.66-3.20) [148]. Các kết quả cho thấy tỷ số OR không có khác biệt so với ghi nhận của chúng tôi. Nhóm nghiên cứu đặt vấn đề về sự tương đồng giữa các chủng tộc tại vùng Đông Á như Hàn Quốc, Nhật Bản, Trung Quốc, Việt Nam, Đài Loan.

Một nghiên cứu ở Trung Đông đánh giá nguy cơ mắc ung thư tế bào gan của các kiểu gen SNP 309 T>G, kết quả thấy, kiểu gen GG làm tăng có ý nghĩa nguy cơ mắc bệnh. OR = 3.63 (95% CI, 1.65–8.00) [147]. Nghiên cứu khác ở châu Âu đã ghi nhận sự tăng có ý nghĩa nguy cơ mắc UTTBGNP cho những người mang kiểu gen G/G, OR = 3.56, (95% CI = 1.3-9.7) [148]. Hai tỷ suất OR đều khá cao, gần ba lần, khoảng tin cậy đều cách xa 1.0 cho thấy một sự liên quan khá chặt của SNP 309 với UTTBGNP ở các nghiên cứu này. Kết quả có tăng hơn so với của chúng tôi và một số nghiên cứu tại Đông Á khác.

Trong một số nghiên cứu về MDM2 SNP309 ở bệnh nhân ung thư, các tác giả đã chú ý đến khía cạnh tuổi mắc bệnh của các kiểu gen. Kết quả tại một số nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt về độ tuổi mắc bệnh giữa các kiểu gen. Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy độ tuổi phát hiện bệnh ở kiểu gen nguyên thủy TT là cao nhất $60,6 \pm 9,9$. Trong khi độ tuổi trung bình phát hiện bệnh ở kiểu gen đột biến GG là sớm nhất $53,9 \pm 13,7$. Sự chênh lệch về độ tuổi phát hiện bệnh giữa hai kiểu gen là 6,7 năm ($p = 0.02$). So sánh với nghiên cứu của Y.J. Yoon và cộng sự, kiểu gen TT là 55.1 năm còn kiểu gen GG là 50.9 năm ($p = 0.018$) [151]. Độ tuổi trung bình mắc bệnh sớm hơn ở kiểu gen đột biến GG đã minh chứng thêm về liên quan của SNP 309 T>G đến khả năng mắc UTTBGNP.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy một thực tế là kiểu gen đột biến GG của SNP 309T>G gen MDM2 có nguy cơ mắc ung thư tế bào

gan nguyên phát cao hơn kiểu gen nguyên thủy TT và tuổi mắc bệnh ở kiểu gen này cũng sớm hơn. Kết quả nghiên cứu cũng cho phép đặt giả định một mô hình trội dành cho allele G. Allele G liên quan đến nguy cơ ung thư tế bào gan nguyên phát và hai allele G trong kiểu gen đồng hợp trội làm tăng hơn nguy cơ đó. Những kết quả này mở ra một khả năng phát triển MDM2 309T>G thành marker sàng lọc các đối tượng có nguy cơ cao mắc ung thư gan tại Việt Nam. Tuy nhiên để có được ứng dụng như vậy cần nhiều hơn các mô hình nghiên cứu khác, để khẳng định chắc chắn nguy cơ từ kiểu gen GG của đa hình nucleotid đơn này. Chẳng hạn như mô hình *knock out* gen trên chuột và quan sát những biến đổi ung thư xảy ra theo thời gian. Mô hình nghiên cứu này mất nhiều thời gian và đòi hỏi kỹ thuật cao, nhưng kết quả mang lại sẽ khẳng định chắc chắn cho những kết luận nghiên cứu mà chúng tôi vừa thu được.

4.4. Tương quan giữa đa hình kiểu gen TP53, MDM2 và các yếu tố nguy cơ gây ung thư tế bào gan nguyên phát

Một câu hỏi được đặt ra khi chúng tôi tiếp cận với hướng nghiên cứu này là trong nhóm bệnh nhân mắc ung thư tế bào gan nguyên phát, tại sao có người trẻ tuổi và người nhiều tuổi, nam giới mắc nhiều hơn nữ giới, nhiễm HBV, HCV, nghiện rượu có người tiến triển đến thành ung thư gan có người không, người phát bệnh sớm người phát bệnh muộn, ung thư gan người có xơ gan người không... Các kiểu gen của TP53 và MDM2 có vai trò gì ở đây không? Hay kiểu gen TP53 và MDM2 của những nhóm đối tượng này có khác nhau không? Vì con đường tín hiệu p53 vẫn được coi là cơ chế chống lại ung thư mạnh nhất của cơ thể con người. Từ những giải thích, trả lời thuyết phục cho những câu hỏi nghiên cứu trên, sẽ đưa ra những kết luận: sự tương tác giữa các kiểu gen và yếu tố nguy cơ từ môi trường có làm tăng hơn khả

năng mắc bệnh cho những đối tượng phơi nhiễm với các yếu tố nguy cơ đó không? Từ đó có thể sàng lọc di truyền, tư vấn cho các đối tượng có nguy cơ cao trong cộng đồng.

Chúng ta phải chấp nhận một thực tế là, biến đổi ở một gen nào đó, mình nó khó có thể giải thích được cơ chế bệnh sinh cho sự hình thành ung thư. Các gen trong cơ thể thường tương tác, thúc đẩy, kìm hãm, điều hoà lẫn nhau trong các con đường tín hiệu nội bào. Ngoài ra, trong môi trường sống ngày nay, con người cũng có thể bị phơi nhiễm với nhiều các yếu tố nguy cơ. Như khói thuốc, hoá chất, virus, rượu bia... Chính vì vậy, một nghiên cứu riêng lẻ từng yếu tố nguy cơ sẽ không cung cấp các số liệu sát thực. Nếu xem các kiểu gen đột biến là một nguy cơ, thì một mô hình phân tích đa biến bằng phương trình hồi quy logistic là phù hợp. Phương trình hồi quy logistic sẽ phản ánh chính xác sự ảnh hưởng cùng lúc của các yếu tố nguy cơ lên khả năng mắc bệnh. Nhóm nghiên cứu đã áp dụng phương pháp phân tích này và thu được các kết quả đáng chú ý.

4.4.1. Kết hợp kiểu gen của TP53 và MDM2

TP53 và MDM2 là những gen trong con đường tín hiệu p53. Giữa chúng có một mối quan hệ chặt chẽ. MDM2 có chức năng điều hòa ngược âm tính hoạt động của p53. Sự biểu hiện quá mức của MDM2 làm ức chế khả năng kiểm soát tế bào của p53 dẫn đến mất kiểm soát các chu trình phân bào, khả năng tự sửa chữa DNA, và chương trình chết tế bào. Hậu quả này, tạo điều kiện để hình thành nên các tế bào ung thư, trong đó có ung thư tế bào gan. Bất kỳ biến đổi nào trên phân tử DNA làm tăng cường biểu hiện của MDM2 đều có khả năng tác động đến quá trình biến đổi ung thư. Nếu xem các kiểu gen TP53 và MDM2 là một yếu tố nguy cơ của UTTBGNP thì sự kết hợp hai yếu tố nguy cơ có làm tăng khả năng mắc bệnh. Trên thực tế, sự tổ

hợp một cách ngẫu nhiên của chọn lọc tự nhiên sẽ tạo ra nhiều tổ hợp gen khác nhau từ các SNP, dành cho mỗi cá thể. Trung bình mỗi SNP có 3 kiểu gen, khi tổ hợp giữa n SNP sẽ tạo ra $3n$ kiểu gen tổ hợp.

Qua kết quả thu được từ phân tích đa hình kiểu gen của TP53 và MDM2, chúng tôi nhận thấy, chỉ có hai SNP: TP53 R72P, MDM2 SNP 309 là có sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm bệnh và nhóm chứng và có liên quan đến khả năng mắc UTTBGNP. Chính vì vậy, chúng tôi đã kết hợp các kiểu gen của SNP TP53 R72P và MDM2 309T>G để đánh giá khả năng mắc UTTBGNP thông qua tỷ suất OR (bảng 3.15). Kết quả phân tích cho thấy, khả năng mắc bệnh tăng cao một cách có ý nghĩa khi kết hợp hai kiểu gen nguy cơ cao nhất của SNP TP53 R72P và MDM2 309T>G, (P/P + GG). Tỷ suất OR = 6,01, 95%, CI (1,96 - 18,42). Sự kết hợp hai kiểu gen này, đã làm tăng khả năng mắc bệnh hơn rất nhiều so với khi chúng đứng riêng rẽ (so với bảng 3.9 và 3.13). Ngoài ra, kết quả tại bảng 3.15 còn cho thấy, sự kết hợp hai kiểu gen R/P của TP53 R72P và GG của SNP MDM2 309T>G_{3,24} cũng làm tăng có ý nghĩa khả năng mắc bệnh. OR = 3,24; 95%; CI (1,25 - 8,39).

Qua kết quả trên cho thấy, sự kết hợp kiểu gen TP53 và MDM2 làm tăng khả năng mắc bệnh so với các kiểu gen riêng rẽ. Điều này có thể hiểu được, bởi vì thường có sự phối hợp nhiều gen trong biểu hiện một kiểu hình hay một chức năng nào đó trong tế bào. Mà mối quan hệ giữa gen TP53 và MDM2 lại rất khăng khít trong cơ chế chống ung thư của cơ thể con người. Ngoài ra, SNP MDM2 309T>G nằm ở vùng có vị trí gắn kết với phân tử protein p53 của gen MDM2. Tuy nhiên, hạn chế của các kết quả trên là số mẫu của một số kiểu gen tổ hợp rất thấp, do xác suất chia nhỏ của 9 kiểu gen kết hợp. Cần có số lượng mẫu lớn hơn rất nhiều, để có xác suất các kiểu gen kết hợp đủ lớn, có tính đại diện cho cộng đồng hơn.

Đã có một số nghiên cứu trên thế giới, đã tiến hành kết hợp hai SNP TP53 R72P và MDM2 309T>G. Kết quả cũng làm tăng một cách rất ý nghĩa nguy cơ mắc bệnh của các kiểu gen đột biến. Kiểu gen P/P của TP53 R72P khi kết hợp với 309GG của MDM2 làm tăng nguy cơ mắc ung thư gan lên nhiều lần so với sự kết hợp giữa kiểu gen R/R của TP53 R72P với 309T/T của MDM2 [20],[150]. Kết hợp kiểu gen, cũng làm tăng rất cao nguy cơ mắc ung thư tế bào gan và khởi phát sớm hơn trong những bệnh nhân viêm gan B mạn tính [151],[152].

Các con đường tín hiệu nội bào mà điển hình là con đường p53, rất phức tạp, các gen đan xen nhau, phối hợp, điều hoà lẫn nhau tác dụng lên các hoạt động tế bào. Trong đó có gây ra ung thư hay ức chế sự hình thành khối u. Chính vì thế trong chiến lược nghiên cứu cần có sự phân tích đa gen trên cùng một bệnh nhân. Các nghiên cứu có thể chưa có điều kiện để tiến hành cùng lúc, nhưng các mẫu, thông tin mẫu và dữ liệu các gen đã nghiên cứu phải được lưu trữ, để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp và tổng kết thống kê sau này. Lựa chọn các gen nghiên cứu có liên quan chặt chẽ với nhau về chức năng là đương nhiên. Ví dụ như trong cùng một con đường tín hiệu. Tuy nhiên, trên thực tế những hiểu biết của con người về sự tương tác giữa các gen với nhau, còn chưa đủ và rõ ràng. Gen TP53, có thể còn tương tác với nhiều gen khác nữa trong cơ thể, theo cách này hay cách khác, trong quá trình ức chế sự hình thành và phát triển khối u. Nhưng dù thế nào, một chân lý không thể phủ nhận là, bản thân một kiểu gen, mình nó chưa đủ mạnh để gây ra ung thư, nhưng sự tổ hợp ngẫu nhiên cùng lúc các kiểu gen không alen khác nhau có thể làm nên sự khác biệt. Đây cũng là điều tuyệt diệu của di truyền học và sự sống trên trái đất.

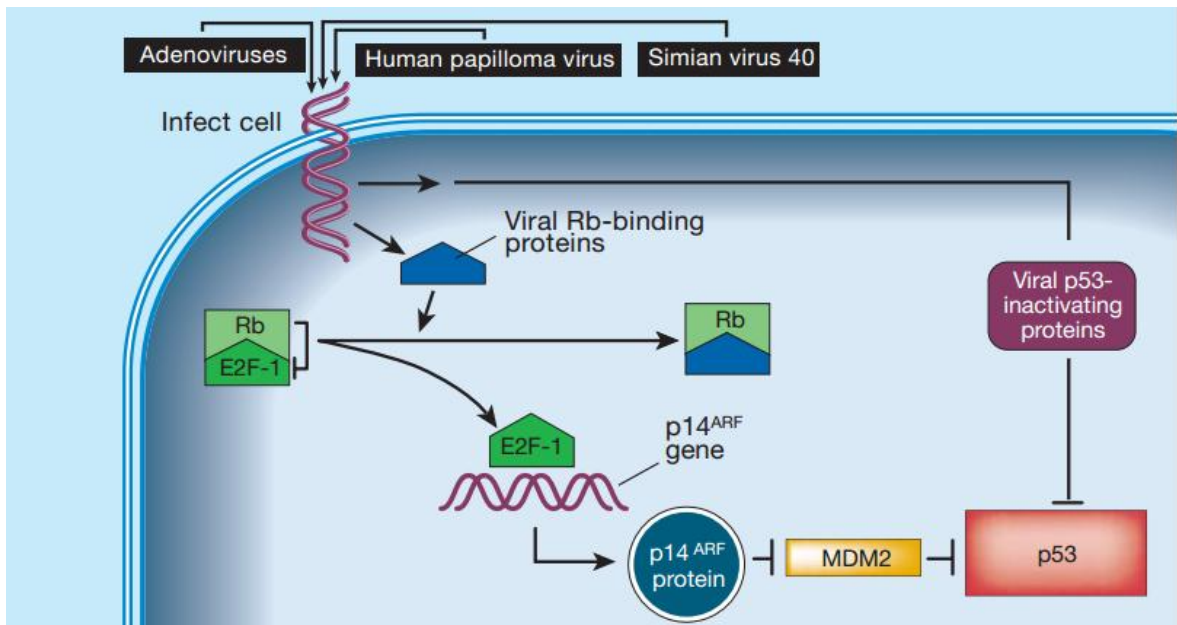
4.4.2. Đa hình kiểu gen TP53, MDM2 và HBV

Virus viêm gan B làm một yếu tố nguy cơ lớn nhất của UTTBGNP trên phạm vi toàn thế giới. Việt Nam nằm trong vùng dịch tễ nhiễm HBV cao, nên số trường hợp UTTBGNP có tiền sử nhiễm HBV cũng rất nhiều. Tuy nhiên, trên thực tế có nhiều trường hợp có tiền sử viêm gan virus B nhưng không tiến triển thành ung thư tế bào gan. Hoặc cùng nhiễm HBV nhưng có người khởi phát ung thư gan rất trẻ nhưng cũng có những người khởi phát chậm hơn. Các kiểu gen của TP53 và MDM2 có vai trò gì trong hiện tượng này không. Nhóm nghiên cứu đã tiến hành phỏng vấn tiền sử nhiễm virus của các đối tượng nghiên cứu và kết hợp với hồi cứu bệnh án điều trị của bệnh nhân ung thư gan. Kết quả thu được một tỷ lệ nhiễm HBV rất cao trong nhóm bệnh (60,0%). Sử dụng phân tích đa biến để tìm mối tương quan giữa các kiểu gen của TP53 R72P và MDM2 309T>G với tình trạng nhiễm HBV trong nguy cơ mắc ung thư tế bào gan nguyên phát, chúng tôi đã thu được những kết quả rất đáng chú ý.

Khi phân tích liên quan của các kiểu gen với khả năng mắc ung thư cho 207 trường hợp nhiễm HBV. Trong đó có 171 trường hợp thuộc nhóm bệnh nhân UTTBGNP và 36 trường hợp thuộc nhóm chứng. Chúng tôi thấy kiểu gen P/P của SNP TP53 R72P và GG của MDM2 309T>G làm tăng khả năng mắc ung thư tế bào gan lên một cách có ý nghĩa. Tỷ suất OR lần lượt là: OR = 3,23; 95%; CI (1,12 – 9,45) và OR = 4,38; 95%; CI (1,26 – 15,30). Chỉ số này cao hơn so với nhóm không nhiễm HBV và cao hơn so với khi phân tích cả nhóm 547 đối tượng nghiên cứu ở phần trên. Kết quả của nghiên cứu phù hợp với một số nghiên cứu đã công bố. Đặc biệt là các nghiên cứu tại khu vực Đông Á. Một nghiên cứu tại Trung Quốc năm 2012 cho kết quả, kiểu gen GG của SNP MDM2 309T>G làm tăng khả năng mắc UTTBGNP cho những người nhiễm HBV. OR = 1,35; 95%; CI (1,06 – 1,72) [155]. Nghiên cứu khác

ở Hàn Quốc có kết quả, người nhiễm HBV mang kiểu gen P72P của SNP R72P gen TP53 tăng khả năng mắc UTTBGNP cao hơn người mang kiểu gen nguyên thủy R/R. OR = 3,73 95% CI (1,73 – 8,02). Đối với kiểu gen GG của MDM2 309T>G, tỷ xuất OR = 5,61 95% CI (2,67 – 11,74). [151]. Đặc biệt, một nghiên cứu tại Đài Loan năm 2005 của Zhu và cộng sự cho thấy, allele 72P của SNP TP53 R72P làm tăng nguy cơ mắc bệnh cho những người nhiễm HBV lên 11 lần [154].

Tuy các kết quả có khác nhau nhưng cũng số liệu của chúng tôi, đều khẳng định các kiểu gen đột biến của hai SNP R72P và MDM2 309T>G làm tăng khả năng mắc bệnh cho những người nhiễm HBV. Điều này, cho phép nhóm nghiên cứu đưa ra nhận định về một sự tương tác giữa các gen TP53, MDM2 và virus viêm gan B. Sự tương tác này sẽ đi theo chiều hướng mắc bệnh nếu đó là các kiểu gen đột biến. Con đường tín hiệu p53, dòng tín hiệu nội bào mà ở đó TP53 và MDM2 là các thành tố quan trọng, bị kích hoạt bởi các yếu tố nguy cơ tổn hại bộ gen trong đó có virus. Các virus khi xâm nhập tế bào sẽ kích hoạt dòng tín hiệu sinh trưởng bất thường hay chính là các oncogen. Hay gặp nhất là p14^{ARF}. Đây là một protein nội bào có khả năng ức chế MDM2. Tín hiệu virus xâm nhập sẽ được p14^{ARF} cảnh báo đến p53 gián tiếp qua việc ức chế MDM2. Khi MDM2 bị ức chế sẽ giải phóng p53 để thực hiện các chức năng sinh học của mình [12]. Kết quả là tế bào giữ được ổn định bộ gen trước các tác động từ virus. Tuy nhiên nếu MDM2 bất thường, gắn kết MDM2-p53 bất thường, bản thân p53 bất thường, thì các tín hiệu virus xâm nhập sẽ không được truyền đi, hoặc truyền đến nhưng không được giải quyết. Hậu quả là virus vô tư làm tổn thương bộ gen của tế bào, để tạo ra các tế bào có đặc tính di truyền quái đản, hay các tế bào ung thư. Các kiểu gen đột biến của SNP R72P và MDM2 309T>G là một trong các bất thường đó.



Hình 4.1. Virus và gen TP53, MDM2 trong con đường tín hiệu p53

Nguồn Nature Review số 408 năm 2000

Các virus mã hoá cho một loại protein có khả năng ngăn cản sự liên kết giữa protein (Rb) với một trong những yếu tố phiên mã trong gia đình E2F, điển hình là E2F-1. Khi E2F-1 không được kết hợp với Rb sẽ kích hoạt sản xuất protein p14 ARF. Đây là yếu tố ức chế hoạt động của MDM2. Khi MDM2 bị ức chế đồng nghĩa với p53 được giải phóng hay kích hoạt. Sự kích hoạt p53 giúp các tế bào khoẻ mạnh kiểm soát các ảnh hưởng từ virus lên bộ gen tế bào. Tuy nhiên virus có thể chống trả lại hàng rào bảo vệ này bằng cách sản xuất những protein có khả năng ức chế p53. Điều này mở đường cho những tế bào nhiễm virus tiến triển thành tế bào ác tính.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ sử dụng thuật ngữ khả năng mắc bệnh để phiên giải tỷ xuất OR chứ không phải nguy cơ mắc bệnh. Đặc tính của một nghiên cứu bệnh chứng chỉ dừng ở mô tả gián tiếp nguy cơ mắc bệnh qua tỷ xuất OR. Một thiết kế nghiên cứu khác có thể sử dụng để xác định

chính xác nguy cơ mắc ung thư tế bào gan của những kiểu gen, khi bị nhiễm HBV. Một nghiên cứu có thể đưa ra chỉ số nguy cơ RR (relative risk). Đó là các tiến cứu, được tiến hành trong nhiều năm, sau khi đã xác định chính xác nhiễm HBV mạn. Kết quả quan sát được trong thời gian dài sẽ ghi nhận số bệnh nhân tiến triển thành ung thư tế bào gan nguyên phát. Từ tỷ lệ phát bệnh thu được, sẽ tính toán chính xác chỉ số nguy cơ (RR) mắc ung thư tế bào gan cho từng kiểu gen. Hơn nữa, độ tuổi trung bình của các bệnh nhân ung thư còn cho biết tuổi khởi phát bệnh của các kiểu gen gây ra cho các đối tượng nhiễm HBV. Đây không những là hạn chế lớn nhất của đề tài nghiên cứu này mà cũng là hạn chế chung của các nghiên cứu bệnh chứng. Tuy nhiên mô hình tiến cứu, đòi hỏi phải tiến hành trên khoảng thời gian kéo dài trong nhiều năm và phải quản lý được các đối tượng tham gia nghiên cứu trong suốt quá trình điều trị. Tại Việt Nam, HBV vẫn là nguyên nhân lớn nhất của ung thư tế bào gan. Việc điều trị và quản lý bệnh nhân viêm gan virus B đang ngày được quan tâm. Một nghiên cứu tiến cứu trên những đối tượng này là có khả thi.

4.4.3. Đa hình kiểu gen và một số yếu tố nguy cơ UTTBGNP khác

Sự tương tác giữa các kiểu gen và môi trường sẽ quyết định kiểu hình. Nếu coi mắc ung thư tế bào gan là một kiểu hình thì chắc chắn đó phải là kết quả của quá trình tương tác giữa bộ gen với các yếu tố nguy cơ từ môi trường. Thực tế là gan của chúng ta đang hàng ngày chịu vô vàn những tác động bất lợi từ các yếu tố nguy cơ ngoài môi trường. Rất khó khăn để một kiểu gen, mình nó đủ để giải thích cho cơ chế phân tử của UTTBGNP. Chính vì thế những nghiên cứu SNP trong UTTBGNP gần đây đã có những cách tiếp cận mới. Đó là nghiên cứu các SNP trong các nguy cơ UTTBGNP khác như HCV, HBV, nghiện rượu, NASH, hút thuốc lá... Các nghiên cứu SNP của gen TP53 và MDM2 và các yếu tố nguy cơ của UTTBGNP trên thế giới, chỉ tập trung vào R72P và 309T>G. Yếu tố nguy cơ được nghiên cứu nhiều nhất là

nhiễm HBV mạn tính, HCV mạn tính. Đây là hai nguy cơ lớn của UTTBGNP trên toàn cầu. Ngoài ra hai yếu tố nguy cơ này cũng dễ kiểm soát, dễ lượng giá khi chọn đối tượng nghiên cứu. Không có nhiều nghiên cứu ở người nghiện rượu vì khó khăn khi chọn nhóm chứng. Đặc biệt chưa có nghiên cứu nào liên quan đến phơi nhiễm Aflatoxin. Thực tế có những khó khăn khi xác định có hay không tình trạng phơi nhiễm Aflatoxin. Ngoài ra Aflatoxin là chất gây đột biến mạnh cho gen, trong đó có gen TP53. Ở đây, sự tương tác gen-môi trường là mạnh mẽ, một phía và gây hậu quả tổn thương không hồi phục cho bộ gen. Trường hợp này, phải có cách tiếp cận nghiên cứu hoàn toàn khác. Đó là nghiên cứu các đột biến gen.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ các kiểu gen của SNP R72P và 309T>G không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh nhân ung thư có nghiện rượu và không nghiện rượu. Với viêm gan virus C, do số lượng mẫu xác định thấp nên khó khăn trong phân tích số liệu. Ngoài nguyên nhân là tỷ lệ nhiễm HCV ở nước ta không cao thì phương pháp thu thập số liệu dựa nhiều vào phỏng vấn cũng có thể bỏ sót đối tượng. Vì viêm gan C thường rất mờ nhạt về triệu chứng, chỉ phát hiện được bằng xét nghiệm. cần phải có các nghiên cứu bài bản hơn để xác định mối tương quan giữa gen TP53 và MDM2 với HCV.

Các yếu tố tiên lượng mắc bệnh như tuổi > 40, giới nam, tình trạng xơ gan, nồng độ AFP, được nhóm nghiên cứu phân tích với mục đích đưa ra bức tranh tương đối đầy đủ về nguy cơ mắc UTTBGNP. Tuy nhiên kết quả cho thấy không có sự liên quan của các kiểu gen TP53 và MDM2 với các yếu tố này.

Nghiên cứu các yếu tố này, trong nguy cơ phát sinh phát triển UTTBGNP cần phải có các hướng tiếp cận khác, phải làm các nghiên cứu tiến cứu, để có các tỷ lệ mắc từ đó tính ra được chỉ số nguy cơ (Relative Risk-RR)

cho mỗi yếu tố. Bởi vì tỷ lệ mắc của UTTBGNP thực tế tại Việt Nam là khá cao nên ước lượng chỉ số nguy cơ, gián tiếp qua tỷ xuất OR sẽ không sát với thực tế.

Giới hạn của đề tài nghiên cứu này, chúng tôi chỉ ước lượng chỉ số nguy cơ qua tỷ xuất OR, bằng việc điều tra lại tiền sử phơi nhiễm với các yếu tố nguy cơ của đối tượng nghiên cứu. Câu hỏi đặt ra là, vậy tỷ lệ phơi nhiễm các yếu tố nguy cơ của nhóm chúng có sát với tỷ lệ thực không? Quá trình lựa chọn nhóm chúng của chúng tôi hoàn toàn ngẫu nhiên, những người đi khám sức khỏe tại khoa Khám Bệnh, Bệnh viện Đa Khoa tỉnh Thanh Hoá. Nhưng không thể khẳng định nhóm chúng của nghiên cứu đã đại diện cho cộng đồng vì số lượng mẫu chỉ có 267 người và ở trong môi trường bệnh viện. Cần phải làm trên một số lượng chúng nhiều hơn rất nhiều thì mới có tỷ lệ phơi nhiễm các yếu tố nguy cơ sát với tỷ lệ hiện hành. Một hạn chế nữa là nghiên cứu chỉ dừng ở việc hồi cứu các yếu tố nguy cơ từ các bệnh án điều trị của bệnh nhân. Sau đó tìm kiếm có hay không sự khác biệt tỷ lệ kiểu gen giữa hai nhóm bệnh nhân UTTBGNP có và không có yếu tố nguy cơ. Và kiểu gen nào gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh nhân có yếu tố nguy cơ. Chứ không thể khẳng định kiểu gen có làm tăng nguy cơ phát bệnh UTTBGNP cho những người có yếu tố nguy cơ. Các thông tin này, cần phải có các tỷ lệ mắc bệnh phát sinh của các yếu tố nguy cơ thì mới có thể tính toán được.

Trong khuôn khổ kinh phí cũng như thời gian của đề tài chúng tôi chỉ có mong muốn đưa lại một bức tranh các yếu tố nguy cơ gây ung thư tế bào gan nguyên phát, mà trong đó có SNP TP53 R72P và MDM2 309. Thực tế đây chỉ là một số nhận định ban đầu về tương quan giữa gen với gen, giữa gen với môi trường. Cần nhiều hơn các nghiên cứu tiếp theo, với các thiết kế hiện đại để đánh giá sự tương tác gen-gen, gen-môi trường. Chẳng hạn nghiên cứu bệnh chúng trên cùng một đối tượng có phơi nhiễm với các yếu tố nguy cơ từ

môi trường, trong đó có nhóm bị ung thư và nhóm không. Kết quả sẽ trả lời rõ hơn câu hỏi tại sao cùng tiếp xúc với yếu tố nguy cơ tại sao người bị ung thư người không, hay tại sao người phát bệnh sớm người muộn, người tiến triển nhiều năm qua xơ gan người chuyển thẳng đến ác tính. Các kiểu gen của hai gen này có vai trò gì trong các hiện tượng đó không? Từ đó có thể sàng lọc, tư vấn di truyền cho các nhóm đối tượng nguy cơ trong cộng đồng, góp phần làm giảm tỷ lệ mắc ung thư tế bào gan tại Việt Nam.

KẾT LUẬN

1. Phân bố các kiểu gen TP53 ở bệnh nhân UTTBGNP và nhóm chứng

- Không thấy sự khác biệt tỷ lệ kiểu gen của các SNPs: D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A giữa nhóm bệnh và nhóm chứng.

- Kiểu gen A1A2 của đa hình kiểu gen dup16 gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh ($p=0,02$).

- Tỷ lệ phân bố kiểu gen của SNP R72P giữa nhóm bệnh và nhóm chứng khác biệt có ý nghĩa ($p = 0,02$). Kiểu gen P72P gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh. 26,4% so với 16,9% ở nhóm chứng.

- Khả năng mắc bệnh của người mang kiểu gen P72P cao hơn người mang kiểu gen R72R. OR=1,77; 95%; CI (1,03 - 3,14).

- Người mang kiểu gen P72P có khả năng mắc bệnh cao hơn so với kết hợp cả hai kiểu gen R72P và R72R, OR =1,77; 95%, CI (1,08 - 2,86).

- Nhóm bệnh nhân UTTBGNP mang kiểu gen P72P có độ tuổi trung bình thấp hơn những bệnh nhân mang kiểu gen R72R khoảng 7,7 năm, ($p=0,01$).

2. Phân bố các kiểu gen MDM2 ở bệnh nhân UTTBGNP và nhóm chứng

- Có sự khác biệt có ý nghĩa, tỷ lệ phân bố kiểu gen, giữa nhóm bệnh nhân ung thư tế bào gan và nhóm chứng ($p=0,015$). Tần suất gặp kiểu gen GG cao hơn ở nhóm bệnh 29,3% so với 19,1% ở nhóm chứng ($p=0,015$).

- Kiểu gen GG của SNP MDM2 309 T>G khả năng mắc UTTBGNP cao hơn kiểu gen nguyên thủy TT. OR = 2,77; 95%; CI (1,56-4,94).

- Kiểu gen GG có khả năng mắc bệnh cao hơn kết hợp hai kiểu gen GT và TT. OR = 2,56; 95%; CI (1,59-4,11).

- Những bệnh nhân UTTBGNP mang kiểu gen GG có tuổi trung bình thấp hơn nhóm mang kiểu gen TT khoảng 6,7 năm ($p = 0,02$).

3. Tương quan giữa các kiểu gen TP53, MDM2 với một số yếu tố nguy cơ ung thư tế bào gan nguyên phát

- Kết hợp kiểu gen của SNP R72P gen TP53 và SNP 309T>G gen MDM2 làm tăng khả năng mắc bệnh.

+ Kiểu gen P72P của TP53 kết hợp với kiểu gen GG của MDM2, OR = 6,01; 95%; CI (1,96 - 18,42).

+ Kiểu gen R72P của TP53 kết hợp với kiểu gen GG của MDM2, OR = 3,24; 95%; CI (1,25 - 8,39).

- Không tìm thấy liên quan giữa tình trạng nghiện rượu, HCV, tình trạng xơ gan, giới tính, độ tuổi trên dưới 40 với tỷ lệ phân bố các kiểu gen TP53 và MDM2 ở nhóm đối tượng nghiên cứu.

- Các kiểu gen của SNP R72P gen TP53 và 309T>G của gen MDM2 làm tăng khả năng mắc UTTBGNP cho những người nhiễm HBV.

+ Kiểu gen P72P của TP53, OR = 3,23; 95%; CI (1,12 – 9,45).

+ Kiểu gen GG của MDM2, OR = 4,38; 95%; CI (1,26 – 15,30).

KIẾN NGHỊ, ĐỀ XUẤT

1. Cần phải có nghiên cứu với cỡ mẫu đủ lớn (tương đương các nghiên cứu dịch tễ gen cộng đồng) để đánh giá đầy đủ mối liên quan giữa các kiểu gen MDM2 và TP53 với UTTBGNP cũng như một số loại hình ung thư khác ở người Việt Nam.

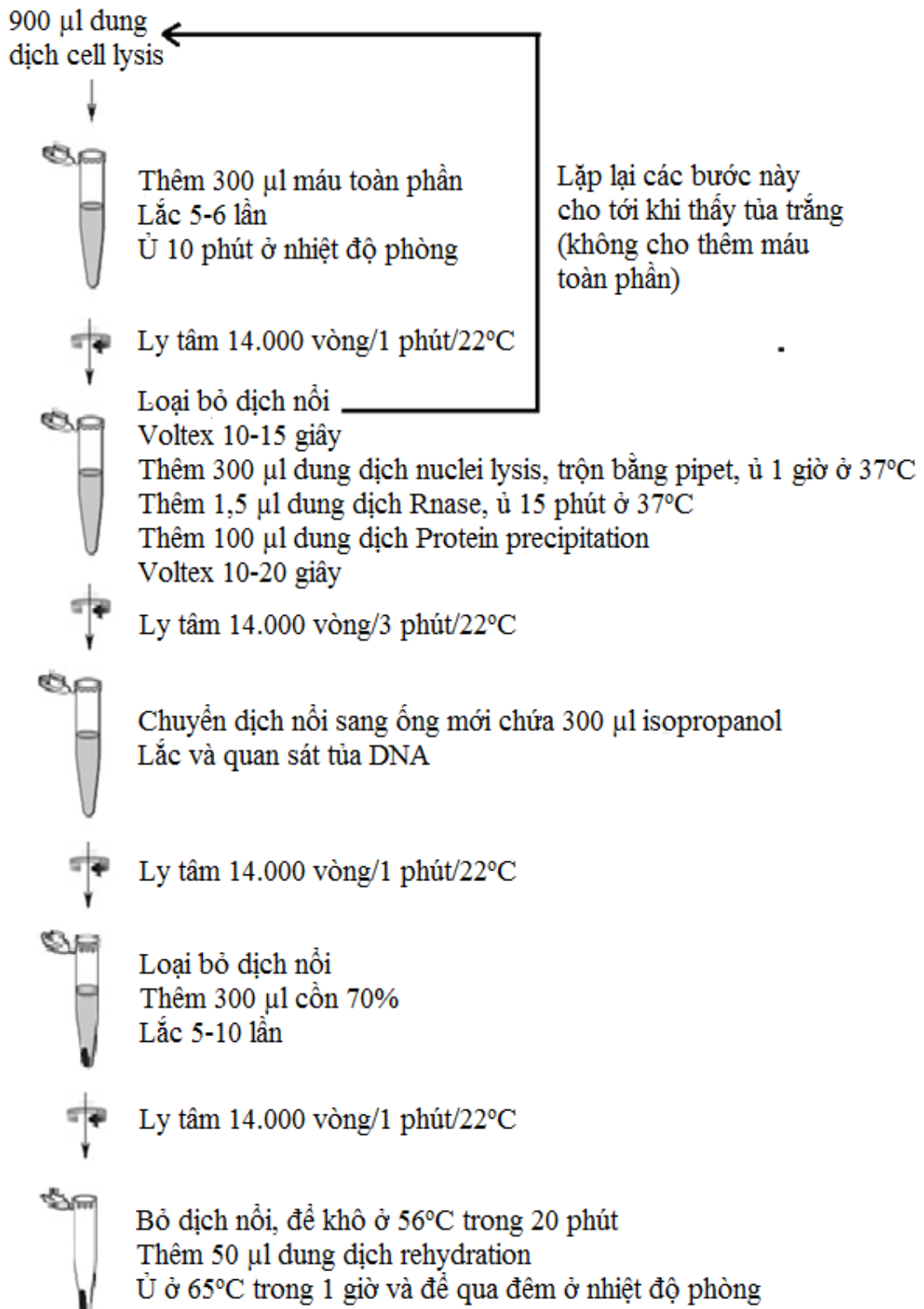
2. Cần phải nghiên cứu kiểu gen TP53 và MDM2 trong sự tương tác với các yếu tố nguy cơ UTTBGNP bằng mô hình nghiên cứu xuôi (tiền cứu). Ví dụ, nghiên cứu kiểu gen TP53 và MDM2 trong sự phát sinh phát triển UTTBGNP trên những bệnh nhân nhiễm HBV, HCV mạn tính, hay trên những người lạm dụng bia rượu. Từ các kết quả nghiên cứu đó có thể tính toán chính xác nguy cơ mắc bệnh cho mỗi nhóm đối tượng phơi nhiễm mang các kiểu gen khác nhau thông qua chỉ số nguy cơ RR.

3. Cần có sự phân tích đa gen trên cùng một bệnh nhân. Các nghiên cứu có thể chưa có điều kiện để tiến hành cùng lúc, nhưng các mẫu, thông tin mẫu và dữ liệu các gen đã nghiên cứu phải được lưu trữ, để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp và các thống kê cộng dồn sau này.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ TRONG KHUÔN KHỔ ĐỀ TÀI

1. Trịnh Quốc Đạt, Phạm Lê Anh Tuấn, Nguyễn Thị Vân Hồng, Nguyễn Đức Hình, Trần Văn Khánh, Tạ Thành Văn, Trần Huy Thịnh (2015). “Tính đa hình thái đơn nucleotid 309 gen MDM2 và nguy cơ ung thư tế bào gan nguyên phát ở Việt Nam”, *Tạp chí nghiên cứu y học*, 94(2), tr. 9-15.
2. Trịnh Quốc Đạt, Trần Huy Thịnh, Trần Văn Khánh, Phạm Lê Anh Tuấn, Phạm Ngọc Minh, Ngô Thanh Tùng, Tạ Thành Văn (2016). “Đa hình kiểu gen TP53 SNP Arg72Pro trên bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát tại Việt Nam”, *Tạp chí nghiên cứu y học*, 100(2), tr. 26-32.
3. Trịnh Quốc Đạt, Trần Huy Thịnh (2016), "Một số đa hình gen TP53 trong ung thư tế bào gan nguyên phát", *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 102(4), tr. 1-9.
4. Trịnh Quốc Đạt, Trần Huy Thịnh (2017), "Đa hình kiểu gen MDM2 và nguy cơ ung thư tế bào gan nguyên phát của bệnh nhân nhiễm HBV", *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 451, số 1, tr. 121-125.

Phụ lục 1. Quy trình tách DNA từ máu toàn phần theo Kit Promega



Phụ lục 2. QUY TRÌNH KỸ THUẬT PCR

Quy trình phản ứng PCR

*** Thành phần của phản ứng:**

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

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

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

- 94°C trong 5 phút
 - 94°C trong 30 giây
 - 56°C trong 30 giây
 - 72°C trong 30 giây
 - 72°C trong 5 phút
- } 25 chu kỳ

Phụ lục 3

QUY TRÌNH ĐIỆN DI SẢN PHẨM PCR

* Cách làm gel agarose 1,5% (3%)

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

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

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

* Tiến hành kỹ thuật điện di

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

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

Phụ lục 4

QUY TRÌNH KỸ THUẬT PCR-RELP

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

Thành phần phản ứng cắt enzym:

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

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

Phụ lục 5
QUY TRÌNH TINH SẠCH SẢN PHẨM PCR
TRÊN GEL AGAROSE

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

1. Chuẩn bị dung dịch rửa màng (membrane wash solution). Thêm ethanol 95% vào lọ dung dịch rửa màng. Lượng ethanol cho thêm vào phụ thuộc vào thể tích của lọ dung dịch rửa màng (được quy định sẵn trong mỗi kit).
2. Cắt phần gel agarose có chứa sản phẩm PCR mong muốn (hiển thị dưới đèn chiếu UV). Ước lượng trọng lượng miếng gel.
3. Cho miếng gel vào ống có dung tích 1,5 ml, thêm vào 10 µl dung dịch bám màng (membrane binding solution) cho mỗi 10 mg trọng lượng miếng gel.
4. Nhẹ nhàng trộn đều hỗn hợp trong ống và ủ ống ở 50-60⁰C trong 10 phút hoặc cho đến khi quan sát thấy miếng gel tan hoàn toàn. Ly tâm ống để toàn bộ DNA tập trung xuống đáy ống.
5. Đặt cột lọc (SV Minicolumn) vào một ống thu thập. Chuyển toàn bộ hỗn hợp gel đã hòa tan vào cột lọc và ủ 1 phút ở nhiệt độ phòng.
6. Ly tâm phức hợp cột lọc-ống thu thập ở tốc độ 14 000 vòng/phút.
7. Gỡ cột lọc ra, đổ bỏ phần dung dịch trong ống thu thập. Sau đó đặt cột lọc lại trong ống thu thập.
8. Thêm vào cột lọc 700 µl dung dịch giữa màng và ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 1 phút. Lặp lại bước 7.
9. Thêm vào cột lọc 500 µl dung dịch rửa màng và ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút.

10. Chuyển cột lọc sang một ống 1,5 ml mới. Thêm vào cột 50 μ l Nuclease-Free Water. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút, sau đó ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút, trong 1 phút.
11. Bỏ cột lọc, dung dịch trong ống chứa DNA đích đã được tinh sạch. Tiếp tục thực hiện các kỹ thuật hoặc cất giữ ống ở -20° .

Phụ lục 6

QUY TRÌNH GIẢI TRÌNH TỰ GEN TRỰC TIẾP

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

Quy trình thực hiện:

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

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

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

2. Chu trình nhiệt: 5 phút đầu tiên ở 98⁰C, tiếp theo sau 15 giây ở 98⁰C, sau đó 10 giây ở 60⁰C, 2 phút ở 60⁰C trong 30 chu kỳ.
3. Sau khi phản ứng kết thúc, tiến hành tinh sạch sản phẩm bằng Wizard PCR Clean-up System (promega).
4. Tiến hành phân tích trình tự gen bằng hệ thống ABI Prism 310 (Applied Biosystems): Cho vào mỗi giếng 5 μ l DNA và 15 μ l formandehide. Đặt các giếng vào máy giải trình tự và chạy chương trình.

Phụ lục 7
PHIẾU THÔNG TIN BỆNH NHÂN

Mã số.....

1. Hành chính

Họ và tên bệnh nhân:..... Tuổi.....

Giới tính: 1- Nam 2- Nữ

Nghề nghiệp:

Dân tộc:

Địa chỉ:.....

Điện thoại liên hệ:

Lý do vào viện:

2. Các yếu tố nguy cơ

a. Viêm gan B 1 Có 2 Không

b. Viêm gan C 1 Có 2 Không

c. Lạm dụng bia rượu 1 Có 2 Không

Nếu đánh dấu có ở mục (c) hỏi tiếp

- Anh (chị) có thường xuyên uống bia rượu? 1 Có 2 Không

- Anh (chị) uống rượu bao lâu rồi? năm

- Một năm trở lại đây anh (chị) có uống không? 1 Có 2 Không

- Loại rượu anh (chị) sử dụng?

+ Vodka hoặc rượu chưng cất + Rượu vang

+ Bia + Loại rượu khác

- Anh chị uống khoảng bao nhiêu ml trong một ngày? (quy đổi theo cốc, chai)

Bảng hàm lượng rượu nguyên chất của một số loại rượu

Loại rượu	Lượng rượu (ml)	Rượu nguyên chất		Cốc tiêu chuẩn
		Độ cồn	Hàm	
Vodka	50	40%/1 V	20g	2
Rượu vang	100	12.5%/ 1 V	12.5g	1.3
Bia	330	4-5%/ 1V	15g	1.3

3. Lâm sàng cận lâm sàng

- Xơ gan 1 Có 2 Không

- Nồng độ AFP ng/ml

Ngày.....tháng.....năm.....

NGƯỜI LẬP PHIẾU

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition - American Cancer Society, 2012.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, et al: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90, 2011.
3. McGlynn KA, London WT: The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future. *Cin Liver Dis* 15:223-43, vii-x, 2011.
4. Hà Văn Mạo, Hoàng Kỳ, Phạm Hoàng Phiệt (2006), *Ung thư gan nguyên phát*. Nhà xuất bản y học. 15-42.
5. Nguyễn Thị Kim Hoa, Võ Đặng Anh Thư. (2010). Tìm hiểu một số yếu tố liên quan ở bệnh nhân ung thư gan nguyên phát tại bệnh viện trường đại học Y dược Huế. *Y học thực hành*, 696, 13-16.
6. Rapisarda V, Loreto C, Malaguarnera M, Ardiri A, Proiti M, Rigano G, Frazzetto E, Ruggeri MI, Malaguarnera G, Bertino N, et al (2016). Hepatocellular carcinoma and the risk of occupational exposure. *World J Hepatol.* 8; 8(13):573-90.
7. Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, et al (2011). High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet*; 43:464-469.
8. Tao Y, Ruan J, Yeh SH, Lu X, Wang Y, Zhai W, et al.(2011) Rapid growth of a hepatocellular carcinoma and the driving mutations revealed by cell-population genetic analysis of whole-genome data. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108: 12042-12047.
9. Lee J. S (2015) The mutational landscape of hepatocellular carcinoma. *Clinical and Molecular Hepatology*; 21: 220-229.

10. Vousden KH. & Lane DP (2007). p53 in health and disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*, 8, 275–283.
11. Whibley C., Phaoah PD., Hollstein M (2009). p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev cancer*, 9 (2):95-107.
12. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307–310.
13. Bode AM. & Dong Z (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Rev cancer* 4, 793-805.
14. Iwkuma T, Lozano G (2003), “MDM2, an introduce”, *Mol Cancer res*, 1 (14), pp. 993-1000.
15. Moll UM, Petrenko O (2003), "the MDM2-p53 interaction", *Mol cancer res*, 1 (14), pp. 1001-8.
16. Zhu ZZ, et al (2005). Homozygosity for Pro of p53 Arg72Pro as a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in Chineses population. *World J. Gastroenterol*; 11: 289-292.
17. Park SH, et al (2006). MDM2 309T>G polymorphism and risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer*, 2006; 54: 19-24.
18. Bougeard G, et al (2006). Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J. Med. Genet.* 2006; 43: 531-533.
19. Dharel N, et al. (2006). MDM2 promoter SNP309 is associated with the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Clin. Cancer Res*; 12: 4867-4871.
20. Ezzikouri S, Essaid El Feydi A, Afifi R, et al (2012). Impact of TP53 codon 72 and MDM2 promoter 309 allelic dosage in a Moroccan population with hepatocellular carcinoma, *Int J Biol Markers*; 2(27): 105 – 110.

21. Okuda H. (2007). Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 21, 161-173.
22. Nordenstedt H, White D.L, El Serag H.B. (2010). The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*, 42, 206-214.
23. Đào Văn Long. (2012), Bệnh học nội khoa Tập II, *Nhà Xuất Bản Y Học, Hà Nội*. 122 – 137.
24. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM (2004) Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 127(5 Suppl 1): 87-96.
25. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington, D.C: American Institute for Cancer Research; (2007). World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research.
26. Pagliaro L, Simonetti RG, Craxi AL et al (2008). Alcohol and HBV infection as risk factors for HCC in Italy, A multicenter controlled study. *Hepatogastroenterology*. 30, 48-50.
27. Kikuchi M, Horie Y, Ebinuma H, Taniki N, Nakamoto N, Kanai T. (2015). Alcoholic Liver Cirrhosis and Significant Risk Factors for the Development of Alcohol-related. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*, 50(5): 222-34.
28. Helmut K. Seitz, M.D., and Peter Becker (2007), *Alcohol Metabolism and Cancer Risk, Alcohol Research & Health*, 30 (1), 38-47.
29. Helmut K. Seitz, Felix Stickel (2010). Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism, *Carcinogenesis* 5(2), 121-128.
30. Cougot D, Neuveut C, Buendia M.A. (2005). HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol*, 34, 75-78.

31. Hann HW, Wan S, Lai Y, Hann RS, Myers RE, Patel F. et al (2015). Aspartate aminotransferase to platelet ratio index as a prospective predictor of hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*; 30(1) :131–138.
32. Sakuma K, Saitoh N, Kasai M, Jitsukawa H, Yoshino I, Yamaguchi M, Nobutomo K, Yamumi M, Tsuda F, Komazawa T, et al (2008). Relative risks of death due to liver disease among Japanese male adults having various statuses for hepatitis B s and e antigen/antibody in serum: a prospective study. *Hepatology*; 8(6): 1642-1646.
33. McMahon BJ, Bulkow L, Harpster A, Snowball M, Lanier A, Sacco F, Dunaway E, Williams J (2000). Screening for hepatocellular carcinoma in Alaska natives infected with chronic hepatitis B: a 16 year population-based study. *Hepatology* 32: 842–847.
34. Shi J, Zhu L, Liu S, Xie WF. (2005). A meta-analysis of case-control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China. *Br J Cancer* 2005; 92(3): 607–12.
35. Donato F, Boffetta P, Puoti M. (2008). A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*; 75(3): 347–54.
36. Christopher Bùi Xuân Dương (2006). Bệnh viêm gan B. *Sống với bệnh viêm gan*, California. 67-102.
37. Fasani P, Sangiovanni A, De Fazio C, et al. (2011). High prevalence of multin-odular hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis attributable to multiple risk factors. *Hepatology*. 29(6):1704–1707.

38. Stroffolini T, Andreone P, Andriulli A, et al. (2009). Gross pathologic types of hepatocellular carcinoma in Italy. *Oncology*; 56(3):189–192.
39. Yoshizawa H. (2002). Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology*. 62(Suppl 1): 8–17.
40. Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. (2002). Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*. 155(4): 323–31.
41. Wojnowski L, Turner P.C, Pedersen B. (2004). Increased levels of aflatoxin-albumin adducts are associated with CYP3A5 polymorphisms in the Gambia, West Africa. *Pharmacogenetics*, 14, 691–700.
42. Kubicka S, Trautwein C, Niehof M, et al. (1997). Target gene modulation in hepatocellular carcinomas by decreased DNA-binding of p53 mutations. *Hepatology*, 25, 867–873.
43. Aguilar F, Hussain S.P, Cerutti P. (1993). Aflatoxin B1 induces the transversion of G=>T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 8586–8590.
44. Hsu I.C, Metcalf R.A, Sun T, et al. (1991). Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature Reviews*, 350, 427–428.
45. Qian GS, Ross RK, Yu MC, et al. (1994). A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 3: 3–10.
46. Adams LA, Lymp JF, St SJ, et al. (2005). The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*, 129: 113–121.
47. Moller H, Mellempgaard A, Lindvig K, et al.(1994). Obesity and cancer risk: a Danish record linkage study. *Eur J Cancer*, 30A(3):344–50.

48. Sanyal A, Poklepovic A, Moyneur E, Barghout V. (2010). Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. *Curr Med Res Opin*; 26: 2183–2191.
49. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*; 348(17): 1625–38.
50. Moller H, Mellempgaard A, Lindvig K, et al. (1994). Obesity and cancer risk: a Danish record linkage study. *Eur J Cancer*, 30A(3): 344–50.
51. Wolk A, Gridley G, Svensson M, et al. (2001). A prospective study of obesity and cancer risk. *Cancer Causes Control*. 12(1):13–21.
52. Lawson DH, Gray JM, McKillop C, Clarke J, Lee FD, Patrick RS (2006). Diabetes mellitus and primary hepatocellular carcinoma. *Q J Med*; 61: 945–955.
53. El-Serag HB, Hampel H, Javadi F (2006). The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 4: 369–380.
54. El Serag H.B, Tran T, Everhart J.E. (2004). Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*; 126: 460 – 468.
55. El-Serag, Rudolph (2007). Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*.132: 2557– 2576.
56. Pagliaro L, Pasta L, D’Amico G, Madonia S, Pietrosi G. (2002). Familial clustering of (mostly) HCV-related cirrhosis. A case control study. *J Hepatol*; 37: 762–766.
57. Abdelmalek MF, Liu C, Shuster J, Nelson DR, Asal NR. (2006). Familial aggregation of insulin resistance in first degree relatives of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroen-terol Hepatol*; 4:1162–1169.

58. Yu MW, Chang HC, Liaw YF, et al (2000). Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst*; 92: 1159–1164.
59. Yu MW, Chang HC, Chen PJ, et al (2002). Increased risk for hepatitis B related liver cirrhosis in relatives of patients with hepatocellular carcinoma in northern Taiwan. *Int J Epidemiol*; 31: 1008–1015.
60. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies (2005). *Lancet*; 366: 1121–1131.
61. Davey SG, Ebrahim S, Lewis S, Hansell AL, Palmer LJ, Burton PR (2005). Genetic epidemiology and public health: hope, hype, and future prospects. *Lancet*; 366: 1484–1498.
62. Hattersley AT, McCarthy MI (2005). What makes a good genetic association study? *Lancet*; 366: 1315–1323.
63. White DL, Li D, Nurgelieva Z, El-Serag HB (2007). The glutathione S-transferase variants as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a huge systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*; 132: A179–180.
64. Barbason H, Rassenfosse C, Betz EH (2003). Promotion mechanism of phenobarbital and partial hepatectomy in DENA hepatocarcinoma cell kinetics effect. *Br J Cancer*; 47: 517–525.
65. Kawai H, Suda T, Aoyagi Y, et al (2000). Quantitative evaluation of genomic instability as a possible predictor for development of hepatocellular carcinoma: comparison of loss of heterozygosity and replication error. *Hepatology*; 31: 1246–1250.
66. Delhaye M, Louis H, Degraef C, et al (1996). Relationship between hepatocyte proliferative activity and liver functional reserve in human cirrhosis. *Hepatology*; 23: 1003–1011.

67. Wege H, Chui MS, Le HT, Strom SC, Zern MA (2003). In vitro expansion of human hepatocytes is restricted by telomere dependent replicative aging. *Cell Transplant*; 12: 897–906.
68. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992). Telomere end replication problem and cell aging. *J Mol Biol*; 225:951–960.
69. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, et al (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J*; 16: 935–942.
70. Wright WE, Shay JW (1992). The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol*; 27: 383–389.
71. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*; 426: 194 –198.
72. Artandi SE, Chang S, Lee SL, et al (2000). Telomere dysfunction promotes nonreciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*; 406: 641– 645.
73. Farazi PA, Glickman J, Jiang S, Yu A, Rudolph KL, DePinho RA (2003). Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*; 63: 5021–5027.
74. Satyanarayana A, Manns MP, Rudolph KL. (2004). Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. *Hepatology*; 40: 276 –283.
75. Plentz RR, Caselitz M, Bleck JS, et al (2004). Hepatocellular telomere shortening correlates with chromosomal instability and the development of human hepatoma. *Hepatology*, 40: 80 - 86.

76. Plentz RR, Park YN, Lechel A, et al (2007). Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*; 45: 968–976.
77. Plentz RR, Schlegelberger B, Flemming P, et al (2005). Telomere shortening correlates with increasing aneuploidy of chromosome 8 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*; 42: 522–526.
78. Van Gijssel HE, Maassen CB, Mulder GJ, Meerman JH (1997). p53 protein expression by hepatocarcinogens in the rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal hepatocytes as a mechanism of hepatic tumour promotion. *Carcinogenesis*; 18: 1027–1033.
79. Bilousova G, Marusyk A, Porter CC, Cardiff RD, DeGregori J. (2005). Impaired DNA replication within progenitor cell pools promotes leukemogenesis. *PLoS Biol*; 3: e401.
80. Wagayama H, Shiraki K, Yamanaka T, et al (2001). p21WAF1/CTP1 expression and hepatitis virus type. *Dig Dis Sci*; 46: 2074 – 2079.
81. Choudhury AR, Ju Z, Djojosebroto MW, et al (2007). Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet*, 39: 99 –105.
82. Iakova P, Awad SS, Timchenko NA (2003). Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell*; 113: 495–506.
83. Poynard T, Mathurin P, Lai CL, et al (2003). A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol*; 38: 257–265.
84. Stanger BZ, Tanaka AJ, Melton DA (2007). Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature*; 445: 886 – 891.

85. Bataller R, Brenner DA (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest*; 115: 209–218.
86. Giannelli G, Bergamini C, Fransvea E, Sgarra C, Antonaci S (2005). Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*; 129: 1375–1383.
87. Ogata H, Kobayashi T, Chinen T, et al (2006). Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*; 131: 179–193.
88. Budhu A, Forgues M, Ye QH, et al (2006). Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell*; 10: 99–111.
89. Di MR, Fumagalli M, Cicalese A, et al (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*; 444: 638–642.
90. Bressan B, Kew M, Wands J, Ozturk M. (1991). Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*; 350: 429–431.
91. Jablkowski M, Bocian A, Bialkowska J, Bartkowiak J (2005). A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*; 24: 117–125.
92. Lechel A, Satyanarayana A, Ju Z, et al (2005). The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. *EMBO Rep*; 6: 275–281.
93. Azechi H, Nishida N, Fukuda Y, et al (2001). Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology*; 60: 346–354.

94. Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, et al (2006). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med*; 6: 96–99.
95. Yamada T, De Souza AT, Finkelstein S, Jirtle RL (1997). Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94: 10351–10355.
96. Dennis PA, Rifkin DB (1991). Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88: 580–584.
97. Acquati F, Malgaretti N, Hauptschein R, Rao P, Gaidano G, Taramelli R (1994). A 2-Mb YAC contig linking the plasminogen apoprotein(a) gene family to the insulin like growth factor 2 receptor (IGF2R) gene on the telomeric region of chromosome 6 (6q26-q27). *Genomics*; 22: 664–666.
98. Higashitsuji H, Higashitsuji H, Nagao T, et al (2002). A novel protein overexpressed in hepatoma accelerates export of NF-kappa B from the nucleus and inhibits p53 dependent apoptosis. *Cancer Cell*; 2: 335–346.
99. Lechel A, Holstege H, Begus Y, Schienke A, Kamino K, Lehmann U, Kubicka S, Schirmacher P, Jonkers J, Rudolph KL (2007). Telomerase deletion limits progression of p53 mutant hepatocellular carcinoma with short telomeres in chronic liver disease. *Gastroenterology*; 132: 1465–1475.
100. Martin J, Magnino F, Schmidt K, et al (2006). Hint2, a mitochondrial apoptotic sensitizer down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*; 130: 2179–2188.

101. Yang YA, Zhang GM, Feigenbaum L, Zhang YE (2006). Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis through downregulation of Bcl-2. *Cancer Cell*; 9: 445– 457.
102. Chen RH, Su YH, Chuang RL, Chang TY (1998). Suppression of transforming growth factor beta induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt dependent pathway. *Oncogene*; 17: 1959 –1968.
103. Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, Michalopoulos GK, Monga SP (2004). Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology*; 126: 1134 –1146.
104. de La CA, Romagnolo B, Billuart P, et al (1998). Somatic mutations of the betacatenin gene are frequent in mouse and human hepa-tocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95: 8847–8851.
105. Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, et al (2004). Liver-targeted disruption of Apc in mice activates betacatenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 17216 -17221.
106. Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A, et al (2006). Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*; 27: 748 –757.
107. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS (2006). Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest*; 116: 1582–1595.
108. Yin S, Li J, Hu C, et al (2007). CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*; 120: 1444 – 1450.

109. Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al (2006). Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell like properties. *Hepatology*; 44: 240 –251.
110. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, et al (2006). A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med*; 12: 410 – 416.
111. Hu TH, Huang CC, Lin PR, et al (2003). Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer*; 97: 1929 –1940.
112. He XC, Yin T, Grindley JC, et al (2007). PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet*; 39: 189 –198.
113. Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, et al (2004). MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature*; 431: 1112–1117.
114. Wang Y, Wu MC, Sham JS, Zhang W, Wu WQ, Guan XY (2002). Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray. *Cancer*; 95: 2346 –2352.
115. Wilkens L, Flemming P, Gebel M, et al (2004). Induction of aneuploidy by increasing chromosomal instability during dedifferentiation of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 1309 –1314.
116. Llovet JM, Chen Y, Wurnbach E, et al (2006). A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology*; 131: 1758 –1767.
117. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*; 400: 464 – 468.

118. Djojosebroto MW, Chin AC, Go N, et al (2005). Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma. *Hepatology*; 42: 1127–1136.
119. Crawford L (1983). The 53,000-dalton cellular protein and its role in transformation. *Int Rev Exp Pathol*; 25 (5):1-50.
120. Strauss BS (2000). Role in tumorigenesis of silent mutations in the TP53 gene. *Mutat. Res.* 457, 93–104.
121. Zamzami N, Kroemer G (2005), “p53 in apoptosis control: an introduction” *Biochem Biophys Res Commun*, 331 (3), 685-701.
122. Iwama T, Lozano G (2003), “MDM2, an introduction”, *Mol Cancer res*, 1 (14), 993-1000.
123. Uhrinova S, Uhrin D, Powers H, et al. (2005). "Structure of free MDM2 N-terminal domain reveals conformational adjustments that accompany p53-binding". *J. Mol. Biol.* 350 (3): 587–98.
124. Moll UM, Petrenko O (2003), "the MDM2-p53 interaction", *Mol cancer res*, 1 (14), pp .1001-8.
125. Walsh, C.S. et al. (2007). Association between a function single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene and sporadic endometrial cancer risk. *Gynecol. Oncol*, 104, 660-664.
126. Hainaut P, Hollstein M. (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77:81–137.
127. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 28(6): 622-629.

128. Nguyễn Thị Kim Chính, Nguyễn Trọng Chính, Lê Hữu Song, và cộng sự. (2012). Nghiên cứu tỷ lệ đột biến gen TP53 tại vị trí 249ser và nồng độ protein P53 ở một số thể bệnh do nhiễm vi rút viêm gan B. *Tạp chí Y dược lâm sàng* 108, 6, 116-121.
129. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JFJ, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250: 1233–1238.
130. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998). The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res*; 26(15): 3453-9.
131. Costa S., et al (2008). Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer*, 8, 324-143.
132. Boldrini L., et al (2008). Effect of the p53 codon 72 and intron 3 polymorphisms on nonsmall cell lung cancer (NSCLC) prognosis. *Cancer Invest.* 26, 168–172.
133. Acun T, Terzioğlu-Kara E, Konu O, Ozturk M, Yakicier MC (2009) Mdm2 Snp309 G allele displays high frequency and inverse correlation with somatic P53 mutations in hepatocellular carcinoma. *Mutat Res.* 684(1-2):106-8.
134. Onat OE, Tez M, Ozcelik T, et al (2008). MDM2 T309G polymorphism is associated with bladder cancer. *Anticancer Res*; 26: 3473–75.
135. Lander ES (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature.* 470 (7333): 187-97.
136. Kelemen A., Vasilakos AV., Liang Y (2009). Computational intelligence in bioinformatics: SNP/haplotype data in genetic association study for common diseases. *IEEE Trans Inf Technol Biomed*, 13(5): 841-7.

137. Candeias MM., et al (2008). p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nature Cell Biol.* 10, 1098–1105.
138. Lazar V., et al (1993). Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene* 8, 1703–1705.
139. Felley-Bosco E., et al (1993). Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 752–759.
140. Bond GL, Hu W, Bond EE, et al (2004). A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*; 119: 591–602.
141. Hu W., et al (2007). A single nucleotide polymorphism in MDM2 gene disrupts the oscillation of p53 and MDM2 levels in cells. *Cancer Res.* 67, 2757-2765.b. *Hepatology*, 29: 697-702.
142. Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A, Benazzouz M, El KL, Afifi R, et al: (2007). The Pro variant of the p53 codon 72 polymorphism is associated with hepatocellular carcinoma in Moroccan population. *Hepatol Res.* 37: 748-754.
143. Sumbul AT, Akkiz H, Bayram S, Bekar A, Akgollu E, et al. (2012). p53 codon 72 polymorphism is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in the Turkish population: a case-control study. *Mol Biol Rep* 39: 1639–1647.
144. Chen X, Liu F, Li B, Wei YG, Yan LN, Wen TF (2011). p53 codon 72 polymorphism and liver cancer susceptibility: A meta-analysis of epidemiologic studies. *World J Gastroenterol*, 17: 1211-1218.

145. Lv J, Zhu B, Zhang L, Xie Q, Zhuo W (2015). MDM2 SNP309 variation confers the susceptibility to hepatocellular cancer: a meta-analysis based on 4271 subjects. *Int J Clin Exp Med*. 8(4): 5822-30.
146. Akkiz H, Sumbul AT, Bayram S, Bekar A, Akgollu E (2010). MDM2 promoter polymorphism is associated with increased susceptibility to hepatocellular carcinoma in Turkish population. *Cancer Epidemiol*, 34: 448-452.
147. Di Vuolo et al (2011). TP53 and MDM2 gene polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma among Italian patients. *Infectious Agents and Cancer*.,6:13,1753-1769.
148. Leu JD, Lin IF, Sun YF, Chen SM, Liu CC, Lee YJ (2009). Association between MDM2-SNP309 and hepatocellular carcinoma in Taiwanese population. *World J Gastroenterol* , 15: 5592-5597.
149. Peng Q, Lao X, Chen Z, Lai H, Deng Y, Wang J, Mo C, Sui J, Wu J, Zhai L, et al (2013). TP53 and MDM2 gene polymorphisms, gene-gene interaction, and hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *PLoS ONE*, 8(12): 819- 827.
150. Yang Y1, Xia T, Li N, Zhang J, Yang Y, Cong W, Deng Q, Lan, Zhou W (2013). Combined effects of p53 and MDM2 polymorphisms on susceptibility and surgical prognosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Protein Cell*. 4(1):71-81.
151. Yoon YJ, Chang HY, Ahn SH, Kim JK, Park YK, Kang DR, et al. (2008). MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Carcinogenesis*, 29: 1192-1196.

152. Leverì M, Gritti C, Rossi L, Zavaglia C, Civardi E, et al. (2004). Codon 72 polymorphism of P53 gene does not affect the risk of cirrhosis and hepatocarcinoma in HCV-infected patients. *Cancer Lett*, 208: 75–79.
153. Anzola M, Cuevas N, Lopez-Martinez M, Saiz A, Burgos JJ, de Pancorbo MM (2003). Frequent loss of p53 codon 72 Pro variant in hepatitis C virus-positive carriers with hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* .193: 199-205.
154. Zhu ZZ, Cong WM, Liu SF, Xian ZH, Wu WQ, et al. (2005). A p53 polymorphism modifies the risk of hepatocellular carcinoma among non-carriers but not carriers of chronic hepatitis B virus infection. *Cancer Lett*, 229: 77–83.
155. Wang X, Zhang X, Qiu B, Tang Y, Sun H, et al. (2012). MDM2 SNP309T>G polymorphism increases susceptibility to hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in a northeast Han Chinese population. *Liver Int*, 32: 1172–1178.
156. Ezzikouri S, El Feydi AE, Afifi R, El Kihal L, Benazzouz M, Hassar M, Marchio A, Pineau P, Benjelloun S (2009). MDM2 SNP309T>G polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma: a case-control analysis in a Moroccan population. *Cancer Detect Prev.*; 32(5-6): 380-5.
157. Lê Minh Huy (2012). *Giải phẫu bệnh và hóa mô miễn dịch các yếu tố tiên lượng của carcinoma tế bào gan*. Nhà xuất bản y học, 81-90.
158. Zhang, J. Y et al (1998). A case-control study of hepatitis B and C virusinfection as risk for hepatocellular carcinoma in Henan, China. *International Journal of Epidemiology*, 13, pp. 574-578.
159. Lauwers Y.G., et al (2002). Prognostic histologic indicators of curativelyresected hepatocellular carcinoma. *American Journal of surgical. Pathology*, 26(1), pp. 25-34.

160. Wang-Gohrke S, Becher H, Kreienberg R, Runnebaum IB, Chang-Claude J (2002). Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Br. J. Cancer.* 81, 179-183.
161. C Sagne, V Marcel, A Amadou, P Hainaut, M Olivier, and J Hall (2013). A meta-analysis of cancer risk associated with the TP53 intron 3 duplication polymorphism (rs17878362): geographic and tumor-specific effects. *Cell Death and Disease*, 4 (92), 438-441.
162. Nguyễn Thu Thúy, Trần Huy Thịnh, Nguyễn Tuyết Mai, Nguyễn Đức Hinh, Tạ Thành Văn (2013). Đa hình codon 72 gen p53 trên mẫu bệnh nhân ung thư phổi ở Việt Nam. *Tạp chí nghiên cứu y học Việt Nam*, 407 (2), 55-58.

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Trịnh Quốc Đạt, nghiên cứu sinh khóa 32 trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh Y học, xin cam đoan:

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

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

Hà Nội ngày tháng năm 2017

Tác giả

Trịnh Quốc Đạt

CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Từ gốc tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
AFP	Alpha fetoprotein	Protein nguồn gốc bào thai
Bp, Kbp	Base pair, kilo base pairs	Cặp bazơ, 1000 cặp bazơ
CI	Confidence Interval	Độ tin cậy
Codon	Codon	Bộ ba mã hoá
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Axít deoxyribonucleic
Dup 16	16 base pairs duplication	Thêm đoạn 16 cặp bazơ nitơ
D21D	Aspartate 21 Aspartate	Đa hình tại bộ ba mã hoá 21, mã hoá axit amin aspartate
G360A	Glycin 360 Alanin	Đa hình tại bộ ba mã hoá 360, mã hoá glycin hoặc alanin
HBV, HCV	Hepatitis B virus, Hepatitis C virus	Virus viêm gan B, virus viêm gan C
HCC	Hepatocellular carcinoma	Ung thư biểu mô tế bào gan
KDa	Kilodalton	Đơn vị đo trọng lượng phân tử
MDM2	Murine double minute 2	Gen số 2 từ các mảnh double minute trên chuột
OR	Odds Ratio	Tỷ suất chênh
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi khuếch đại gen
P34P	Prolin 34 Prolin	Đa hình tại bộ ba mã hoá 34, mã hoá prolin
P36P	Prolin 36 Prolin	Đa hình tại bộ ba mã hoá 36, mã hoá prolin
P47S	Prolin 47 Serin	Đa hình tại bộ ba mã hoá 47, mã hoá prolin hoặc serin
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Đa hình các đoạn cắt giới hạn bằng enzym
R72P	Arginin 72 Prolin	Đa hình tại bộ ba mã hoá 72, mã hoá arginin hoặc prolin

SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Đa hình nucleotide đơn
TP53	Tumor protein 53	Protein khối u có trọng lượng 53 kDa
UTTBNP		Ung thư tế bào gan nguyên phát
V217M	Valin 217 Methionin	Đa hình tại bộ ba mã hoá 217, mã hoá valin hoặc methionin

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1. Ung thư tế bào gan nguyên phát.....	3
1.1.1. Dịch tễ học	3
1.1.2. Các yếu tố nguy cơ.....	5
1.1.3. Bệnh học phân tử ung thư tế bào gan nguyên phát.....	12
1.2. Gen TP53 và MDM2	28
1.2.1. Gen áp chế ung thư TP53.....	28
1.2.2. Gen sinh ung thư MDM2	34
1.2.3. Biến đổi của gen TP53 và MDM2 trong ung thư	37
1.3. Đa hình kiểu gen TP53 và MDM2 liên quan ung thư tế bào gan nguyên phát	39
1.3.1. Hiện tượng đa hình nucleotid đơn.....	39
1.3.2. Tính đa hình của gen TP53	41
1.3.3. Tính đa hình thái của gen MDM2.....	44
1.3.4. Tính đa hình thái của gen TP53 và MDM2 trong ung thư tế bào gan nguyên phát.	45
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	51
2.1. Đối tượng nghiên cứu	51
2.1.1. Nhóm bệnh	51
2.1.2. Nhóm chứng.....	51
2.1.3. Các đa hình kiểu gen được phân tích.....	52
2.2. Phương pháp nghiên cứu	53
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	53
2.2.2. Cỡ mẫu	53
2.2.3. Dụng cụ, trang thiết bị.....	54
2.2.4. Hóa chất dùng trong nghiên cứu.	54
2.2.5. Cách thức tiến hành nghiên cứu.....	55
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	64
2.4. Đạo đức trong nghiên cứu của đề tài.....	64
2.5. Kinh phí thực hiện đề tài	64

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	65
3.1. Đặc điểm nhóm đối tượng nghiên cứu	65
3.2. Kết quả phân tích đa hình kiểu gen TP53	67
3.2.1. Thêm đoạn 16 base pairs tại intron 3	67
3.2.2. Đa hình kiểu gen tại SNP D21D.....	70
3.2.3. Đa hình kiểu gen của SNP P34P, P36P và P47S.....	71
3.2.4. Kết quả phân tích kiểu gen của SNP V217M	73
3.2.5. Kết quả phân tích kiểu gen của SNP G360A	75
3.2.6. Kết quả phân tích kiểu gen của SNP R72P.....	77
3.3. Kết quả phân tích đa hình kiểu gen MDM2	83
3.4. Tương quan giữa đa hình kiểu gen TP53, MDM2 và một số yếu tố nguy cơ UTTBGNP	90
3.4.1. Sự kết hợp các kiểu gen của TP53 với MDM2.....	90
3.4.2. Kiểu gen TP53-R72P và MDM2-309T>G với nhiễm HBV.....	91
3.4.3. Tương quan giữa các kiểu gen TP53 R72P và MDM2 309T>G với một số yếu tố nguy cơ UTTBGNP khác.....	93
Chương 4: BÀN LUẬN	100
4.1. Đặc điểm nhóm đối tượng nghiên cứu	100
4.2. Đa hình kiểu gen TP53	106
4.3. Đa hình kiểu gen MDM2.....	117
4.4. Tương quan giữa đa hình kiểu gen TP53, MDM2 và các yếu tố nguy cơ gây ung thư tế gan nguyên phát	120
4.4.1. Kết hợp kiểu gen của TP53 và MDM2	121
4.4.2. Đa hình kiểu gen TP53, MDM2 và HBV	124
4.4.3. Đa hình kiểu gen và một số yếu tố nguy cơ UTTBGNP khác..	127
KẾT LUẬN	131
KIẾN NGHỊ, ĐỀ XUẤT	133
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ TRONG KHUÔN KHỔ ĐỀ TÀI	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Một số SNP trên gen MDM2.....	45
Bảng 2.1	Trình tự mồi cho phản ứng PCR khuếch đại các SNP	57
Bảng 3.1.	Đặc điểm tuổi của nhóm đối tượng nghiên cứu.....	65
Bảng 3.2.	Đặc điểm giới tính nhóm đối tượng nghiên cứu.....	66
Bảng 3.3.	Một số yếu tố nguy cơ ghi nhận ở bệnh nhân UTTBGNP	67
Bảng 3.4.	Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của đa hình dup16 gen TP53	68
Bảng 3.5.	Đa hình kiểu gen dup16 liên quan đến UTTBGNP.....	69
Bảng 3.6.	Bảng tổng hợp kiểu gen của các SNP tại codon 21, 34, 36, 47, 72, 217, 360 gen TP53	77
Bảng 3.7.	Tỷ lệ các kiểu gen của SNP R72P ở nhóm đối tượng nghiên cứu.....	80
Bảng 3.8.	Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của SNP TP53-R72P giữa nhóm bệnh và chứng.....	80
Bảng 3.9.	Các kiểu gen của SNP TP53-R72P với khả năng mắc ung thư tế bào gan nguyên phát	82
Bảng 3.10.	Độ tuổi trung bình của bệnh nhân UTTBGNP mang các kiểu gen TP53-R72P	83
Bảng 3.11.	Tỷ lệ các kiểu gen MDM2 309T>G trong nhóm đối tượng nghiên cứu.....	86
Bảng 3.12.	Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của SNP MDM2-309T>G giữa nhóm bệnh và chứng.....	87
Bảng 3.13.	Đa hình kiểu gen MDM2-SNP309 và nguy cơ mắc UTTBGNP.....	88
Bảng 3.14.	Độ tuổi trung bình của bệnh nhân UTTBGNP mang kiểu các kiểu gen của SNP 309T>G	89
Bảng 3.15.	Kết hợp kiểu gen TP53 R72P + MDM2 309T>G và nguy cơ mắc UTTBGNP	90
Bảng 3.16.	So sánh nguy cơ mắc UTTBGNP của các kiểu gen và HBV.....	91

Bảng 3.17. Kiểu gen TP53, MDM2 và nhiễm HBV trong khả năng mắc UTTBGNP	92
Bảng 3.18. So sánh nguy cơ mắc UTTBGNP của các kiểu gen và độ tuổi >40	93
Bảng 3.19. Tỷ lệ phân bố kiểu gen SNP R72P gen TP53 và 309T>G gen MDM2 theo giới trong nhóm bệnh nhân UTTBGNP	94
Bảng 3.20. Tỷ lệ phân bố kiểu gen SNP R72P và MDM2 309T>G giữa bệnh nhân UTTBGNP có và không có xơ gan.....	95
Bảng 3.21. Kiểu gen TP53 R72P và MDM2 309T>G và nồng độ AFP	96
Bảng 3.22. So sánh các kiểu gen và nhiễm HCV.....	97
Bảng 3.23. So sánh nguy cơ mắc UTTBGNP của các kiểu gen và nghiện rượu	97
Bảng 3.24. Tỷ lệ phân bố kiểu gen SNP R72P và MDM2 309T>G giữa bệnh nhân UTTBGNP có và không có nghiện rượu	98
Bảng 3.25. So sánh nguy cơ mắc UTTBGNP của các kiểu gen TP53, MDM2 và các yếu tố nguy cơ.....	99

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Phân bố tỷ lệ UTTBGNP trên thế giới.	3
Hình 1.2.	Cơ chế phân tử của ung thư tế bào gan nguyên phát.....	16
Hình 1.3.	Một số điểm kiểm tra chu kỳ tế bào và điểm kiểm tra chết theo chương trình, thường bị mất trong ung thư tế bào gan nguyên phát.	21
Hình 1.4.	Oncogene thường gặp nhất trong ung thư tế bào gan nguyên phát.....	26
Hình 1.5.	Cấu trúc phân tử gen TP53	29
Hình 1.6.	Cấu trúc phân tử protein p53	30
Hình 1.7.	Cơ chế dừng chu kỳ tế bào của p53 qua trung gian p21.....	31
Hình 1.8.	Các con đường gây apoptosis của p53.....	33
Hình 1.9.	Cấu trúc phân tử MDM2.....	35
Hình 1.10.	Vai trò điều hoà p53 của MDM2.....	36
Hình 1.11.	Mô phỏng hiện tượng đa hình nucleotid đơn.....	40
Hình 1.12.	Các SNPs trên các vùng mã hóa và không mã hóa của TP53	43
Hình 2.1.	Mô hình phân tích hình ảnh điện di dup 16 của gen TP53.....	56
Hình 2.2.	Mô tả hình ảnh điện di sản phẩm cắt giới hạn của R72P	59
Hình 2.3.	Mô tả hình ảnh điện di sản phẩm cắt giới hạn MDM2 309 T>G	60
Hình 2.4.	Sơ đồ thiết kế nghiên cứu	63
Hình 3.1.	Biểu đồ tỷ lệ giới tính của nhóm nghiên cứu.....	66
Hình 3.2.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của đoạn gen intron 3 có chứa đa hình dup 16 của gen TP53.....	68
Hình 3.3.	Hình ảnh PCR khuếch đại exon 2 có chứa vùng SNP D21D của gen TP53.....	70
Hình 3.4.	Hình ảnh giải trình tự các kiểu gen của SNP D21D gen TP53	70
Hình 3.5.	Hình ảnh PCR khuếch đại exon 4 của gen TP53.....	71

Hình 3.6. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen của SNP P34P gen TP53	72
Hình 3.7. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen của SNP P36P gen TP53	72
Hình 3.8. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen của SNP P47S gen TP53	73
Hình 3.9. Hình ảnh PCR khuếch đại exon 6 chứa vùng SNP V217M của gen TP53.....	74
Hình 3.10. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen của SNP V217M gen TP53	74
Hình 3.11. Hình ảnh PCR khuếch đại exon 10 chứa vùng SNP G360A của gen TP53.....	75
Hình 3.12. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen của SNP G360A gen TP53	76
Hình 3.13. Hình ảnh PCR khuếch đại đoạn gen mang SNP R72P của gen TP53.	78
Hình 3.14. Sản phẩm cắt đoạn gen mang SNP R72P bằng enzym <i>Bst</i> UI.	78
Hình 3.15. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen SNP R72P.....	79
Hình 3.16. Biểu đồ phân bố tỷ lệ kiểu gen của SNP R72P ở nhóm bệnh nhân ung thư gan và nhóm chứng.....	81
Hình 3.17. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại đoạn gen chứa SNP 309T>G của gen MDM2.....	84
Hình 3.18. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt enzym của SNP 309T>G gen MDM2.....	84
Hình 3.19. Hình ảnh giải trình tự đại diện các kiểu gen SNP 309T>G của gen MDM2.....	85
Hình 3.20. Biểu đồ phân bố kiểu gen của MDM2 309T>G	87
Hình 4.1. Virus và gen TP53, MDM2 trong con đường tín hiệu p53.....	126