

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 NGUYÊN PHÁT**

CHUYÊN NGÀNH : HÓA SINH Y HỌC

MÃ SỐ : 62720112

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2017

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

Người hướng dẫn khoa học: **1. TS. Trần Huy Thịnh**
 2. GS.TS. Tạ Thành Văn

Phản biện 1: **PGS.TS. Bạch Vọng Hải**

Phản biện 2: **PGS.TS. Đinh Duy Kháng**

Phản biện 3: **PGS.TS. Tạ Văn Tờ**

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

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2017.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

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

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Ung thư tế bào gan nguyên phát (UTTBGNP) là bệnh lý ác tính hay gặp hàng đầu trên thế giới. 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. Thông báo của hiệp hội ung thư Hoa Kỳ, năm 2012 thế giới có khoảng 745.500 người chết vì ung thư gan. 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. Kiểm soát các yếu tố nguy cơ gây bệnh là một trong những biện pháp hiệu quả làm giảm tỷ lệ mắc. Các yếu tố nguy cơ gây UTTBGNP từ lâu đã được biết đến như viêm gan virus B, C, nghiện rượu, aflatoxin B1, gan nhiễm mỡ không do rượu... 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 số đó là các biến đổi trên gen TP53 và MDM2. Đây là hai gen chính trong con đường tín hiệu P53. Một cơ chế chống lại sự hình thành và phát triển khối u quan trọng nhất của con người. Trên thực tế, TP53 cũng là một trong những gen được nghiên cứu nhiều nhất, và có tần số đột biến lớn nhất trong ung thư gan. Việc xác định được các biến đổi trên gen TP53 và MDM2 có liên quan đến sự phát sinh phát triển khối u gan sẽ mở ra hy vọng về khả năng có một công cụ hữu hiệu để sàng lọc sớm và tư vấn cho cộng đồng, góp phần làm giảm tỷ lệ mắc UTTBGNP ở Việt Nam.

2. Mục tiêu của đề tài

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.

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

Hiện tượng thay thế các nucleotid đơn (SNP) của gen áp chế ung thư TP53 và MDM2 tạo ra các kiểu gen khác nhau trong cộng đồng. Các kiểu gen này, có thể ảnh hưởng đến khả năng ức chế khối u của TP53, đặc biệt tại các vùng chức năng quan trọng. Các nghiên cứu trên thế giới đã ghi nhận có sự liên quan giữa các kiểu gen TP53 và MDM2 và bệnh sinh của nhiều loại hình ung thư, trong đó có ung thư tế bào gan nguyên phát. Sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để xác định các kiểu gen tại các đa hình nucleotid đơn của TP53 và MDM2. Đánh giá tỷ lệ phân bố các kiểu gen của nhóm bệnh nhân ung thư gan với nhóm chứng, qua đó xác định khả năng mắc bệnh của các kiểu gen. Các kiểu gen nguy cơ sẽ có thể phát triển thành các phương tiện sàng lọc sớm và tư vấn cho cộng đồng, để phòng tránh, ngăn ngừa sự hình thành và phát triển 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.

4. Cấu trúc luận án

- Luận án được trình bày trong 133 trang (không kể tài liệu tham khảo và phần phụ lục). Luận án được chia làm 7 phần:

- + Đặt vấn đề: 2 trang
- + Chương 1: Tổng quan tài liệu 48 trang
- + Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 14 trang
- + Chương 3: Kết quả nghiên cứu 35 trang
- + Chương 4: Bàn luận 31 trang
- + Kết luận: 2 trang
- + Kiến nghị: 1 trang

Luận án gồm 27 bảng, 03 biểu đồ và 34 hình. Sử dụng 162 tài liệu tham khảo gồm tiếng Việt, tiếng Anh và một số trang Web. Phần phụ lục gồm bệnh án nghiên cứu, danh sách 280 bệnh nhân ung thư tế bào gan nguyên phát và 267 người đối chứng, các quy trình kỹ thuật.

Chương 1

TỔNG QUAN

1. Ung thư tế bào gan nguyên phát

1.1. Dịch tễ và các yếu tố nguy cơ

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 biểu mô gan. 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%. 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 UTTBGNP 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 trong toàn quốc.

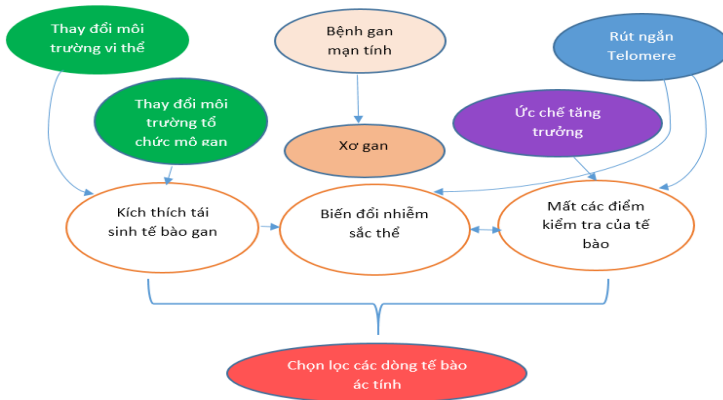
Các yếu tố nguy cơ gây UTTBGNP từ lâu đã được biết đến như viêm gan virus B, C, nghiện rượu, aflatoxin B1, tình trạng xơ gan, gan nhiễm mỡ không do rượu. Trong đó viêm gan virus B và C là yếu tố thường gặp nhất. Chiếm khoảng 70% các trường hợp. Viêm gan B gặp nhiều hơn ở các nước châu Á, Phi còn viêm gan C lại gặp nhiều hơn ở các nước phương tây và Nhật Bản. Cơ chế gây bệnh của HBV và HCV được đồng thuận là quá trình viêm mạn tính làm xơ hoá các tiểu thùy gan tạo điều kiện để xuất hiện các tế bào ác tính. Ngoài ra với bản chất là DNA hoặc RNA, virus hoàn toàn có thể gây tổn hại cho bộ gen của tế bào gan, tạo ra các tế bào bất thường kém hoặc không biệt hoá. Rượu từ lâu cũng đã được xác nhận là một yếu tố nguy cơ trực tiếp gây UTTBGNP. 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.

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. Tình trạng xơ

gan không phải là một yếu tố nguy cơ gây bệnh nhưng lại là một yếu tố thuận lợi, khi có xơ gan thì khả năng mắc ung thư sẽ rất cao. Trong những năm gần đây một số nghiên cứu trên thế giới đã đề cập đến vai trò của viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH) béo phì và đái tháo đường type 2. Cơ chế bệnh sinh chưa rõ ràng, nhưng có một tỷ lệ cao hơn các trường hợp UTTBGNP trong các nhóm bệnh nhân trên.

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

Có ba cơ chế chính gây UTTBGNP được tổng kết lại cho đến thời điểm hiện tại, đã được sự đồng thuận rộng rãi của các nhà khoa học.



Hình mô tả 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.

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. Hậu quả của những cơ chế tác động này sẽ gây ra các biến đổi phân tử trong tế bào gan. Cụ thể là: mất các điểm kiểm tra chu kỳ tế bào, kháng apoptosis, kích hoạt gen sinh ung thư và tế bào ung thư bất tử. Trong đó gen TP53 và MDM2 là một điểm kiểm tra chu kỳ tế bào quan trọng nhất trong cơ chế này.

2. Gen TP53 và MDM2

2.1 Gen áp chế ung thư TP53

Gen TP53, được phát hiện đầu tiên vào năm 1979 bởi Crawford và cộng sự. Gen mã hoá cho phân tử protein có trọng lượng 53kDa. Là nhạc trưởng trong con đường tín hiệu P53. Mang đầy đủ các đặc tính sinh học của con đường tín hiệu P53. Ở người, gen TP53 nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể số 17 (17p13.1). 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.

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, TP53 được xem như trạm gác của bộ gen tế bào (guardian genome). Ngoài ra, TP53 còn có khả năng hoạt hóa hoặc ức chế một loạt gen khác trong con đường tín hiệu P53 để đảm bảo sự ổn định của tế bào. Ngoài ra, TP53 còn có khả năng sửa chữa gen bị thương tổn. Trong điều kiện bình thường TP53 kích thích sự sao chép các gen ức chế quá trình tăng sinh mạch máu. Vì thế những tế bào có đột biến gen TP53 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 gen TP53 ức chế ung thư.

2.2 Gen MDM2

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. Gen MDM2 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. Phân tử protein MDM2 được tổng hợp có 491 acid amin, khối lượng phân tử 56 kDa, gồm 5 vùng cấu trúc chức năng.

Vai trò quan trọng nhất của MDM2 là điều hòa hoạt động của TP53 trong con đường tín hiệu p53. Trong điều kiện bình thường thì MDM2

ức chế sự biểu hiện của TP53 thông qua hệ thống ubiquitination. Được xem như là một E3 ubiquitin ligase, MDM2 có vai trò trong tương tác giữa các ubiquitin và protein TP53. Các mảnh ubiquitin gắn vào phân tử protein TP53, đưa chúng đến các proteasome và bắt đầu quá trình giáng hoá. Nồng độ TP53 luôn được duy trì ở mức rất thấp do MDM2 liên tục khởi động quá trình giáng hoá protein TP53. Ngược lại khi TP53 hoạt hoá lại gắn vào vùng khởi động phiên mã của MDM2 và khởi động quá trình phiên mã MDM2. Sự điều hoà ngược âm tính của hai gen giúp đảm bảo sự ổn định bộ gen của tế bào trong đó có tế bào gan.

3. Đa hình kiểu gen TP53 và MDM2 và ung thư tế bào gan nguyên phát

Hiện tượng đa hình nucleotid đơn (SNP) là sự khác nhau về trình tự DNA ở trong bộ gen giữa các cá thể của một loài hay giữa các cặp nhiễm sắc thể của một người. Đây là một hiện tượng phổ biến, được coi là hậu quả của những đột biến điểm thay thế một cặp nucleotid. 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 và cũng hàng chục SNP trên gen MDM2. Các đa hình nucleotid đơn này tạo ra các kiểu gen TP53 và MDM2 khác nhau trong cộng đồng. Các kiểu gen của một số SNP này đã được chứng minh là có liên quan đến sự phát sinh phát triển của nhiều loại ung thư trong đó có ung thư gan. Chúng được coi là những yếu tố nguy cơ cần được quan tâm.

Các SNP được phân tích trong nghiên cứu này có thể làm thay đổi trình tự mã hoá hoặc không nhưng chúng đều nằm ở các vùng chức năng quan trọng của TP53. Những vùng trên lý thuyết có thể ảnh hưởng đến khả năng kiểm soát sự hình thành khối u. Đầu tiên phải kể đến là hiện tượng đa hình thái do sự thêm 16 base pair tại vùng không mã hóa thứ 3 (intron-3) của TP53. Tiếp sau đó là các SNP trên vùng hoạt hoá N-tận của TP53 chứa vị trí tương tác của với MDM2 và làm giảm khả năng dịch mã của TP53. Đầu tiên là tại các bộ ba mã hóa D21D, P34P và P36P, mặc dù không làm thay đổi trình tự acid amin nhưng cũng làm giảm sự biểu hiện của protein TP53. Sau cùng là các SNP làm thay đổi trình tự acid amin tại các vùng chức năng quan trọng của TP53. Đây là những SNP: P47S, R72P, V217M và G360A gen TP53. Đối với gen MDM2, đa hình nucleotid quan trọng nhất, được chứng minh là có liên quan đến ung thư tế bào gan nguyên phát, nằm ở vị trí nucleotid thứ 309 vùng intron 1, đầu N-tận. Đó là SNP 309T>G. 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 làm tăng tổng hợp protein MDM2, dẫn đến là ức chế hoạt động chức

năng của TP53, làm mất ổn định di truyền cho tế bào, tạo ra nguy cơ hình thành khối u.

Nhiều nghiên cứu dịch tễ gen trên thế giới đã được tiến hành nhằm tìm kiếm sự liên quan giữa các đa hình nucleotid đơn của gen TP53 và MDM2 và ung thư tế bào gan nguyên phát. Kết quả có sự không thống nhất về kết quả giữa các nghiên cứu tại các vùng lãnh thổ và dân tộc khác nhau. Nhưng có một điểm chung là các nghiên cứu đều phát hiện đa hình R72P gen và 309T>G gen MDM2 là hai SNP liên quan nhiều nhất với ung thư gan. Các nghiên cứu tại châu Á, như ở Hà Quốc, Nhật Bản, Đài Loan, Trung Quốc cho các kết quả tương thích hơn so với các nghiên cứu tại các vùng khác trên thế giới. Những khác biệt giữa các nghiên cứu còn là vấn đề cỡ mẫu, đây vẫn là một hạn chế của nhiều nghiên cứu dịch tễ gen. 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.

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 SNP 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. Những người mang đồng thời kiểu gen P72P của TP53 và 309G/G của MDM2 có khả năng mắc ung thư gan cao hơn nhiều lần so với các kiểu gen nguyên thủy.

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 SNP 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, hay cùng phơi nhiễm với một yếu tố nguy cơ nhưng người mắc trước người mắc sau. 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.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

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

2.1.1. 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.

2.1.2. 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.

2.1.3. 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.

2.1.4. Các đa hình kiểu gen được phân tích

- Gen TP53
- + 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.

- Gen MDM2

Một đa hình tại vị trí nucleotid 309, intron 1 vùng promoter của gen.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

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

2.3. Thời gian 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

Đề tài đã được thông qua bởi hội đồng đạo đức trường Đại học Y Hà Nội.

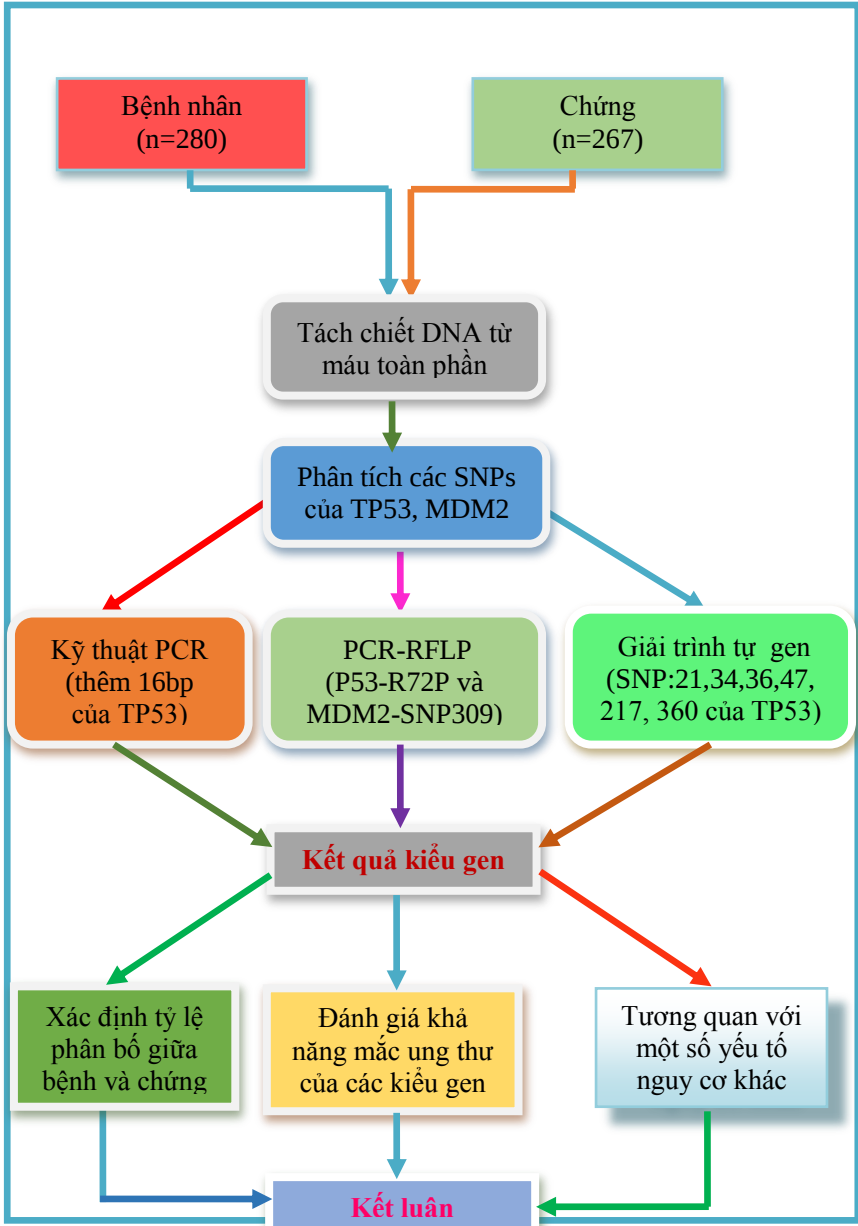
2.5. Kinh phí thực hiện đề tài

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

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

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Phỏng vấn và hồi cứu bệnh án điều trị để xác định các yếu tố nguy cơ phơi nhiễm. Kỹ thuật tách chiết DNA từ các mẫu máu ngoại vi. Phản ứng PCR xác định kiểu gen của đa hình Dup16 gen TP53. Kỹ thuật enzym cắt giới hạn (RFLP) để xác định kiểu gen tại đa hình R72P gen TP53 và 309T>G gen MDM2. Kỹ thuật giải trình tự trực tiếp để xác định kiểu gen tại các đa hình D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A của gen TP53. Quy trình nghiên cứu theo sơ đồ.

Sơ đồ quy trình nghiên cứu



Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm nhóm đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.1 Đặc điểm nhóm đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm		Bệnh		Chứng		P
		n	%	n	%	
Giới	Nam	239	85,4	214	80,1	0,06
	Nữ	41	14,6	53	19,9	
Tuổi (năm)		57 ± 11,6		56 ± 15,5		0,2
Lạm dụng bia rượu		23	8,2	9	3,3	
Nhiễm HBV		171	61,1	36	13,5	
Xơ gan		12	4,3	4	1,5	
Có xơ gan		194	69,3	0	0	
AFP > 400ng/ml		143	51,1	0	0	

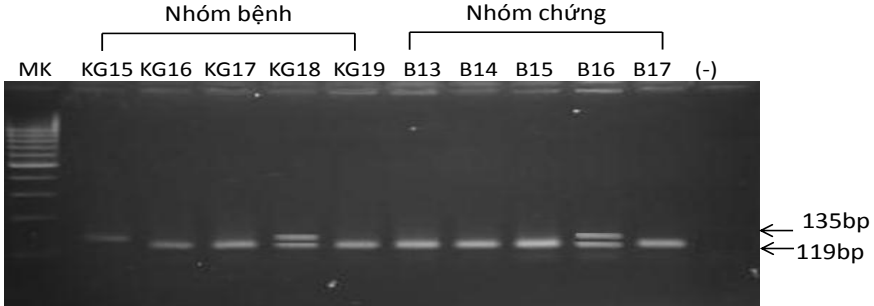
Nhận xét:

Nhóm nghiên cứu 547 đối tượng có 280 bệnh nhân UTTBGNP và 267 người đối chứng. Độ tuổi độ tuổi trung bình và tỷ lệ giới tính của nhóm bệnh và nhóm chứng không có sự khác biệt. Kết quả cũng cho thấy, trong nhóm UTTBGNP, số bệnh nhân nam giới cao hơn nhiều so với nữ giới. Trong các yếu tố nguy cơ, 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.

3.2 Kết quả phân tích 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 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%.



Hình 3.1. Hình ảnh điện di minh họa 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 KG15 có một vạch kích thước 135bp tương ứng với kiểu gen đồng hợp có thêm đoạn (A2A2). Mẫu 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 không có thêm đoạn (A1A1) do chỉ có một vạch kích thước 119bp.

Bảng 3.2 Kết quả phân tích kiểu gen của dup16 gen TP53

Kiểu gen	Nhóm bệnh (280)		Nhóm chứng (267)		OR	OR* CI (95%)
	n	%		%		
Alen A2	17	3,0	5	0,9	3,31	2,4 (0,9-6,7)
Alen A1	543	97,0	529	99,1	1,00	1,00
A2A2	1	0,3	0	0		
A2A1	15	5,0	5	1,9	2,97	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:

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. Khi so sánh hai kiểu gen còn lại thì phát hiện, kiểu gen dị hợp A1A2 gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh ($p=0,02$). Kiểu gen A1A2 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. Tương tự như vậy khi phân tích theo các allen.

3.2.2 Đa hình kiểu gen tại SNP D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A

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

Bảng 3.3 Bảng tổng hợp kiểu gen của các SNP D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A 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

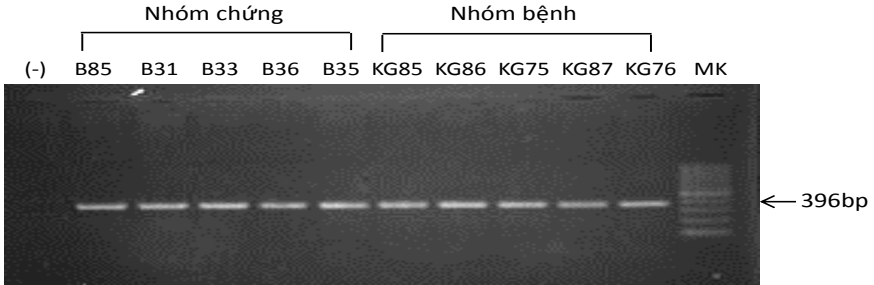
(*) Kiểu gen theo acid amin được mã hoá ở những SNP có thay đổi trình tự acid amin.

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.

3.2.3. 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.

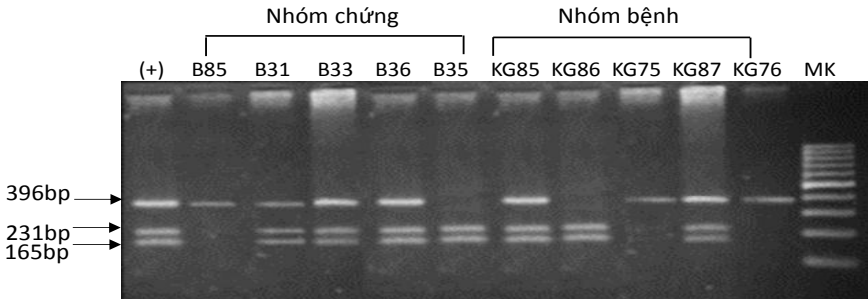


Hình 3.2 Hình ảnh PCR khuếch đại đoạn gen mang SNP R72P

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

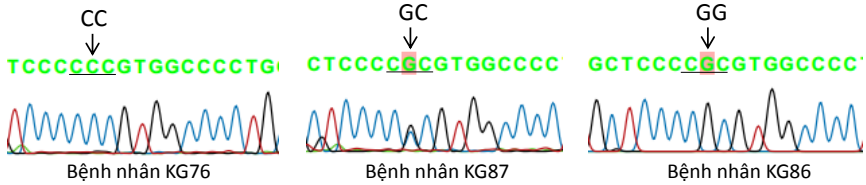
Nhận xét:

Hình ảnh điện di cho thấy, đã khuếch đại được đoạn gen đặc hiệu với kích thước 396bp. Sử dụng kỹ thuật enzyme cắt giới hạn (RFLP) 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 3.3 Sản phẩm cắt đoạn gen mang SNP R72P bằng enzyme BstUI.

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



Hình 3.4 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). Các mẫu được kiểm tra lại bằng giải trình tự trực tiếp cho kết quả tương đồng với kết quả phân tích bằng RFLP.

Bảng 3.4 Kết quả phân tích kiểu gen của SNP R72P gen TP53

Kiểu gen	Nhóm bệnh (n=280)		Nhóm chứng (n=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	

Bảng 3.5 Khả năng mắc bệnh của các kiểu gen của SNP R72P gen TP53

		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.

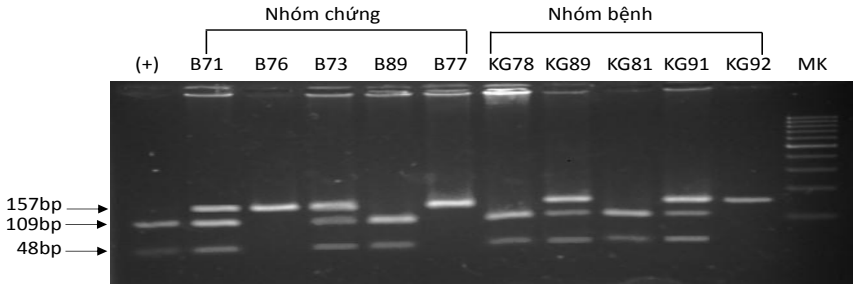
Nhận xét:

Bảng 3.4 và 3.5 cho thấy có sự khác biệt tỷ lệ kiểu gen của SNP R72P gen TP53 giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Kiểu gen P72P có khả năng mắc UTTBGNP cao hơn so với kiểu gen R72R và so với kết hợp kiểu gen R72R + R72P.

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 năm). Bệnh nhân mang kiểu gen nguyên thủy R72R có độ tuổi trung bình cao nhất (60,8 năm) và nhiều hơn kiểu gen P72P là 7,7 năm ($p = 0,01$).

3.3. Kết quả phân tích kiểu gen MDM2

SNP 309T>G của gen MDM2 được phân tích bằng kỹ thuật enzym cắt giới hạn (PCR-RFLP).



Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt enzym của SNP 309T>G (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 enzym 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 được kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự. Kết quả giải trình tự tương đồng với kết quả cắt bằng enzym giới hạn.

Bảng 3.6 Tỷ lệ phân bố các kiểu gen của SNP 309T>G gen MDM2

Kiểu gen	Nhóm bệnh (n=280)		Nhóm chứng (n=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	

Bảng 3.7. Kiểu gen MDM2-SNP309 và nguy cơ mắc UTTBGNP

Kiểu gen		OR (95%)	OR*
Allen	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: Có sự khác biệt có ý nghĩa, tỷ lệ phân bố kiểu gen SNP 309T>G giữa nhóm bệnh và chứng ($p = 0,015$). Kiểu gen G/G có tần xuất cao hơn ở nhóm bệnh (29,3%) so với nhóm chứng (19,1%). Kết quả cho thấy, người mang kiểu gen GG có khả năng mắc UTTBGNP cao hơn người mang kiểu gen T/T, OR = 2,77, 95%, CI (1,56-4,94).

Độ tuổi trung bình ở kiểu gen nguyên thủy T/T là cao nhất (60.6). Trong khi, độ tuổi trung bình của những bệnh nhân mang kiểu gen G/G là trẻ nhất (53,9). Sự chênh lệch về độ tuổi mắc bệnh giữa hai kiểu gen là 6.7 năm ($p = 0,02$).

3.4 Tương quan giữa các kiểu gen TP53, MDM2 và một số yếu tố nguy cơ

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

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.

Bảng 3.8 Kết hợp kiểu gen của R72P + 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:

Khả năng mắc bệnh tăng cao một cách có ý nghĩa khi kết hợp hai kiểu gen đột biến (về lý thuyết là có nguy cơ cao nhất) của R72P gen TP53 và 309T>G gen MDM2 (P72P + G/G). OR = 6,01, 95%, CI (1,96 - 18,42).

3.4.2 Kiểu gen R72P gen TP53, 309T>G gen MDM2 và nhiễm HBV

Bảng 3.9 Tương quan kiểu gen TP53, MDM2 và nhiễm HBV

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	T/T	1,00		1,00	
	T/G	1,63	(0,72 – 3,69)	1,04	(0,50 – 1,64)
	G/G	4,38	(1,26 – 15,30)	2,28	(1,18 – 4,41)

Nhận xét: Kiểu gen GG của SNP 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 R72P gen TP53 cũng tăng khả năng mắc bệnh cho người nhiễm HBV, tuy nhiên không rõ rệt như SNP MDM2 309T>G.

3.4.3 Tương quan giữa các kiểu gen TP53 và MDM2 với một số yếu tố nguy cơ UTTBGNP khác

Bảng 3.10 Tương quan 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)
Kiểu gen P72P - TP53	1,77	(1,03 - 3,14)
Kiểu gen G/G - MDM2	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. Nhiễm HBV là nguy cơ mắc UTTBGNP cao nhất.

Chương 4 BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm nhóm đối tượng nghiên cứu

Nhóm nghiên cứu bao gồm 280 bệnh nhân UTTBGNP có độ tuổi trung bình là $57 \pm 11,6$ năm, với khoảng tuổi từ 23-82 tuổi. Độ tuổi hay gặp nhất là 60. Chúng tôi ghi nhận sự tăng lên nhanh chóng tỷ lệ mắc bệnh bắt đầu từ độ tuổi 40. 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, công bố độ tuổi trung bình mắc bệnh là $54,8 \pm 12,9$, khoảng tuổi mắc bệnh là từ 11-84. Kết quả cho thấy tỷ lệ mắc ung thư tế bào gan nguyên phát ở nam giới cao hơn nữ giới với tỷ lệ giới nam/ nữ là 5,8/1. Nhóm chúng gồm 260 đối tượng 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. 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.

Các yếu tố nguy cơ được ghi nhận trong nhóm đối tượng nghiên cứu, nhiễm virus viêm gan B là thường gặp nhất. Trong 280 bệnh nhân

UTTBGNP nghiên cứu, thì có 171 bệnh nhân nhiễm HBV, chiếm tỷ lệ (61,0%). Kết quả của chúng tôi thấp hơn với một số nghiên cứu trong và ngoài nước. Các yếu tố nguy cơ HCV, nghiện rượu được ghi nhận với tỷ lệ thấp trong nhóm đối tượng nghiên cứu. Phân tích nguy cơ UTTBGNP thông qua tỷ suất OR, chúng tôi thấy một nguy cơ mắc bệnh rất cao cho người nhiễm HBV và HCV, lần lượt hơn 11,67 và 7,15 trong nhóm nghiên cứu, cao hơn nhiều so với nguy cơ từ các kiểu gen (bảng 10). Tình trạng xơ gan là một bệnh cảnh thường gặp trong nhóm bệnh, có 194/280 trường hợp, chiếm 69,3%. Đây là một tỷ lệ thấp hơn không đáng kể so với các nghiên cứu đã công bố. Riêng tình trạng xơ gan và nồng độ AFP, nghiên cứu không tiến hành thu thập ở nhóm chứng vì đây không phải là các yếu tố nguy cơ gây bệnh mà chỉ là các yếu tố có khả năng mắc bệnh cao.

4.2. Đa hình kiểu gen TP53 và UTTBGNP

TP53 đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì tính ổn định của bộ gen dưới tác động của các yếu tố có hại, nên bất kỳ sự biến đổi nào của TP53 đều tạo nên nguy cơ hình thành các dòng tế bào ung thư. Người ta đã tiến hành nghiên cứu kiểu gen TP53 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 khả năng mắc ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lần đầu đánh giá các đa hình kiểu gen quan trọng của TP53 ở bệnh nhân UTTBGNP tại Việt Nam.

Dup16, P21P, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A là các đa hình kiểu gen mà chúng tôi không tìm thấy sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Đây cũng là những SNP hiếm gặp trong nhóm nghiên cứu. Chỉ duy nhất đa hình dup16 là có một chút khác biệt. Tỷ lệ kiểu gen có thêm đoạn 16 bp (A2A2 và A1A2) gặp rất ít ở 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 đánh 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. Tuy nhiên, khi sử dụng mô hình phân tích hồi quy đa biến thì kết quả không có ý nghĩa. Năm 2013 C. Sagne đã tiến hành một nghiên cứu cộng dồn 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) . Tuy nhiên, ông 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. 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.

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. SNP này nằm giữa vùng hoạt hoá N tận và vùng gắn kết DNA của TP53. Tuy không ảnh hưởng trực tiếp đến sự gắn vào gen đích nhưng R72P có thể ảnh hưởng đến cấu trúc bậc 3 của phân tử TP53, làm che phủ vị trí gắn các gen đích trên phân tử protein TP53. 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 TP53.

Kết quả thu được cho thấy, tỷ lệ kiểu gen có một sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm bệnh và chứng ($p = 0,02$). Kiểu gen P72P gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh, trong khi kiểu gen R72R gặp nhiều hơn ở nhóm chứng. Kiểu gen P72P có khả năng mắc UTTBGNP cao hơn hai kiểu gen còn lại. P72P so với R72R, OR = 1,77 ; 95% ; CI (1,03 – 3,14). So sánh với một số nghiên cứu khác, như của Yoon.Y.J và cộng sự tại Hàn Quốc, OR = 2.1, 95% CI (1.25-3.24). Valeria Di Vuolo nghiên cứu ở người Italia, OR=3.56, 95% CI (1.3-9.7). Tại Châu Phi, nghiên cứu của Ezzikouri năm 2007 , OR = 2.304 (95% CI 1.014-5.234).

Độ tuổi trung bình giữa các kiểu gen trong nhóm bệnh nhân ung thư gan, kiểu gen nguyên thủy R72R có độ tuổi trung bình cao nhất ($60,8 \pm 10,2$) , nhóm bệnh nhân mang kiểu gen P72P có độ tuổi trung bình thấp nhất ($53,1 \pm 14,3$). Độ tuổi trung bình của kiểu gen đồng hợp P72P thấp hơn là 7.7 năm so với kiểu gen nguyên thủy R/R ($p = 0.01$). Kết quả này cũng cố thêm cho thực tế là R72P làm tăng khả năng mắc UTTBGNP. Tuy nhiên cần thêm các nghiên cứu có cỡ mẫu lớn hơn rất nhiều và các thiết kế nghiên cứu khác để khẳng định SNP R72P gen TP53 liên quan UTTBGNP ở người Việt, từ đó phát triển thành xét nghiệm sàng lọc sớm và tư vấn cho cộng đồng.

4.3 Đa hình kiểu gen MDM2 và UTTBGNP

Gen MDM2 là một điều hoà ngược âm tính của TP53. Bất kỳ sự biểu hiện quá mức nào của MDM2 đều dẫn đến sự suy giảm chức năng TP53 trong giữ ổn định di truyền cho 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. Sự thay thế T>G tại nucleotid 309 tại intron 1 làm tăng sự gắn kết với Sp1, một yếu tố hoạt hoá phiên mã của gen MDM2. Kết quả làm mức độ biểu hiện của MDM2 RNA và protein tăng cao.

Kết quả phân tích kiểu gen của SNP 309T>G cho thấy, có sự khác biệt có ý nghĩa tỷ lệ kiểu gen giữa nhóm bệnh và nhóm chứng ($p=0,015$). Kiểu gen đột biến G/G gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh còn kiểu gen nguyên thủy T/T 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 đa biến chỉ ra, kiểu gen G/G làm tăng khả năng mắc UTTBGNP so với kiểu gen nguyên thủy T/T ($OR = 2,77$; 95% ; CI (1,56-4,94)). Khi so sánh kiểu gen G/G với sự kết hợp hai kiểu gen G/T + T/T cũng thấy một sự tăng có ý nghĩa khả năng mắc bệnh. $OR = 2,56$; 95% ; CI (1,59-4,11). Kết quả của chúng tôi 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 cho kết quả ($OR= 2.67$, 95%, CI= 1.68- 4.22). Tại Nhật Bản nghiên cứu được biết đến nhiều nhất là của Dharel và cộng sự đã công bố, $OR = 2,27$; 95% ; CI (1,11 – 4,70). 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.

Độ tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân mang kiểu gen nguyên thủy T/T là cao nhất $60,6 \pm 9,9$. Trong khi độ tuổi trung bình ở nhóm mang kiểu gen đột biến G/G là thấp nhất $53,9 \pm 13,7$. Sự chênh lệch về độ tuổi trung bình giữa hai kiểu gen là 6,7 năm ($p = 0.02$). So sánh với nghiên cứu của Y.J. Yoon là 55.1 năm so với 50.9 năm. Độ tuổi trung bình thấp hơn ở kiểu gen đột biến G/G đã minh chứng thêm về liên quan của SNP 309 T>G đến khả năng mắc UTTBGNP. Ghi nhận này mở ra một khả năng có thể phát triển đa hình kiểu gen 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, quy mô hơn để khẳng định chắc chắn.

4.4. Tương quan giữa kiểu gen TP53 với MDM2 và với các yếu tố nguy cơ

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. Chúng tôi đã kết hợp các kiểu gen của SNP R72P gen TP53 và 309T>G gen MDM2 để đánh giá khả năng mắc UTTBGNP thông qua tỷ suất OR (bảng 3.8). Kết quả phân tích cho thấy, sự kết hợp đã làm tăng cao hơn khả năng mắc bệnh hơn so với khi chúng đứng 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 con người.

Sự tương tác giữa các kiểu gen và môi trường sẽ quyết định kiểu hình. Nếu coi mắc UTTBGNP 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. Chính vì thế cần phải đánh giá tương quan các kiểu gen và các yếu tố nguy cơ UTTBGNP khác. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích kiểu gen của SNP R72P gen TP53 và 309T>G gen MDM2 với HBV, HCV, lạm dụng bia rượu, giới, tuổi >40, tình trạng xơ gan và nồng độ AFP. Tuy nhiên do số lượng mẫu hạn chế nên tỷ lệ xác định một số yếu tố thấp dẫn đến khó khăn cho phân tích các kiểu gen. Kết quả chỉ tìm thấy duy nhất sự liên quan giữa nhiễm HBV và các kiểu gen R72P và 309T>G trong khả năng mắc ung thư gan. Cần phải có các thiết kế nghiên cứu khác phù hợp hơn, bài bản hơn để xác định mối tương quan giữa gen TP53 và MDM2 với các yếu tố nguy cơ trong UTTBGNP.

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 P72P của SNP R72P gen TP53 và G/G của SNP 309T>G gen MDM2 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 này phù hợp với một số nghiên cứu đã công bố tại Hàn Quốc, Đài Loan, Trung Quốc. 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.

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 SNP: D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Kiểu gen A1A2 của đa hình 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 có 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, và có khả năng mắc bệnh cao hơn. P72P so với R72R. OR=1,77 ; 95% ; CI (1,03 - 3,14). P72P 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 G/G cao hơn ở nhóm bệnh 29,3% so với 19,1% ở nhóm chứng. ($p=0,015$).

- Kiểu gen G/G có khả năng mắc bệnh cao hơn. G/G so với T/T. OR = 2,77; 95%; CI (1,56-4,94). G/G so với kết hợp hai kiểu gen G/T và T/T. OR = 2,56 ; 95% ;CI (1,59-4,11).

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

3. Tương quan giữa các kiểu gen TP53, MDM2 với một số yếu tố nguy cơ

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

- 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, OR = 3,23 ; 95% ; CI (1,12 – 9,45). Kiểu gen G/G 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 tiến cứu, bằng việc theo dõi các đối tượng phơi nhiễm theo thời gian sẽ có tỷ lệ phát bệnh cho mỗi kiểu gen TP53 và MDM2.
3. Cần có sự phân tích đa gen đặc biệt là các nhóm gen có liên quan với nhau trong UTTBGNP.

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.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



TRINH QUOC DAT

**TP53 AND MDM2 GENE POLYMORPHISMS STUDY
IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA**

Major : Biochemistry
Code: 62720112

MEDICAL DOCTOR DISSERTATION SUMMARY

HA NOI - 2017

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

Scientific guidance: **1. PhD. Tran Huy Thinh**
 2. Prof.PhD. Ta Thanh Van

Reviewer 1: Associate Prof. PhD. Bach Vong Hai

Reviewer 2: Associate Prof. PhD. Dinh Duy Khang

Reviewer 3: Associate Prof. PhD. Ta Van To

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

At date month year 2017

The dissertation can be found at:

- National Library of Vietnam
- Library of Hanoi Medical University

ACKGROUND

1. Urgency of topics

Primary hepatocellular carcinoma (HCC) is the common malignancy disease in the world. This disease has a high mortality rate, the second leading cause of cancer death in men, after only lung cancer. In 2012, The American Cancer Society announced, there are about 745,500 people worldwide died of liver cancer. Viet Nam locates in the epidemic area with high rates of hepatitis virus, so the number of people with HCC is relatively large. Every year, there are more than 10,000 new HCC in the whole country, this rate is among the highest in the world. Controlling risk factors for disease is one of the effective ways to reduce the incidence. HCC risk factors have long been known as hepatitis B, C, alcoholism, aflatoxin B1, non-alcoholic fatty liver. Recently, with the strong development of molecular biology, the role of genetic has been mentioned. One of them is the variation in the TP53 and MDM2 gene. They are the two major genes in the P53 signaling pathway. Which is the most important mechanism against tumor of human. In fact, TP53 is also one of the most studied genes, and has the largest mutation frequency in liver cancer. Find out the changes of TP53 and MDM2 genes, which involved in HCC development will open the door to the possibility of having an effective early screening and counseling tool for the community, the part that reduces the incidence of HCC in Viet Nam.

2. Objectives of the research:

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

3. The meaning of scientific and practical subjects:

The single nucleotide polymorphisms (SNPs) of TP53 and MDM2 genes creates different genotypes in the community. These genotypes may affect the tumor suppression ability of TP53, particularly in important functional areas. Studies in the world have documented the

association between the TP53 and MDM2 genotypes and the pathogenesis of many types of cancer, including HCC. Use of molecular biology techniques to identify genotypes at single nucleotide polymorphisms of TP53 and MDM2. Evaluate the genotypes distribution of HCC patients and the control group, thereby identifying the risky genotypes. These risky genotypes will be able to develop into early screening and counseling tools for the community, to prevent HCC development.

4. Thesis structure

The thesis is presented in 133 pages (excluding references and appendices). The thesis is divided into 7 parts.

- + Introduction: 2 pages
- + Chapter 1: Overview document 48 pages
- + Chapter 2: Objects and methodology 14 pages
- + Chapter 3: Research Results 35 pages
- + Chapter 4: Discussion 31 pages
- + Conclusion: 2 page
- + Propose: 1 page

The thesis consists of 27 tables, 37 charts and figure. Using 162 references, including Vietnamese, English and some Web pages. The appendix includes medical studies, lists 280 HCC patients and 267 control and technical processes.

Chapter 1 OVERVIEW

1. Hepatocellular carcinoma

1.1 Epidemiology and risk factors

Primary liver cancer, also known as hepatocellular carcinoma. This is a malignant disease that starts liver cells. This is a malignant disease that starts with liver epithelial cells. HCC incidence is the fifth in males and the ninth in females among types of cancer. Asia and North Africa are the regions with the highest incidence rates. In 2012, there are 782,500 new cases in the world, Asia contributes for 76%. Viet Nam is a

country in the epidemic region with high rates of hepatitis, so the HCC incidence rates is among the highest in the world. At a national workshop on cancer prevention held in Hanoi in October 2004, the incidence of HCC stand after lung cancer and stomach cancer. It is estimated that there are over 10,000 new cases in the country each year.

The risk factors of HCC have been known for a long time, as hepatitis B, C, alcoholism, aflatoxin B1, cirrhosis stage, non-alcoholic fatty liver.. Hepatitis B and C is the most common. They occupie about 70% of the cases. Hepatitis B is more common in Asia, Africa, but hepatitis C are more common in western countries and Japan. The pathogenesis mechanism of HBV and HCV is consensus that chronic inflammation is responsible for fibrosis of the liver, which facilitates the appearance of malignant cells. In addition, by the nature of viral genetic material can completely damage the genome of liver cells, producing abnormal or non-differentiated cells. In addition, Virus is DNA or RNA, it can completely damage the genome of the liver cell and creates an abnormal cell line. Alcohol has long been identified as a direct risk factor of HCC. However, the mechanism still unclear. The most popular theory is alcohol causes HCC through cirrhosis, or synergism with hepatitis B and C viruses.

Aflatoxin B1 is a toxin produced by the *Aspergillus* fungus, which produced mainly in foods such as maize, cassava, rice, peanuts, beans ... in hot and wet conditions. It is a very potent carcinogen. A product produced during the metabolism of AFB1, which can damage DNA molecules and causing mutations. There is evidence of association between AFB1 and genetic mutation in patients with HCC. The most common of which is the TP53 gene mutation. Cirrhosis is not a risk factor of HCC but patients with cirrhosis, the chances of cancer are very high. In recent years a number of studies around the world have addressed the role of non-alcoholic fatty liver disease (NASH) and type 2 diabetes in HCC but the pathogenesis is unclear.

1.2 Molecular pathology of hepatocellular carcinoma

There are three major mechanisms for causing HCC to be reviewed so far, which has been widely agreed by scientists.

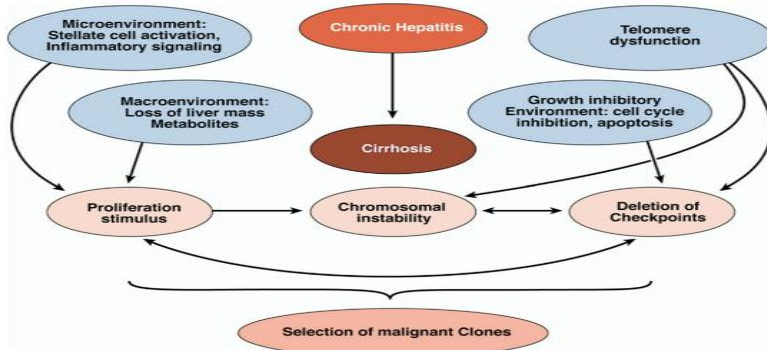


Figure depicting the molecular mechanism of HCC

Source: Gastroenterology 2007, No. 132

The three major mechanisms that cause HCC are divided inside and outside of cells. 1) Inside the cell is telomere shortening and growth inhibition of liver cells. Both lead to the selection of cells that lost test check point (cell cycle, apoptosis ..) Shortening telomeres also causes chromosomal alterations. 2) Outside the cell is a change of the environmental conditions surrounding the liver. They are fluid factors, metabolites and changes in the structure of the liver tissue. These conditions in cirrhosis stage stimulate the regeneration of liver cells, while carrying chromosomal defects. This increases the chances for selective melanoma cell lines.

With three molecular mechanisms, telomere shortening, defect proliferation, and altered environmental conditions, it has been shown the major pathways lead to hepatocellular carcinoma. The result of these mechanisms will cause molecular changes in the liver cells. Specifically: loss of cell cycle test points, resistance to apoptosis, activation of carcinogenic genes and immortal cancer cells. TP53 and MDM2 genes are the most important cell cycle checkpoints in this mechanism.

2. TP53 and MDM2 genes

2.1. TP53, cancer suppressor gene

The TP53 gene was discovered in 1979 by Crawford et al. It encodes for a protein molecules that weigh 53kDa. TP53 is the key gene in signal pathway. It has full biological characteristics of the P53 signal pathway.

In humans, the TP53 gene is located on the short branch of chromosome 17 (17p13.1). The TP53's length is 22,000 bp, including 11 exons and 10 introns. Encode area from E1 to E11, E1 does not encode, transcriptional processes start from exon 2 to exon 11.

The TP53 gene plays an important role in controlling cell division and apoptosis. When gene damage occurs, TP53 will be activated to stop the cell cycle until the DNA is repaired or lead to apoptosis if the damaged DNA does not repair. Therefore, TP53 is considered a guardian genome. In addition, TP53 is capable of activating or inhibiting a lot of genes in the P53 pathway to protect cellular stability. TP53 is also capable of repairing damaged genes. Under normal conditions, TP53 stimulates the transcription of genes which inhibit vascular proliferation. Therefore, the cells with TP53 mutation have the vascular hyperplasia. This is the last factor for developing cancer. This consolidate the theory that the TP53 gene inhibits cancer.

2.2 MDM2 gene

MDM2 is an oncoprotein that was discovered for the first time in mutated fibroblasts mouse. When MDM2 overexpress will increases the probability of tumor development. The MDM2 gene consists of 12 exons and 11 introns, located on the long branch of chromosome 12 (12q14.3-12q15). It was first identified in 1980. MDM2 protein molecules are synthesized with 491 amino acids with 56 kDa molecular weight and consisting 5 functional structural regions.

The most important role of MDM2 is to regulate TP53 activity in p53 pathways. Under normal conditions, MDM2 inhibits TP53 by the ubiquitination. As an ubiquitin ligase E3, MDM2 plays a role in the interaction between ubiquitin and TP53 protein. The pieces of ubiquitin bind to the TP53 protein molecule, take them to the proteasome and begin the process of breaking down. TP53 concentrations are always very low because MDM2 continuously initiates the TP53 protein breakdown process. On the opposite side, when TP53 is activated, it initiates MDM2

transcription. Negative regulation of two genes helps to ensure the stability of the cell genome including liver cells.

3. TP53 and MDM2 gene polymorphisms in hepatocellular carcinoma

Single nucleotide polymorphism (SNP) is the difference in DNA sequence in the genome between individual persons or between chromosomes of a person. This is a common phenomenon. It is the result of mutation points that replace a pair of nucleotides. According to the published studies, more than 200 SNPs were found in the TP53 gene and dozens one on the MDM2 gene. These single nucleotide polymorphisms create many different TP53 and MDM2 genotypes in the community. The genotypes of some of these SNPs are involved in the onset of development many type of cancers including HCC. They are risk factors to be considered.

The SNPs we analyzed in this study may change coding sequences or not but they are all located in the key functional areas of TP53. Theoretically, these areas can affect to the control tumor ability of TP53. First of all, a polymorphism caused by the addition of 16 base pairs in the intron-3 region of TP53. Subsequently, the SNPs in the TP53 N-terminal activation region where contained an interactive position with MDM2 and they can reduced the translation of TP53. They are D21D, P34P and P36P polymorphisms. They do not change the amino acid sequence but reducing the expression of the TP53 protein. Finally, the SNPs change the amino acid sequence and locate in the key functional areas of TP53. They are P47S, R72P, V217M and G360A polymorphisms of TP53 gene.

For the MDM2 gene, the most important SNP, which has been shown to be related to many type of cancer in the world, is located at the 309th nucleotide position of the intron 1, N-terminal end. This is the promoter region of MDM2 too. It is 309T>G single nucleotid polymorphism. G variant of this SNP enhances the Sp1 transcription factor into the promoter region of MDM2. Therefore, G variant increase in MDM2 protein synthesis. The result is inhibition of TP53 functional, destabilized the cell's genes and posing a risk of tumor formation.

Many gene epidemiological studies have been conducted to find a relative between SNP of TP53 and MDM2 genes and HCC. Results were not the same between studies in different regions and different ethnic groups. But almost studies have found that R72P and 309T> G polymorphisms are involved in HCC. Studies in Asia, such as Korea, Japan, Taiwan, and China, are more consistent. The differences between the studies cause by sample size, which is still a limitation of many genetic epidemiological studies. Moreover, the differences in genetic background and risk factors in each country should be consider.

Random selection will create a lot of different combinational genotypes from SNPs, for each individual people. On average, each SNP has three genotypes, combination between n SNP will produce 3^n combinational genotypes. Recently, the TP53 and MDM2 SNP studies in HCC have also recorded in this way. The studies selected only two SNPs for combining which are the most relevant in HCC. The results showed that, the combination significantly increased the risk of this disease. People, who carry the combinational genotype between P53P genotype of TP53 and 309G/G of MDM2, have a higher risk of HCC than other genotypes.

The interaction between genotypes and environments will determine the phenotype. The fact is that our liver is suffering from adverse environmental factors every day. It is very difficult for oly one genotype itself, can explain the molecular mechanism of HCC. Recently, the TP53 and MDM2 SNP studies in HCC have also taken this approach, the SNPs were studied in other HCC's risk factors such as HCV, HBV, alcoholism, NASH, smoking ... This new type of study addresses the question why many people are exposed to risk factors but not get HCC, or why the time onset HCC is not the same. Evaluation the interaction between genotypes and risk factors from the environment in risk of HCC will provide valuable information that will help prevent liver cancer among high risk populations in the community.

Chapter 2

SUBJECTS AND METHODS

2.1. Research Subjects

280 patients with HCC were diagnosed and treated at the Department of Internal Medicine, Bach Mai Hospital and Thanh Hoa Tumor Center from November 2013 to March 2015.

2.1.1. *Criteria for selecting patients*

The patient is diagnosed with HCC according to one of the following criteria:

- There is evidence of histopathology or cytology.
- Typical images on CT scanner or MRI combines with AFP > 400ng/ml.
- Typical images on CT scanner or MRI with AFP up to 400ng/ml but has hepatitis B or C infection.

2.1.2. *Exclusion criteria*

- Liver cancer metastatic from other organs.
- Patients with liver cancer and other organs cancer together.
- Patients do not agree to cooperate with research.

2.1.3. *Control group*

267 controls were selected from those who came to the medical examination at the General Hospital of Thanh Hoa province in 2014. These patients are examined, and concluded that they do not have HCC or any other type of cancer.

2.1.4. *Genotypic polymorphisms were analyzed*

- TP53 gene
 - + Add 16 pairs of base pairs at intron 3 (dup 16).
 - + SNP D21D, at codon 21, exon 2, (GAC → GAT), encoding Aspartate.
 - + SNP P34P, at 34 codon, exon 4 (CCC → CCA), Prolin coding.
 - + SNP P36P, at codon 36, exon 4 (CCG → CCA), Prolin coding.
 - + SNP P47S, at codon 47, exon 4, (CCG or TCG), encoding Prolin or Serin.

+ SNP R72P at codon 72, exon 4, (CGC or CCC), encoding Arginine or Prolin.

+ SNP V217M, at codon 217, exon 6, (GTG or ATG), encoding Valin or Methionine.

+ SNP G360A at codon 360, exon 10, (GGG or GCG), encoding Glycin or Alanin.

- Gen MDM2

SNP 309T>G, locates at nucleotide position 309, intron 1, promoter region.

2.2. Research Methodology:

Using cross-sectional descriptive study with control.

2.3. Study sites

+ Department of Biochemistry and Center for Gene Research - Protein, Hanoi Medical University.

+ Time from 1/2012 - 6/2014.

2.4. Thread adhere research ethics in medicine

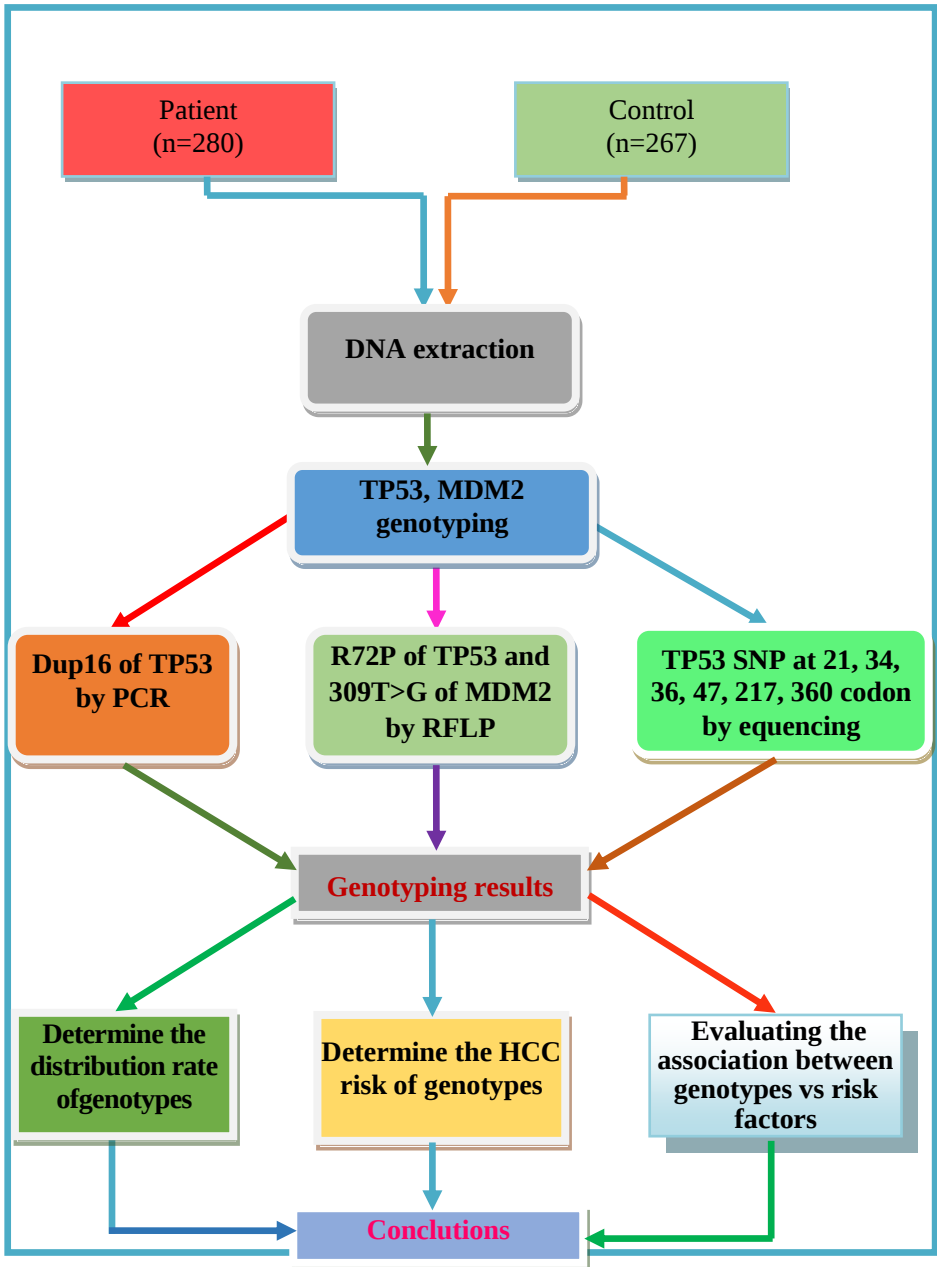
This study was approved by the ethics committee of Hanoi Medical University.

2.5 Funds for the study

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

2.6 Procedures and techniques used in the study

The techniques used in the study included: Interview and turn up medical treatment documents to identify risk factors exposing. DNA extraction technique from peripheral blood samples. PCR technique detects the genotype of dup16 polymorphism of TP53 gene. Using restriction fragment length polymorphism technique for genotyping R72P SNP of TP53 gene and 309T>G SNP of MDM2 gene. Sequencing technique to identify genotypes of SNPs: D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A of TP53 gene.

Diagram of the study design

Chapter 3 RESULTS

3.1. Characteristics of the study subjects

Table 3.1. Distribution of study subjects

Characteristic		Patients		Controls		p
		n	%	n	%	
Sex	Male	239	85,4	214	80,1	0,06
	Female	41	14,6	53	19,9	
Age		57 ± 11,6		56 ± 15,5		0,2
Alcoholism		23	8,2	9	3,3	
HBV		171	61,1	36	13,5	
HCV		12	4,3	4	1,5	
Cirrhosis		194	69,3	0	0	
AFP > 400ng/ml		143	51,1	0	0	

Comment:

The study group included 547 subjects with 280 patients with HCC and 267 controls. The average age and sex ratio between the patient group and control group were not significantly different. The results show that, the number of male patients is much higher than female patients. Of the risk factors, the HBV infected was high, 171/280 HCC patients (61.1%) It is the most common factor among risk factors of HCC were detected.

3.2 Results of TP53 genotyping

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

After DNA extraction we amplify the third non-coding region of the TP gene was amplified the third non-coding region of the TP53 gene by PCR technique. Genetic polymorphism with or without 16 bass pairs duplication was determined by PCR electrophoresis on 3% agarose gel.

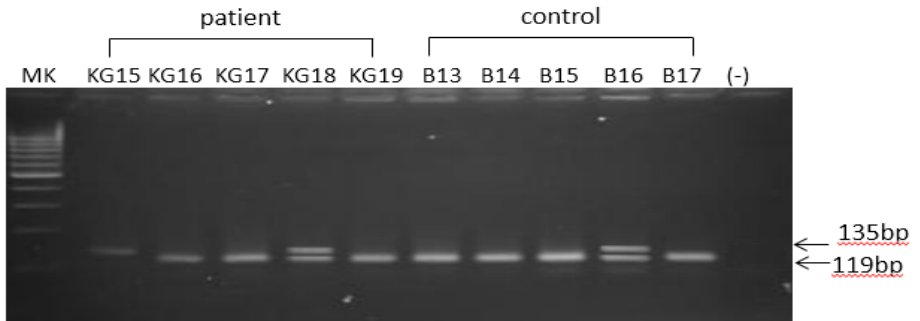


Figure 3.1 The PCR product electrophoresis of the dup16 polymorphism of TP53

MK: Marker 100-1000bp; (-) distilled water is negative

Comment

The KG15 samples has only one 135bp bar. It is A2A2 homozygous gennotype which has 16 basepairs duplication. The KG18 and the B16 samples have 135bp and 119bp bars. They are A2A1 heterologous genotype. The other samples were genotypes with no mutation (A1A1) because they have only one 119bp bar.

Table 3.2 Genetic analysis results of dup16 SNP of TP53 gene

Gennotypes	Patient (n=280)		Control (n=267)		OR	OR* CI (95%)
	n	%		%		
Alen A2	17	3,0	5	0,9	3,31	2,4 (0,9-6,7)
Alen A1	543	97,0	529	99,1	1,00	1,00
A2A2	1	0,3	0	0		
A2A1	15	5,0	5	1,9	2,97	2,1 (0,8-6,4)
A1A1	264	94,7	262	98,1	1,00	1,00

OR is adjusted from the variables: age, gender, HBV, HCV, alcoholism by multivariate logistic regression model.*

Comment:

The frequency of mutant genotype of 16bp polymorphism of TP53 gene was very low in the study population. Particularly, the A2A2 mutant genotype has only one case in the liver cancer group. A1A2 gennnnotype was found to be more common in the disease group ($p = 0.02$). The A1A2 genotype is more likely to be cancerous than the A1A1

genotype. OR = 2.97; 95%; CI (1.03-6.4). However, the result of the logistic regression model showed no signification. It is the same with allen model analysis.

3.2.2 Genotypic variation in SNPs: D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A

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

Table 3.3 Genotypes of SNPs: D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A

Replacing the nucleotides of SNP	Wild homozygous genotype		Heteropathic genotypes		Mutant homozygous genotypes	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
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

(*) The amino acids are encoded by that change the nucleotid sequence.

Comment:

Table 3.3 shows that all of these SNPs appeared very low frequency in the study population and were not associated with HCC.

3.2.3. Genotyping of R72P SNP

Using restriction fragment length polymorphism technique (RFLP) for genotyping R72P SNP of TP53 gene. PCR reaction to amplify the gene fragment that contains R72P SNP. The product was electrophoresed on 1.5% agarose gel for testing.

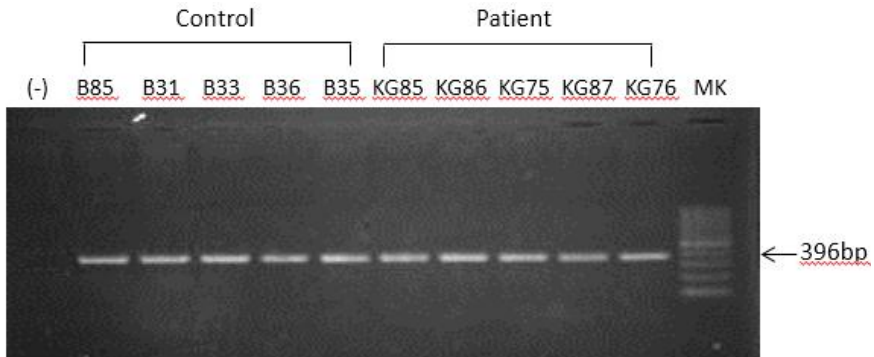


Figure 3.2 The PCR product electrophoresis of the R72P SNP of TP53 gene

Comment:

Electrophoresis image shows that the specific gene fragment has been amplified. After that, we use RFLP technique to cut the amplified gene segment at specific nucleotide position (CG ↓ CG). The product was electrophoresed on agarose gel 3%.

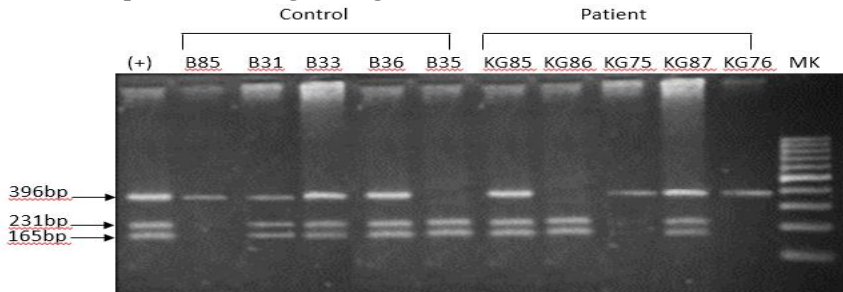


Figure 3.3 The cutting product of gene fragment contains R72P SNP

MK: 100-1000bp standard scale; (+) positive control by a sample which had known R72P (GC) genotype before. The P72P (CC) homozygous genotype with only 396bp bars, found in B85 and KG75, KG76. The R72P (GC) heterozygosity genotype, with three bars, found in B31, B33, B36 and KG85, KG87. The R72R (GG) homozygotes genotype have two bars, appears in B35 and KG86 samples.

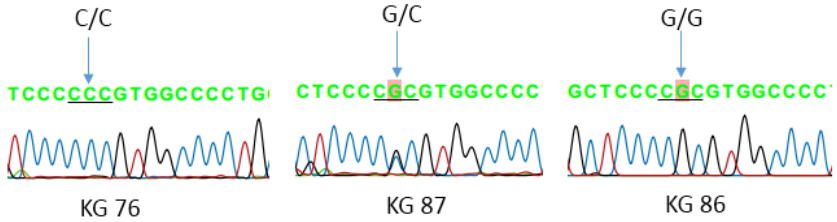


Figure 3.4 Sequence figure representation of R72P SNP genotypes

The P72P (CC) genotype has a single nucleotid C peak at the second nucleotid position of condon 72 (KG7 sample); The R72P (GC) genotype has nucleotide G peak and nucleotid C peak (KG87 sample); The R72R (GG) genotype has only nucleotid G peak (KG86 sample). Random samples were tested by sequencing for similar results to the RFLP analysis.

Table 3.4 Results of genotyping of R72P SNP of TP53 gene

Genotype	Patient (n=280)		Control (n=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	

Table 3.5 HCC's risk of R72P SNP genotypes of TP53 gene

		OR	OR*, CI (95%)
Allen	R	1,00	1,00
	P	1,30	1,24 (0,78-3,45)
Genotypes	R72R	1,00	1,00
	R72P	1,02	1,66 (0,99-2,79)
	P72P	1,77	1,77 (1,03-3,14)
Combined genotypes	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* is adjusted from the variables: age, gender, HBV, HCV, alcoholism by multivariate logistic regression model.

Comment:

There is a significant difference in the genotype rate of the R72P SNP between the patient group and the control group. The P72P genotype is more likely to develop HCC than the R72R genotype. It is also significant when compare with genotype combination (R72R + R72P).

Comparing the average age of three genotypes of R72P SNP we found out, patients group with the lowest mean age (53.1 years) had P72P genotype. Patients with R72R genotype had the highest mean age (60.8 years) and 7.7 years more than P72P genotype ($p = 0.01$).

3.3. Results of MDM2 genotype analysis

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

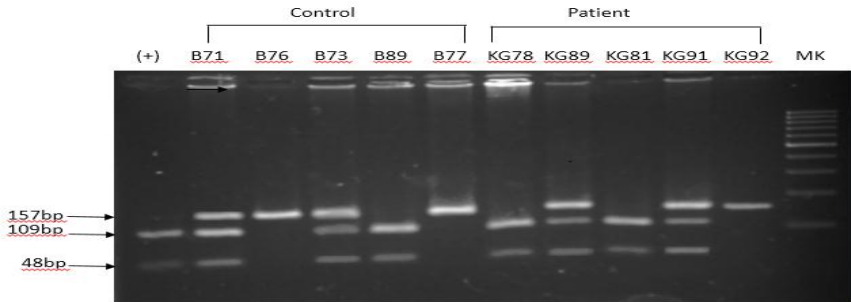


Figure 3.5 Electrophoresis image of RFLP products of 309T>G SNP

(MK) 100-1000bp standard scale, (+) positive control by a sample which had known G/G genotype before. The G/G genotype with two bars (109bp and 48bp) appears at B89 sample in control group and the KG78, KG81 sample in patient group. The G/T- genotype has three bars, appearing in the B71, B73 and KG89, KG91. The T/T genotype has only one 157 bp bar, appearing in B76, B77 and KG92 sample.

Comment:

Electrophoresis images of RFLP products of 309T>G SNP confirm to theoretical calculations. All three genotypes with three types of bars were found in both HCC and control group. The results were checked by sequencing. The sequencing results are similar with the RFLP results.

Table 3.6 Distribution of genotyping of 309T> G SNP of MDM2 gene

Genotype	Patient (n=280)		Control (n=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	

Table 3.7 Genotype of 309T>G SNP of MDM2 gene and risk for HCC

Genotypes		OR (95%)	OR*
Allen	T	1,00	1,00
	G	1,39	1,27 (0,87-2,91)
Genotypes	TT	1,00	1,00
	TG	1,03	1,12 (0,69-1,84)
	GG	1,95	2,77 (1,56-4,94)
Genotype Combination	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* is adjusted from the variables: age, gender, HBV, HCV, alcoholism by multivariate logistic regression model.

Comment:

There was a significant difference in the distribution genotype of 309T> G SNP between HCC and control group ($p = 0.015$). Genotype G/G was higher in the HCC group (29.3%) than in the control group (19.1%). Results also recorded the G/G genotype were more likely to develop HCC than those with T/T genotype, OR = 2.77, 95%, CI (1.56-4.94).

The average age of T/T genotype in patient group was the highest (60.6). On other hand, the mean age of patient group with G/G genotype was the youngest (53.9). The average age difference between two genotypes was 6.7 years ($p = 0.02$).

3.4 Correlation between TP53, MDM2 genotypes and some HCC risk factors.

3.4.1 Combination of TP53 genotypes with MDM2 genotypes.

If the TP53 and MDM2 genotypes are a individual risk factor of HCC, a combination between two risk factors will increases the risk of HCC. Isn't it?

Table 3.8 Combination of R72P + 309T>G genotypes and risk of HCC

	Genotypes of R72P SNP	Genotypes of 309T>G SNP	OR* 95%
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* is adjusted from the variables: age, gender, HBV, HCV, alcoholism by multivariate logistic regression model.

Comment:

The risk of disease is increased significantly when combining two mutant genotypes. (wich is the highest risk in theoretical calculating). It is (P72P + G/G). OR = 6,01, 95%, CI (1,96 - 18,42).

3.4.2. TP53 genotype, MDM2 genotype and HBV infection in HCC risk

Table 3.9 Correlation between genotype of TP53-R72P SNP, MDM2-309T>G SNP and HBV infection in HCC's risk

Genotype		HBV		without 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* is adjusted from the variables: age, gender, HBV, HCV, alcoholism by multivariate logistic regression model.

Comment:

The G/G genotype of 309T> G SNP increased significantly the HCC risk for HBV infection, OR = 4.38, 95%, CI (1.26 - 15.30). Genotypes of the R72P SNP also increases the HCC risk for HBV infection, but it is not significant as 309T> G SNP.

3.4.3 Correlation between TP53 and MDM2 genotypes with some other HCC risk factors

Table 3.10 Correlation between TP53, MDM2 genotypes and HCC risk factors

Risk factors	OR*	CI (95%)
Man	1,35	(0,78 – 2,30)
Age > 40	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)
P72P of R72P SNP	1,77	(1,03 - 3,14)
G/G of 309T>G SNP	2,77	(1,56 - 4,94)

OR is adjusted from the variables: age, gender, HBV, HCV, alcoholism by multivariate logistic regression model.*

Comment:

Cirrhosis and AFP levels did not appear in the control group, so they were not measured by OR ratio. HBV infection is the highest risk of HCC.

Chapter 4 DISCUSSION

4.1. Characteristics of the study subjects

The studied population includes 280 HCC patients with an average age about 57 ± 11.6 years and age range from 23-82 years old. The most common age is 60 years. We also recorded an significant increase the incidence of disease starting at the age of 40. Our record is quite similar to some domestic and international studies. In 2010, Le Minh Huy announced the average age of HCC was 54.8 ± 12.9 years and age range from 11-84 years old. The results show that, the prevalence of HCC in males is higher than in females, with a ratio of 5.8 / 1. The control group

is 260 randomly selected subjects who visit hospital in routine examination. It has no difference in age and sex ratio between patient and control group. The effect of differentiation of risk factors between HCC patient and control group was limited by the multivariate logistic regression model.

Among risk factors of HCC in the studied population, Hepatitis B virus infection are the most common. 171 cases had HBV infection in the patient group, accounting for 61,0%. Our results are lower with some domestic and foreign studies. HCV, alcoholism were recorded at low rates in the studied population. Analyzing the risk of HCC by OR ratio, we found a very high risk for HBV and HCV infections in the studied population. OR=11,67 for HBV and 7,15 for HCV. It is much higher than the risk from genotypes (Table 10). Cirrhosis is a common situation in the HCC group. There were 194/280 cases, accounting for 69,3%. This is a quiet lower rate than published studies. Cirrhosis and AFP levels were not conducted in the control group because these are not risk factors of HCC. They are only high probability factors of having HCC.

4.2. TP53 polymorphism and HCC

TP53 gene plays an important role in keeping genome stability under the affect of harmful factors. Any variation in TP53 molecular will creates the risk of cancer cell lines. TP53 genotypes have been studied on many cancers and in many different races. However, the results are inconsistent between the published studies. In this study, we first evaluate the TP53 polymorphisms in HCC patients in Viet Nam.

Dup16, P21P, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A were polymorphisms in which we did not find differences between the disease and control groups. These are also rare SNPs in the studied population. Only dup16 polymorphism is a bit different. The mutant genotypes (A2A2 and A1A2) are very rare in study population. Due to the low frequency of mutant genotypes so we evaluated only the risk of A1A2 genotype to A1A1 genotype. Results showed that, the A1A2 genotype was more likely to develop HCC than A1A1 genotype. However, when using multivariate regression analysis, the results were not significant. In 2013, C. Sagne conculated results of 25 published studies, he annouced that the A2A2 genotype increased the risk of cancer against A1A1 genotype (OR = 1.45, 95%, CI = 1.22- 1.74). However, he also pointed out that there are differences between other ethnics. He discovered dup16

polymorphism is not related to cancers in Indians, Mediterranean and Northern Europe people but significance in Caucasian Americans. His records also showed that, dup16 polymorphism risk were not the same between types of cancer. The mutant A2A2 genotype is a risk factor for breast cancer, colon cancer but not for lung cancer. Our results once again demonstrate that ethnic and type of cancer should be considered in the studies about TP53 polymorphisms and cancer.

R72P is the most commonly known SNP of TP53 gene. This is also the TP53 SNP, which is studied the most in HCC. This SNP locates between the activation region and the DNA binding region of TP53 gene. Although it does not directly affect the attachment to the target gene, R72P SNP may affect the tertiary structure of the TP53 molecule which covered the position of target genes attachment in the TP53 protein molecule. In addition, codon 72 is also located in the proline-rich region of exon 4 of TP53 gene, where is thought to be associated with the apoptotic function of TP53.

Our results showed that, R72P SNP genotypes rates had a significant difference between HCC and control group ($p = 0.02$). P72P genotypes were more common in the disease group, while the R72R genotype was more common in the control group. The P72P genotype is more likely to develop HCC than the other two genotypes. P72P against R72R, OR = 1,77 ; 95% ; CI (1,03 – 3,14). Compared to other published studies, such as Yoon.Y.J et al in Korea, OR = 2.1, 95% CI (1,25-3,24). Valeria Di Vuolo studied in Italy, OR = 3,56 ; 95% CI (1,3-9,7). 2007 in Africa, Ezzikouri's study, OR = 2,304 (95% CI 1,014-5,234).

Average age of genotypes among patients with HCC are different. R72R genotype has the highest mean age ($60,8 \pm 10,2$). Patients with P72P genotype have the lowest average age ($53,1 \pm 14,3$). The mean age of the P72P genotype was 7,7 years lower than the original R72R genotype ($p = 0,01$). This result supports the fact that R72P SNP increases the risk of developing HCC. However, more large studies and other research designs are needed to confirm that R72P SNP of TP53 is associated with the HCC in Vietnamese.

4.3. MDM2 genotypes and HCC

The MDM2 gene is a TP53 negative feedback regulator. Any overexpression of MDM2 will lead to a functional impairment of TP53 in keeping genetic stability. This result is the best condition for cancer

cells appear, including hepatocellular carcinoma. Any variation in the DNA molecule of MDM2 that enhances the expression of MDM2 is likely to get cancer transformation. The substitution T>G at the nucleotide 309 at the intron 1 increases the binding to Sp1. Which is a transcription activator of MDM2 gene. As a result, the expression of MDM2 RNA and MDM2 protein are increased.

Our results of genotyping 309T>G SNP showed that there was a significant difference between patient and control group ($p = 0.015$). The G/G genotype has higher frequency in the disease group and the T/T genotype was higher in the control group. Analysing by allen model also found significant differences between the two study group ($p = 0.02$). Multivariate analysis by multivariate regression showed that G/G genotype increased the risk of HCC than T/T genotype (OR = 2.77; 95%; CI (1.56- 4.94). Comparing G/G genotype with combination of two other genotypes (G/T + T/T), there was also a significant risk. OR = 2.56; 95% CI (1.59-4.11). Our results are quite similar to those previously published, especially in East Asia. Study of Y.J. Yoon et al in Korea gave the results (OR = 2.67, 95%, CI = 1.68-4.22). In Japan the most well-known research is that of Dharel et al. OR = 2.27; 95%; CI (1.11 - 4.70). In our opinion there is a similarity between East Asian area such as Korea, Japan, China, Vietnam and Taiwan.

The average age of patient group that has the T/T genotype was 60.6 ± 9.9 . While the average age of the G/G genotype was the lowest, 53.9 ± 13.7 . The difference between the two genotypes was 6.7 years ($p = 0.02$). Comparing with Y.J. Yoon study, It is 55.1 years versus 50.9 years. The lower average age of G/G genotypes has further demonstrated the association between 309 T>G SNP and the risk of HCC. This results opens the possibility of developing the 309T>G SNP as a screening marker for subjects at high risk of HCC in Viet Nam. However, in order to have such applications more other study models is necessary to assure certainty.

4.4 Relationship between TP53 and MDM2 genotypes and HCC risk factors

The TP53 and MDM2 genotypes are individual risk factor of HCC, a combination of them will increased significantly the risk of disease. In fact, the random combination of natural selection created many genotypes from different SNPs. In this study, we combined the genotypes of the R72P SNP of TP53 gene and 309T> G SNP of MDM2 gene for

evaluating the HCC risk by OR ratio (Table 3.8). The results of the showed that, the combination of genotypes increased the risk of disease rather than they stand alone. This is understandable, because there are often multiple genes involved in the expression of a phenotype or a function. Moreover, the relationship between TP53 gene and MDM2 gene is very strong in the human anti-cancer mechanism.

The interaction between genotypes and the environment will determine the phenotype. HCC disease is a phenotype, that is the result of interaction between the genome and risk factors from the environment. It is necessary to evaluate the correlation between TP53 and MDM2 genotypes and other risk factors of HCC. In this study, we analyzed the genotypes of R72P SNP of TP53 gene and the 309T>G SNP of MDM2 gene with HBV, HCV, alcoholism, gender, age> 40, cirrhosis and AFP levels. However, due to the limited number of samples, the rate of some factors are low factors so it difficult to analyze genotypes. Only the association between HBV infection and R72P SNP and 309T>G NP was found in study population. More modern research designs are needed to confirm the correlations between TP53 and MDM2 geneotypes with risk factors of HCC.

We detected 207 HBV cases, 171 were in the group of patients with HCC and 36 in the control group. We found that the P72P genotype of R72P SNP of TP53 gene and G/G of the 309T>G SNP of MDM2 gene significantly increased the risk of hepatocellular carcinoma in HBV infected patient. OR ratio are OR = 3.23; 95%; CI (1.12 - 9.45) and OR = 4.38; 95%; CI (1.26 - 15.30). This OR ratio was higher than that of the non-HBV group and was higher than that in all the 547 subjects analyzed in the previous section. This result is quiet similar with a number of published studies in Korea, Taiwan, and China. We consider a strong interaction between TP53, MDM2 and virus viruses B. The interaction will follow HCC development if that is mutant genotypes.

CONCLUSION

From the research results can offer some conclusions:

1. The distribution rate of TP53 genotypes in HCC and control group

- There was no difference in the genotypic variation of SNPs: D21D, P34P, P36P, P47S, V217M, G360A between HCC and control group. The A1A2 genotype of dup16 polymorphism was more common in the disease group ($p = 0.02$).

- The genotype distribution of R72P SNP between HCC and control groups was significantly different ($p = 0.02$). The P72P genotype is more common in patients. 26.4% vs 16.9% in the control group, and were more likely to develop HCC.

- The P72P genotype vs. R72R genotype. OR = 1.77; 95%; CI (1.03 - 3.14). P72P vs. combination of both genotypes R72P and R72R, OR = 1.77 95%, CI (1.08 - 2.86).

- The HCC patient group with P72P genotype had a mean age lower than R72R genotype 7.72 years old ($p = 0.01$).

2. The distribution rate of MDM2 genotypes in HCC and control group

- The genotype distribution of 309T>G SNP of MDM2 between HCC and the control group was a significant difference ($p = 0.015$). Frequency of G/G genotype was higher in the HCC group, 29,3% vs 19,1% in the control group. ($P = 0,015$).

The G/G genotype is more likely to develop HCC than other genotypes. G/G vs. T/T OR = 2,77 ; 95% ; CI (1,56-4,94). G/G versus combination of G/T and T/T genotypes. OR = 2.56; 95% CI (1.59-4.11).

- The HCC patient group with G/G genotype had a mean age lower than T/T genotype 6,7 years old ($p = 0.02$).

3. The association between TP53, MDM2 genotypes and some risk factors of HCC

- Combining the genotyping of R72P SNP of TP53 gene and 309T>G SNP of MDM2 gene increased HCC risk.

- No association was found between alcoholism, HCV, cirrhosis, sex, age > 40 and the TP53 and MDM2 genotypes in HCC risk in the study population.

- The R72P SNP of gen TP53 and 309T>G SNP of MDM2 gene increases the HCC risk in HBV infected patients: The P72P genotype of TP53, OR = 3,23; 95%; CI (1,12 - 9,45). The G/G genotype of MDM2, OR = 4,38; 95%; CI (1,26 – 15,30).

RECOMMENDATIONS

1. Large-scale studies (community-based epidemiological studies) are needed to confirm the association between TP53, MDM2 genotypes and HCC in Viet Nam. It is the same with other type of cancer.
2. TP53 and MDM2 genotypes need to be studied in the interaction with risk factors of HCC by a prospective study.
3. Multigenes analysis is needed, especially related genes, in the strategy of future researchs to find the role of genetic in HCC development.

**LIST OF PUBLIC SCIENTIFIC WORKS RELATED
TO THE DISSERTATION**

1. Trinh Quat Dat, Pham Le Anh Tuan, Nguyen Thi Van Hong, Nguyen Duc Hinh, Tran Van Khanh, Ta Thanh Van, Tran Huy Thinh (2016). "The 309T>G single nucleotid polymorphism of MDM2 gene and the risk of hepatocellular carcinoma in Vietnam", *Journal of Medical Research*, Vol 94(2), 9-15.
2. Trinh Quoc Dat, Tran Huy Thanh, Tran Van Khanh, Pham Le Anh Tuan, Pham Ngoc Minh, Ngo Thanh Tung, Ta Thanh Van (2016). "The Arg72Pro SNP of TP53 gene in patients with hepatocellular carcinoma in Vietnam", *Journal of Clinical Research*, Vol. 100(2), 26-32.
3. Trinh Quoc Dat, Tran Huy Thinh (2016), "TP53 polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma", *Journal of Medical Research*, 102(4), 1-9.
4. Trinh Quoc Dat, Tran Huy Thinh (2017), "MDM2 genetic polymorphism and hepatocellular carcinoma risk of HBV infected patients", *Vietnam Medical Journal*, 451(1), 121-125.