

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



HỒ QUANG HUY

**NGHIÊN CỨU CÁC ĐỘT BIẾN TP53, BRAF
TRONG MÔ UNG THƯ DA VÀ MỐI LIÊN QUAN
CỦA NÓ VỚI CÁC THỂ BỆNH**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



HỒ QUANG HUY

**NGHIÊN CỨU CÁC ĐỘT BIẾN TP53, BRAF
TRONG MÔ UNG THƯ DA VÀ MỐI LIÊN QUAN
CỦA NÓ VỚI CÁC THỂ BỆNH**

Chuyên ngành : Dị ứng và miễn dịch

Mã số : 62720109

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Phạm Đăng Khoa

2. PGS. TS. Phan Thị Hoan

HÀ NỘI - 2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là: Hồ Quang Huy, nghiên cứu sinh khóa 30 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Dị ứng và Miễn dịch, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Phạm Đăng Khoa và PGS.TS. Phan Thị Hoan.

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 2020

Người viết cam đoan

Hồ Quang Huy

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Ban Giám Hiệu, Phòng Quản lý Đào tạo Sau đại học, trường Đại học Y Hà Nội luôn giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Phạm Đăng Khoa và PGS. TS. Phan Thị Hoan, những người thầy có nhiều kiến thức, kinh nghiệm đã tận tình giảng dạy và hướng dẫn tôi trong suốt quá trình học tập, thực hiện đề tài cũng như hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch, Bộ môn Y sinh học - Di truyền và Bộ môn Giải phẫu bệnh trường Đại học Y Hà Nội đã tạo điều kiện cho tôi trong suốt thời gian nghiên cứu. Tôi cũng xin trân trọng cảm ơn những bệnh nhân đã tự nguyện tham gia và cung cấp các thông tin cho nghiên cứu này.

Đặc biệt, tôi xin cảm ơn những người thân trong gia đình đã hết lòng ủng hộ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và là động lực giúp tôi vượt qua những khó khăn để đạt được kết quả khóa học và hoàn thành luận án.

Tác giả luận án

Hồ Quang Huy

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC BẢNG BIỂU	viii
DANH MỤC HÌNH VẼ	ix
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	xi
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. CÁC THỂ LÂM SÀNG UNG THƯ DA	3
1.1.1. Cấu trúc da	3
1.1.1.1. Thượng bì.....	3
1.1.1.2. Trung bì.....	4
1.1.1.3. Hạ bì	5
1.1.2. Dịch tế ung thư da	5
1.1.3. Yếu tố nguy cơ của ung thư da	6
1.1.3.1. Ánh sáng mặt trời	6
1.1.3.2. Asen.....	7
1.1.3.3. Bức xạ ion hóa	7
1.1.3.4. Yếu tố cá thể.....	7
1.1.3.5. Các yếu tố khác.....	8
1.1.4. Phân loại ung thư da	8
1.1.4.1. Ung thư biểu mô tế bào đáy (Basal cell carcinoma -BCC).....	9
1.1.4.2. Ung thư tế bào vảy (Squamous cell carcinoma - SCC).....	9
1.1.4.3. Ung thư tế bào hắc tố	10
1.2. SINH LÝ BỆNH HỌC QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN UNG THƯ DA	10

1.2.1. Kiểm soát sự phân chia, sinh trưởng của tế bào	10
1.2.2. Các cơ chế phát sinh ung thư.....	11
1.2.2.1. Mô hình chung của phát sinh ung thư	11
1.2.2.2. Các con đường tín hiệu trong ung thư.....	12
1.2.2.3. Oncogen (gen sinh ung thư hay gen ung thư)	15
1.2.2.4. Gen sửa chữa DNA	17
1.2.2.5. Đột biến nhiễm sắc thể gây ung thư	18
1.2.2.6. Ung thư phát sinh do sự tương tác của môi trường và di truyền	19
1.3. GEN TP53 VÀ UNG THƯ DA.....	19
1.3.1. Cấu trúc và sản phẩm của gen TP53	19
1.3.2. Vai trò của gen TP53 trong cơ chế bệnh sinh ung thư da.....	23
1.3.3. Các đột biến gen TP53 trong ung thư da.....	25
1.4. GEN BRAF VÀ UNG THƯ DA.....	28
1.4.1. Cấu trúc gen BRAF	28
1.4.2. Gen BRAF và con đường tín hiệu sinh ung thư	29
1.4.2.1. Quá trình hoạt động của con đường tín hiệu MAPK	30
1.4.2.2. Vai trò con đường tín hiệu MAPK trong ung thư.....	31
1.4.2.3. Đột biến gen BRAF trong ung thư da.....	33
1.5. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN TP53 VÀ GEN BRAF.....	34
1.5.1. Phương pháp giải trình tự gen.....	34
1.5.1.1. Phương pháp giải trình tự gen Sanger	34
1.5.1.2. Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới NGS (Next Generation Sequencing) [79].....	36
1.5.2. Phương pháp realtime PCR Taqman Probe [80].....	39
1.5.3. Phương pháp lai phân tử Southern blot.....	39

1.5.4. Phương pháp hóa mô miễn dịch (HMMD)	40
1.5.2.1. Nguyên lý kỹ thuật	40
1.5.1.2. Các kỹ thuật nhuộm miễn dịch enzyme [81]	42
Chương 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	44
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	44
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân	44
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ.....	44
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	44
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu	44
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu	45
2.2.2.1. Xác định các đột biến của gen P53 và BRAF ở mô ung thư da, các kỹ thuật sau được sử dụng:	45
2.2.2.2. Xác định biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da, sử dụng kỹ thuật: Hóa mô miễn dịch	45
2.2.2.3. Xác định mối tương quan giữa đột biến gen TP53 và biểu lộ protein p53 đột biến ở mô ung thư da.	45
2.2.3. Các qui trình và kỹ thuật nghiên cứu	45
2.2.3.1. Qui trình kỹ thuật tách chiết DNA tổng số từ mô ung thư.....	45
2.2.3.2. Xác định nồng độ, độ sạch DNA bằng phương pháp quang phổ kế.....	46
2.2.3.3. Phương pháp điện di kiểm tra DNA	48
2.2.3.4. Kỹ thuật PCR khuếch đại gen BRAF và TP53	48
2.2.3.5. Kỹ thuật giải trình tự và xác định các biến đổi gen TP53 và gen BRAF.....	51
2.2.3.6. Kỹ thuật hóa mô miễn dịch.....	51
2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	54
2.3.1. Thời gian nghiên cứu	54

2.3.2. Địa điểm nghiên cứu	54
2.4. ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU.....	54
2.5. QUẢN LÝ THÔNG TIN	55
2.6. PHÂN TÍCH XỬ LÝ SỐ LIỆU	55
Chương 3 KẾT QUẢ	56
3.1. KẾT QUẢ VỀ THÔNG TIN CHUNG CỦA ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	56
3.2. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH CÁC ĐỘT BIẾN GEN <i>TP53</i>	57
3.2.1. Kết quả đột biến gen <i>TP53</i> bằng phương pháp giải trình tự gen	57
3.2.1.1. Kết quả khuếch đại gen <i>TP53</i> bằng kỹ thuật PCR	57
3.2.1.2. Các vị trí đột biến trên các exon gen <i>TP53</i>	58
3.2.1.3. Các vị trí đột biến trên các intron gen <i>TP53</i>	60
3.2.1.4. Một số hình ảnh biến đổi gen <i>TP53</i> qua phân tích gen bằng phương pháp xác định trình tự gen	61
3.2.1.4. Tỷ lệ biến đổi đoạn gen <i>TP53</i> ở các mẫu ung thư da	65
3.2.2. Kết quả xác định biểu lộ protein p53 đột biến bằng phương pháp hóa mô miễn dịch	72
3.2.2.1. Một số hình ảnh đột biến protein p53 trong mô ung thư da. ...	72
3.2.2.2. Kết quả xác định protein p53 đột biến trong mô ung thư da ..	74
3.3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐỘT BIẾN GEN <i>BRAF (V600E)</i> Ở CÁC MẪU UNG THƯ DA	74
3.3.1. Phân tích đột biến gen <i>BRAF (V600E)</i> bằng phương pháp giải trình tự gen	74
3.3.1.1. Kết quả khuếch đại gen <i>BRAF</i>	74
3.3.1.2. Một số hình ảnh phân tích gen <i>BRAF</i>	76
3.3.2. Kết quả xác định protein <i>BRAF (V600E)</i> trong mô ung thư da .	77
3.3.2.1. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch đột biến <i>BRAF(V600E)</i> . ..	77

3.3.2.2. <i>Kết quả biểu lộ protein BRAF đột biến (V600E) trong mô UT da</i>	78
Chương 4 BÀN LUẬN	80
4.1. THÔNG TIN CHUNG VỀ BỆNH NHÂN NGHIÊN CỨU	80
4.2. ĐỘT BIẾN GEN TP53 TRONG UNG THƯ DA	81
4.2.1. <i>Phân loại các biến đổi ở các đoạn gen TP53</i>	83
4.2.2. <i>Về tỷ lệ biến đổi gen TP53 ở trong ung thư da</i>	92
4.2.3. <i>Biến đổi gen TP53 ở trong từng loại ung thư da</i>	93
4.2.4. <i>Phân tích biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da</i>	95
4.3. ĐỘT BIẾN GEN BRAF (V600E) Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ DA	99
4.3.1. <i>Phân tích đột gen BRAF (V600E) ở bệnh nhân ung thư da</i>	100
4.3.2. <i>Xác định biểu lộ protein BRAF đột biến ở mô ung thư da</i>	102
4.4. MỐI LIÊN QUAN GIỮA BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN VÀ UNG THƯ DA	104
4.5. BÀN LUẬN VỀ ƯU NHƯỢC ĐIỂM CỦA QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN TP53 VÀ BRAF TRONG UNG THƯ DA	106
KẾT LUẬN	108
KIẾN NGHỊ	110
DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Một số oncogen thường gặp [37].....	16
Bảng 1.2. Một số gen ức chế khối u [37].....	18
Bảng 3.1. Phân bố tỷ lệ ung thư da theo tuổi.....	56
Bảng 3.2. Phân bố tỷ lệ ung thư da theo giới.....	57
Bảng 3.3. Các loại đột biến gen <i>TP53</i> trên các đoạn exon ở các mẫu ung thư da (n=63)	59
Bảng 3.4. Các loại biến đổi gen <i>TP53</i> trên các đoạn intron ở các mẫu ung thư da (n=63)	60
Bảng 3.5. Tỷ lệ biến đổi gen <i>TP53</i> của các thể ung thư da	65
Bảng 3.6. Tỷ lệ biến đổi các đoạn gen <i>TP53</i> của từng loại ung thư da	66
Bảng 3.7. Biến đổi ở đoạn IVS1 trong các loại ung thư da	67
Bảng 3.8. Đột biến ở đoạn exon 3.....	68
Bảng 3.9. Đột biến ở đoạn exon 4.....	69
Bảng 3.10. Tỷ lệ đột biến ở đoạn Exon 6.....	69
Bảng 3.11. Biến đổi phối hợp các điểm trên gen <i>TP53</i> ở các loại ung thư da	71
Bảng 3.12. Tỷ lệ biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da.....	74
Bảng 3.13. Tỷ lệ đột biến gen <i>BRAF</i> ở các mẫu ung thư da.....	75
Bảng 3.14. Tỷ lệ biểu lộ protein BRAF(V600E) đột biến ở các mẫu UT da .	78

DANH MỤC HÌNH VẼ

Hình 1.1. Cấu trúc mô học của da [6].....	3
Hình 1.2. Các con đường tín hiệu trong ung thư [27].....	13
Hình 1.3. Con đường tín hiệu RAS/MAPK từ EGFR [27].....	14
Hình 1.4. Sơ đồ vị trí, cấu trúc gen <i>TP53</i> và sơ đồ protein p53	19
Hình 1.5. Vai trò của gen <i>TP53</i> trong chu kỳ tế bào	21
Hình 1.6. Vai trò của gen <i>TP53</i> trong quá trình phân bào [37]	24
Hình 1.7. Tỷ lệ đột biến gen <i>TP53</i> trong một số loại ung thư [48]	26
Hình 1.8. Vị trí gen <i>BRAF</i> trên nhiễm sắc thể số 7 [52].....	28
Hình 1.9. Con đường tín hiệu MAPK.....	32
Hình 1.10. Nguyên lý giải trình tự gen trên máy giải trình tự gen tự động	35
Hình 1.11. Sơ đồ phương pháp hóa mô miễn dịch với phức hợp Avidin - Biotin.....	42
Hình 2.1. Máy đo quang phổ Nanodrop 2000	47
Hình 2.2. Chuẩn bị thạch, điện di DNA và hệ thống UVP chụp ảnh gel sau khi điện di.....	49
Hình 2.3. Máy xác định trình tự gen ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer....	51
Hình 3.1. Sản phẩm PCR được khuếch đại từ exon 2 ÷ 4 (611bp).....	57
Hình 3.2. Sản phẩm PCR được khuếch đại từ exon 5 ÷ 6 (378bp).....	58
Hình 3.3. Sản phẩm PCR được khuếch đại từ exon 7 ÷ 9 (755bp).....	58
Hình 3.4. Biến đổi g.11827G>C ở IVS1.....	61
Hình 3.5. Biến đổi g.11818-11819insC ở IVS1	61
Hình 3.6. Biến đổi g.11874-11875insC ở IVS1	62
Hình 3.7. Đột biến g.12319C>A (c.215C>A) ở exon 3.....	62
Hình 3.8. Đột biến kép g.14060G>T và g.14062C>A.....	63
Hình 3.9. Đột biến g.13150C>T và g.13151C>T (g.13150C>T) ở exon 4	63

Hình 3.10. Biến đổi g.14177G>T ở IVS6.....	64
Hình 3.11. Biến đổi g.14242T>C và 14243T>C (g.14242TT>CC) ở IVS6 ..	64
Hình 3.12. Biến đổi g.14251-14252insG ở IVS6	65
Hình 3.13. Hình ảnh biểu lộ protein p53 âm tính (độ phóng đại 200 lần).....	72
Hình 3.14. Hình ảnh biểu lộ protein p53 dương tính (+) (độ phóng đại 200 lần)	72
Hình 3.15. Hình ảnh biểu lộ protein p53 dương tính (++) (độ phóng đại 200 lần)	73
Hình 3.16. Hình ảnh biểu lộ protein p53 dương tính (+++) (độ phóng đại 200 lần)	73
Hình 3.17. Sản phẩm PCR được khuếch đại từ gen <i>BRAF</i> (171bp).....	75
Hình 3.18. Trình tự ngược chiều (reverse) gen phân tích của các mẫu ung thư da.....	76
Hình 3.19. Hình sắp xếp nucleotid của gen <i>BRAF</i> ở các mẫu ung thư da.....	76
Hình 3.20. Đột biến gen <i>BRAF</i> (V600E) ở bệnh nhân ung thư tế bào hắc tố	77
Hình 3.21. Hình ảnh nhuộm HMMD có kết quả đột biến <i>BRAF</i> (V600E) âm tính (độ phóng đại 200 lần).....	77
Hình 3.22. Hình ảnh nhuộm HMMD có kết quả đột biến <i>BRAF</i> (V600E) dương tính (độ phóng đại 400 lần)	78

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
CDK	Cyclin dependent kinase	Kinase phụ thuộc cyclin
CS		Cộng sự
DNA	Deoxyribonucleic acid	A xít Deoxyribonucleic
DSB	Double strand break	Đứt sợi kép
GF	Growth factor	Yếu tố tăng trưởng
HMMD		Hóa mô miễn dịch
KN		Kháng nguyên
KT		Kháng thể
MPAK	Mitogen Activated Protein Kinase	Con đường tín hiệu protein kinase hoạt hóa phân bào
NST		Nhiễm sắc thể
RNA	Ribonucleic acid	A xít Ribonucleic
SSB	Single strand break	Đứt sợi đơn
TB		Tế bào
TP53	Tumor protein p53	Protein khối u p53
UT		Ung thư
UV	Ultra violet	Tia cực tím

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh ung thư ngày càng có xu hướng gia tăng trong những thập niên gần đây. Theo ước tính của Tổ chức Y tế thế giới, hàng năm trên toàn cầu có khoảng trên 17 triệu người mắc bệnh ung thư và khoảng trên 9 triệu người chết do căn bệnh này [1]. Ở nước ta, theo ghi nhận sơ bộ ở Hà Nội, thành phố Hồ Chí Minh và một số tỉnh thành khác, ước tính mỗi năm có khoảng 150.000 trường hợp mắc mới và khoảng 75.000 người chết vì ung thư. Tuy nhiên, nhiều căn bệnh ung thư vẫn có thể chữa trị được nếu được phát hiện sớm và điều trị kịp thời. Người mắc bệnh ung thư có thể kéo dài thời gian sống, nâng cao chất lượng cuộc sống nếu có được phương pháp điều trị phù hợp và tận gốc [2].

Chính vì thế, việc nghiên cứu tìm hiểu cơ chế bệnh sinh ung thư, cũng như cơ chế ức chế tế bào ung thư phát triển để từ đó tìm ra phương pháp điều trị can thiệp là mối quan tâm hàng đầu của các nhà Y-Sinh học hiện nay. Trong khuynh hướng nghiên cứu về cơ chế bệnh sinh ung thư nói chung và ung thư da nói riêng, các nhà khoa học đi theo hướng tiếp cận chính là nghiên cứu về di truyền phân tử nhằm tìm ra các gen gây ung thư hay các tổn thương của hệ di truyền tế bào do các tác nhân tại chỗ hay các tác nhân bên ngoài. Các tác nhân này được truyền vào trong nhân tế bào thông qua các con đường tín hiệu, qua một loạt phản ứng dây chuyền để tác động lên quá trình sao chép DNA và qua đó tham gia điều hòa sự tăng sinh và biệt hóa tế bào. Một trong những con đường tín hiệu đó là MAPK (mitogen activated protein kinase), cũng trong con đường này các tác giả đã phát hiện được nhiều đột biến đặc biệt là đột biến gen *BRAF*. Đột biến gen *BRAF* đã được phát hiện ở hầu hết các mô ung thư da và có tỷ lệ cao trong ung thư tế bào hắc tố [3], [4], [5], đặc biệt là đột biến *V600E*. Nghiên cứu đột biến gen *BRAF* trong mô ung thư không những góp phần tìm cơ chế gây ung thư mà còn giúp tìm ra liệu pháp điều trị mới, liệu pháp can

thiếp vào con đường dẫn truyền tín hiệu giúp kiểm soát ung thư một cách triệt để hơn.

Trong hàng loạt các tác nhân gây biến đổi làm rối loạn phân bào, tăng sinh không giới hạn và rối loạn biệt hóa tế bào thì cơ thể cũng có những cơ chế bảo vệ chống lại sự rối loạn đó. Một trong các yếu tố đó chính là protein p53 do gen *TP53* mã hóa có hoạt tính chống sự tăng sinh tế bào, sửa chữa các DNA tổn thương, ngăn cản sự đột biến tế bào chống biến chuyển ác tính và trong một số trường hợp gây chết tế bào theo chương trình. Khi có các đột biến xảy ra có thể làm mất chức năng của gen *TP53* làm các tế bào ung thư dễ dàng xuất hiện và phát triển. Nghiên cứu đột biến gen *TP53* và sự biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da sẽ góp phần tìm hiểu cơ chế gây ung thư và giúp các nhà lâm sàng tìm ra được phương pháp điều trị hỗ trợ thích hợp.

Ở Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu về ung thư da, nhưng chưa có công trình nào đi sâu về cơ chế phân tử trong ung thư da. Vì vậy đề tài “**Nghiên cứu các đột biến *TP53*, *BRAF* trong mô ung thư da và mối liên quan của nó với các thể bệnh**” được tiến hành với các mục tiêu sau:

- 1. Xác định tỷ lệ đột biến gen *TP53* và gen *BRAF* trong mô các thể ung thư da.***
- 2. Khảo sát sự biểu lộ protein p53, protein *BRAF* và mối liên quan với các gen đột biến tương ứng trong mô ung thư da.***

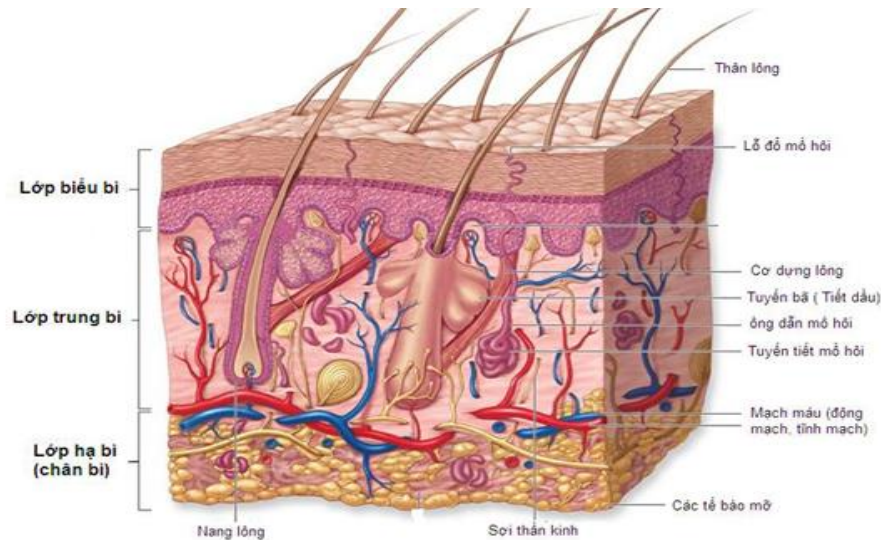
Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÁC THỂ LÂM SÀNG UNG THƯ DA

1.1.1. Cấu trúc da

Da chiếm diện tích trên cơ thể khoảng 2m^2 , với tổng trọng lượng 15-20% trọng lượng cơ thể. Da là hàng rào bảo vệ cơ thể, giúp cơ thể ổn định thân nhiệt, chống mất nước, bảo vệ cơ thể khỏi các tác nhân độc hại của môi trường như vi khuẩn, bụi bẩn, ánh nắng... trong đó quan trọng nhất là bảo vệ cơ thể trước các tác nhân tác động của môi trường bên ngoài [6].



Hình 1.1. Cấu trúc mô học của da [6]

Da bao gồm các lớp thượng bì, trung bì và hạ bì. Thượng bì là biểu mô lát tầng sừng hóa có nguồn gốc từ ngoại bì phôi thai, trong lớp này không có mạch máu nuôi dưỡng.

1.1.1.1. Thượng bì

Các tế bào tạo sừng (keratinocyte) là thành phần chủ yếu tạo nên thượng bì da. Căn cứ vào quá trình biến đổi của các tế bào tạo sừng từ trong ra ngoài, thượng bì da được chia thành 5 lớp:

* **Lớp đáy:** Được tạo bởi một hàng tế bào khối vuông hoặc trụ nằm trên màng đáy, chúng có khả năng sinh sản mạnh, các tế bào mới di chuyển lên các lớp phía trên làm biểu bì luôn được đổi mới.

* **Lớp vảy (lớp sợi hay lớp Malpighi):** Lớp vảy có từ 5-20 hàng tế bào lớn hình đa diện. Giữa các tế bào này có các cầu nối bào tương, ở mức siêu hiển vi, các cầu nối thực chất là những chồi bào tương của các tế bào nằm cạnh nhau được liên kết với nhau bởi các thể liên kết làm cho tế bào có hình vảy hay có sợi nối với nhau.

* **Lớp hạt:** Có từ 3-5 hàng tế bào đa diện dẹt, trong bào tương của các tế bào này chứa nhiều hạt bắt màu kiềm đậm, đó là những hạt keratohyalin. Những hạt này thuộc nhóm protein sợi có liên quan đến hiện tượng sừng hóa của biểu bì.

* **Lớp bóng:** Thường khó quan sát, đó là một lớp mỏng như một đường đồng nhất, sáng. Các tế bào của lớp này dính chặt chẽ, rất mỏng, là những tế bào chết, tất cả các bào quan và nhân đều không còn.

* **Lớp sừng:** Các tế bào biến thành các lá sừng mỏng, không nhân, trong bào tương có chứa nhiều keratin, tùy từng vùng có thể có chiều dày khác nhau.

Lớp thượng bì có nhiệm vụ bảo vệ cơ thể trước những tác động của môi trường ngoài như các tia tử ngoại, các tác động cơ học, ngăn không cho dịch của cơ thể thoát ra ngoài và nước từ môi trường ngoài thấm vào cơ thể. Lớp này còn có khả năng tổng hợp và giải phóng một số cytokin như IL1, IL6, TNF α ...

1.1.1.2. Trung bì

Là một mô liên kết xơ vững chắc có chiều dày thay đổi tùy từng vùng và được phân cách với biểu bì bởi màng đáy, trung bì được chia thành 2 lớp:

* **Lớp nhú:** Mặt ngoài của trung bì tiếp xúc với thượng bì có những chỗ lồi lõm, chỗ lõm về phía thượng bì tạo thành các nhú trung bì. Lớp nhú có nhiều ở những vùng phải chịu áp lực và cọ sát mạnh.

* **Lớp dưới:** Phần chính của trung bì nằm ở phía dưới được tạo bởi mô liên kết đặc hơn, các sợi tạo keo tạo thành bó, đa số có hướng song song với mặt da.

1.1.1.3. Hạ bì

Là mô liên kết thưa, lỏng lẻo nối da với cơ quan bên dưới giúp da trượt được trên các cấu trúc nằm ở dưới. Tùy vùng cơ thể, tùy mức độ nuôi dưỡng mà có thể tạo thành những thùy mỡ hoặc lớp mỡ dày hay mỏng. Ngoài ra da còn có các thành phần phụ như: tuyến mồ hôi, tuyến bã, nang lông...

1.1.2. Dịch tế ung thư da

Ung thư da là một trong những ung thư thường gặp nhất ở Mỹ. Nghiên cứu của Stern R. S. và cs năm 2007 ở Mỹ cho thấy tỷ lệ mắc ung thư da cao gấp 5 lần ung thư vú và ung thư tiền liệt tuyến [7]. Theo Miller D. L. và cs, số bệnh nhân mắc ung thư da ngày một tăng, năm 2002 ước tính có 1,3 triệu người Mỹ mắc ung thư da, trong đó có 53.000 người mắc ung thư tế bào hắc tố và hơn 7.000 người chết vì loại ung thư này [8]. Năm 2006 ước tính có khoảng trên 3,5 triệu bệnh nhân cao gấp gần 3 lần số bệnh nhân năm 2002 [7].

Ở Úc, nghiên cứu của Marks và cs cho thấy ung thư da cao gấp 3 lần tổng số các ung thư khác cộng lại và khoảng 1% dân số bị ung thư da [9]. Trong thời gian 5 năm, ung thư tế bào vảy tăng 50% với tỷ lệ mới mắc từ 166/100.000 dân lên 250/100.000 dân trong nghiên cứu của Gilison và cs [10].

Ở Châu Âu, tỷ lệ ung thư da cũng rất cao, theo nghiên cứu của Bulliard J. L. và cs ở Thụy sỹ mỗi năm có 15.000 bệnh nhân mới mắc ung thư da [11].

Ở Anh, theo nghiên cứu của Muller H. và cs, tỷ lệ mắc ung thư da năm 2010 tăng 33% so với năm 2001 [12]. Do thói quen phơi nắng để có nước da rám nắng cũng như sự tăng cường du lịch đến các nước nhiệt đới về mùa hè của những người da trắng là các yếu tố quan trọng làm gia tăng ung thư da ở người châu Âu.

Người châu Á có tỷ lệ ung thư da thấp hơn người châu Âu, theo nghiên cứu của Sung J. và cs ở Singapore năm 2006 tỷ lệ ung thư da là 7,4/100.000 dân. Tỷ lệ ung thư biểu mô tế bào đáy ở người Trung Quốc là 18,9/100.000 dân, Người Mã lai là 6/100.000 và người Ấn Độ là 4,1/100.000 dân [13].

Ở Việt Nam, ước tính hàng năm có khoảng 8.000 trường hợp mắc ung thư da, trong đó ung thư tế bào đáy là 80%, ung thư tế bào vảy là 15%, ung thư tế bào hắc tố là 4%, còn lại là các ung thư khác ở da [2].

1.1.3. Yếu tố nguy cơ của ung thư da

1.1.3.1. Ánh sáng mặt trời

Ánh sáng mặt trời là nguyên nhân chính gây ung thư da, tia cực tím trong ánh sáng mặt trời gây ung thư da theo 3 cơ chế [14]:

- Tác động trực tiếp lên DNA.
- Tạo ra các phân tử oxy hóa làm biến đổi DNA và cấu trúc các tế bào.
- Ức chế miễn dịch bẩm sinh chống ung thư của cơ thể.

Yếu tố địa dư cũng có mối liên quan chặt chẽ với tỷ lệ ung thư da, những vùng gần đường xích đạo có tỷ lệ ung thư da cao hơn nhiều so với những vùng khác. Theo nghiên cứu của Stone và CS cho thấy tỷ lệ ung thư tế bào đáy ở Hawaii cao gấp 4 lần so với vùng đất liền ở Mỹ [15].

Các nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng ung thư da cho thấy gần 80% ung thư da xuất hiện ở vùng đầu, mặt, cổ, cánh tay và mu tay [12],[16],[17], đây là những vùng da tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời.

1.1.3.2. Asen

Vai trò của asen gây ung thư da ở người còn chưa rõ, tuy nhiên các nghiên cứu trên súc vật cho thấy asen có khả năng gây bệnh. Một số tác giả cho rằng asen là tác nhân điều biến các con đường tín hiệu tế bào, làm biến đổi các yếu tố tăng trưởng và biến đổi quá trình tăng sinh, oxy hóa, biệt hóa tế bào và chết tế bào theo chương trình. Hơn nữa asen có thể làm tăng nguy cơ ung thư bằng cách kích thích khối u phát triển, hoạt hóa các hormon [18]. Hậu quả của nhiễm asen dẫn đến rối loạn chức năng của gen *TP53* và phối hợp với tia UV để tạo thành yếu tố gây ung thư. Theo các tác giả này khi có sự tương tác giữa ánh sáng mặt trời với nhiễm asen mãn tính sẽ làm cho ung thư da phát triển mạnh lên rất nhiều [19].

1.1.3.3. Bức xạ ion hóa

Bức xạ ion hóa có khả năng gây ung thư đã được ghi nhận từ những năm đầu thế kỉ XX khi ung thư da thường xuất hiện ở tay các bác sĩ và kỹ thuật viên có tiếp xúc với tia X. Các nghiên cứu dịch tễ học đã xác định xạ trị cũng làm tăng nguy cơ phát triển ung thư da đặc biệt là ung thư tế bào đáy, xạ trị trứng cá làm tăng nguy cơ ung thư tế bào đáy gấp 3 lần và xạ trị nám da đầu ở trẻ em cũng làm tăng nguy cơ ung thư tế bào đáy từ 4 - 6 lần [19].

1.1.3.4. Yếu tố cá thể

- **Chủng tộc:**

Các chủng tộc người khác nhau có sự lắng đọng melanin trong da khác nhau. Đối với người da trắng, melanin chủ yếu tập trung ở lớp đáy của biểu bì, ở các chủng tộc da màu ngoài tập trung ở lớp đáy melanin, có thể thấy ở cả các lớp trên của thượng bì. Ung thư da có thể gặp ở cả người da trắng và da đen, nhưng tỷ lệ cao hơn ở người da trắng [20],[21],[22]. Một nghiên cứu đa trung tâm ở miền nam châu Âu cho thấy những người có da dễ bị bỏng nắng

và không bao giờ bị râm hoặc những người có tiền sử bỏng nắng khi trẻ được cảnh báo nguy cơ cao mắc ung thư da [23], trong khi những người ở châu Phi, châu Á tỷ lệ ung thư da thấp hơn [24]. Điều này cho thấy, melanin, sắc tố làm cho da sẫm màu có thể bảo vệ da chống lại ung thư da.

- Tuổi và giới:

Nguy cơ ung thư da đều liên quan đến tuổi tác, người lớn tuổi thường dễ mắc ung thư da hơn người trẻ tuổi.

- Yếu tố miễn dịch:

Những ảnh hưởng của yếu tố miễn dịch đến ung thư da chưa rõ ràng, tuy nhiên một số nghiên cứu cho thấy có sự gia tăng ung thư da ở những bệnh nhân ghép tạng và trẻ em điều trị ung thư, bệnh nhân HIV/AIDS [25].

1.1.3.5. Các yếu tố khác

Ngoài ánh sáng mặt trời, yếu tố gen và các yếu tố trên, nhiều nghiên cứu còn đề cập đến các nguyên nhân khác gây ung thư da như tiếp xúc với hóa chất, các chế phẩm nhựa, các vết loét mạn tính, hút thuốc... [24],[25],[26].

1.1.4. Phân loại ung thư da

Ung thư da bao gồm nhiều loại u ác tính khác nhau xuất phát từ da hoặc các thành phần phụ của da. Hiện nay, ung thư da được phân loại như sau:

- Ung thư da không phải ung thư tế bào hắc tố (Non - melanoma skin cancer - NMSC):

+ Ung thư tế bào đáy (Basal cell carcinoma - BCC).

+ Ung thư tế bào vảy (Squamous cell carcinoma - SCC).

+ Ung thư tế bào Merkel.

- Ung thư tế bào hắc tố (Malignant melanoma - MM).

- U lympho ở da.

+ U lympho tế bào T.

+ U lympho tế bào B.

Tuy nhiên, có ba loại ung thư da thường gặp nhất là ung thư biểu mô tế bào đáy, ung thư biểu mô tế bào vảy và ung thư tế bào hắc tố.

1.1.4.1. Ung thư biểu mô tế bào đáy (Basal cell carcinoma -BCC)

Là loại ung thư da hay gặp nhất, chiếm khoảng 75-80% các loại ung thư da. Thương tổn là khối u nhỏ, ở vùng da hở, thâm nhiễm cứng, màu da bình thường hay có hiện tượng tăng sắc tố, có thể loét, dễ chảy máu. Mặc dù tiến triển chậm, nhưng nếu không được chẩn đoán và điều trị sớm, tổ chức ung thư tiếp tục xâm lấn, phá hủy da và tổ chức xung quanh làm biến dạng và làm rối loạn chức năng của một số cơ quan bộ phận, đặc biệt là các hốc tự nhiên như mũi, miệng và mắt. Ung thư biểu mô tế bào đáy tiến triển lâu, gây xâm lấn tổ chức xung quanh. Nếu được phát hiện sớm và điều trị kịp thời cắt bỏ rộng thương tổn, tiên lượng của bệnh rất tốt.

Nguồn gốc thực sự của ung thư tế bào đáy xuất phát từ loại tế bào nào vẫn còn là câu hỏi cần được trả lời. Người ta thấy rằng có sự giống nhau về tế bào học và miễn dịch học giữa các tế bào của ung thư biểu mô tế bào đáy và các tế bào lớp ngoài cùng của nang lông nên nhiều tác giả cho rằng ung thư biểu mô tế bào đáy xuất phát từ nang lông.

1.1.4.2. Ung thư tế bào vảy (Squamous cell carcinoma - SCC)

Là ung thư khởi phát từ tế bào sừng thượng bì của da và niêm mạc. Trong các ung thư da, SCC chiếm khoảng 20% và đứng hàng thứ hai sau ung thư tế bào đáy nhưng SCC xâm lấn và di căn nhiều hơn. SCC chủ yếu liên quan đến vùng da tiếp xúc ánh nắng mạn tính ở người da sáng màu, tuy nhiên có thể thứ phát sau các tổn thương hình thành sẹo (bỏng, loét mạn tính, ...)

hóa chất (arsen, hydro carbon...), nhiễm virus HPV (type 16, 18, 30, 33, 35) và tiếp xúc tia xạ (tia X, tia gamma, tia radium), người suy giảm miễn dịch do bệnh hoặc do thuốc cũng có nguy cơ cao mắc SCC. Đối với vùng sinh dục, ung thư tế bào vảy liên quan trực tiếp đến với chít hẹp bao quy đầu ở nam giới.

1.1.4.3. Ung thư tế bào hắc tố

Ung thư tế bào hắc tố là khối u ác tính của tế bào hắc tố (melanocyte) sản xuất ra sắc tố đen (melanin), tế bào này chủ yếu phân bố ở da, ngoài ra có thể thấy ở mắt, tai, cơ quan tiêu hóa, tế bào não, và niêm mạc miệng, sinh dục.

Ung thư tế bào hắc tố chiếm khoảng 5% các ung thư da; tuy nhiên, đây là khối u gây tử vong cao nhất (75%) trong số các ung thư da trên thế giới. Do vậy, việc chẩn đoán và phát hiện sớm sẽ làm tăng thời gian sống và giảm tỷ lệ tử vong.

1.2. SINH LÝ BỆNH HỌC QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN UNG THƯ DA

1.2.1. Kiểm soát sự phân chia, sinh trưởng của tế bào

Sự phân chia, sinh trưởng của tế bào được kiểm soát bởi nhiều gen thông qua các sản phẩm protein của chúng. Thành phần đầu tiên tham gia kiểm soát là yếu tố sinh trưởng (GF: growth factor), yếu tố này kết hợp với receptor của nó có trên bề mặt tế bào. Phức hợp receptor - yếu tố sinh trưởng gửi những thông tin tới nhân tế bào bằng quá trình chuyển nạp tín hiệu với những protein kinase đặc hiệu. ở trong nhân, chúng tương tác với các yếu tố phiên mã để điều khiển sự hoạt động của các gen đặc hiệu chi phối sự phân chia và sinh trưởng của tế bào.

Chu kỳ tế bào thực hiện qua các pha khác nhau được chi phối bởi các protein, đó là các cyclin, các loại kinase phụ thuộc cyclin (CDK: cyclin

dependent kinase) và các yếu tố ức chế của chúng.

Các CDK có mặt liên tục trong mọi pha của chu kỳ tế bào, nhưng ở dạng không hoạt động. Chúng chỉ hoạt động khi được gắn vào một cyclin tương ứng. Các cyclin chỉ được tổng hợp trong các pha đặc hiệu của chu kỳ tế bào, cyclin có chức năng hoạt hoá CDK tương ứng. Các chất ức chế của chúng làm cho CDK không hoạt động. Các cyclin điều khiển chu kỳ tế bào bằng sự phosphoryl hoá protein đích. Do sự hoạt động của các yếu tố trên nên tế bào dừng lại hoặc chuyển từ giai đoạn này sang giai đoạn khác của chu kỳ tế bào.

Có ít nhất 5 loại cyclin với các định danh là A, B, C, D, E và có ít nhất 7 loại CKD [27],[28].

- Phức hợp Cyclin D - CDK4 làm tế bào chuyển từ G₁ sang pha S.
- Phức hợp Cyclin A- CDK2 làm tế bào chuyển từ pha S sang G₂.
- Phức hợp Cyclin B - CDK1 làm tế bào chuyển từ G₂ sang M (bao gồm các kỳ phân chia chu kỳ tế bào).

Ngoài tính phụ thuộc vào Cyclin, các CDK còn phụ thuộc vào sự kiểm soát của chất ức chế nó là CDKi (cyclin dependent kinase inhibitor). Các CDKi là các protein có trọng lượng phân tử thấp như các protein của gen *p21*, *p27*, *TP53* có tác dụng ức chế không đặc hiệu các CDK hoặc ức chế chọn lọc các phức hợp Cyclin D- CDK4 hoặc CDK6 như các protein p16, p15 và p18.

Các CDKi là các protein được cảm ứng tổng hợp khi có tổn thương DNA (gãy đơn hay gãy kép) có tác dụng ức chế chu kỳ tế bào ở nhiều điểm để sửa chữa các tổn thương DNA. Các CDKi còn được giải phóng khi có mặt các yếu tố ức chế tăng sinh như TGF-beta, trái lại bị ức chế khi có mặt IL2.

1.2.2. Các cơ chế phát sinh ung thư da

1.2.2.1. Mô hình chung của phát sinh ung thư da

Về chi tiết có nhiều cơ chế di truyền phân tử và di truyền tế bào gây phát sinh ung thư. Về nguyên tắc sự phát sinh ung thư trải qua một quá trình nhiều bước đột biến, chọn lọc, tích lũy đột biến và phân hoá các dòng tế bào cho tới khi tạo tế bào ung thư khởi nguồn để tăng sinh tạo dòng tế bào ung thư.

Bước đầu tiên là các tổn thương ở DNA do các yếu tố bên trong (các khiếm khuyết trong tự nhân đôi DNA hoặc trong sửa chữa DNA) hoặc do các tác nhân bên ngoài tác động (như các tia phóng xạ ion hoá, các tác nhân hoá học gây đột biến, một số loại virus...). Tổn thương DNA có thể gây chết tế bào hoặc được sửa chữa lại như bình thường, hoặc tạo thành đột biến nhiễm sắc thể (NST) hoặc đột biến gen. Đột biến này có thể gây chết dòng tế bào này trong chọn lọc (vì kém ưu thế trong cạnh tranh sinh trưởng so với các tế bào bình thường), hoặc tạo dòng tế bào mới có sức sinh trưởng như tế bào bình thường, tồn tại mang một gen hoặc NST “đánh dấu” do kết quả của đột biến. Khả năng thứ ba là tạo ra một tế bào mới với đặc điểm giảm ức chế tiếp xúc, có tính ưu việt chọn lọc, sinh trưởng ưu thế, tăng sinh nhanh hơn các tế bào bình thường. Các tế bào này tiếp tục tích lũy các biến đổi ở DNA, NST gây biến đổi mạnh hình thái và chức năng tế bào, thoát khỏi các tác động bình thường về điều chỉnh kiểm soát tăng sinh. Một số tế bào qua chọn lọc bị đào thải (chết) hoặc ngẫu nhiên dẫn tới dòng tế bào có ưu thế chọn lọc cao hơn nữa, sinh trưởng tăng tiến tạo khối u và phát triển độc lập, không bị kiểm chế, chèn ép, xâm lấn các mô lân cận hoặc di căn.

1.2.2.2. Các con đường tín hiệu trong ung thư da

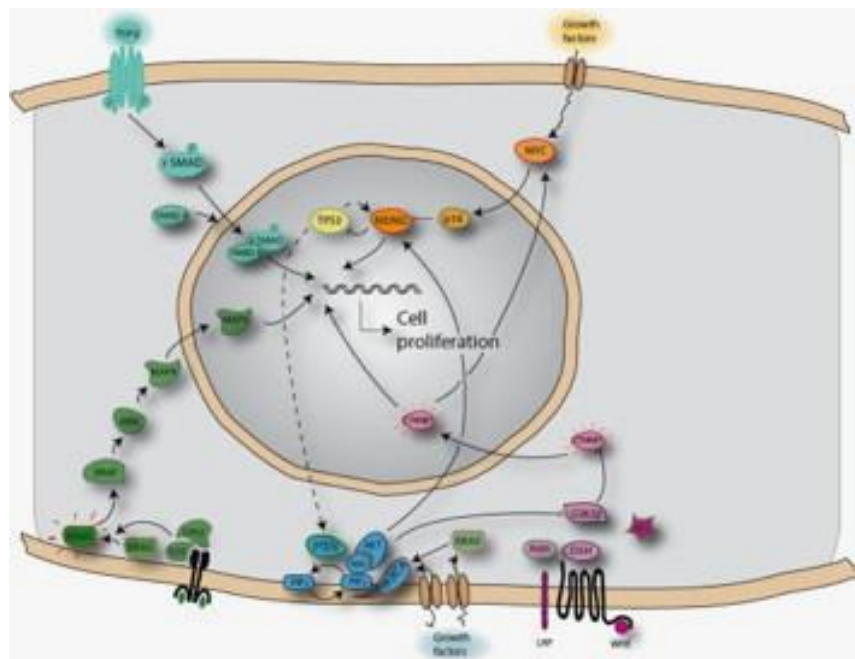
** Con đường tín hiệu từ EGFR trong ung thư da*

Thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR - Epidermal growth factor receptor) có trên bề mặt tế bào có ái lực cao với yếu tố phát triển biểu mô (EGF - Epidermal growth factor). Khi EGF gắn với EGFR sẽ kích hoạt

tyrosine kinase nội bào của thụ thể. Tiếp theo, các tyrosine kinase sẽ khởi động một dòng thác tín hiệu để tác động lên nhiều quá trình hóa sinh trong tế bào như: tăng nồng độ Ca^{2+} nội bào, tăng cường quá trình đường phân và sinh tổng hợp protein, tăng quá trình biểu hiện một số gen kể cả gen mã hóa EGFR, thúc đẩy quá trình tái bản của DNA và quá trình phân chia tế bào [11]. EGFR đã được chứng minh có biểu hiện quá mức ở người bệnh ung thư đại trực tràng và cũng là đích nhắm đến của liệu pháp điều trị bằng kháng thể đơn dòng [27],[28].

* *Con đường tín hiệu Wnt (Wingless-integration)*

Có hơn 20 yếu tố thuộc vào họ gen của yếu tố phát triển Wnt ở người. Đó là các protein có trọng lượng phân tử khoảng 40 kDa. Điểm quyết định của con đường này chính là sự liên kết và hoạt hóa β -catenin. Trong khi chất này bị ức chế bởi hoạt động phối hợp của một số protein gồm APC, axin và GSK3 β . Hoạt động liên tục của con đường này đặc biệt có ý nghĩa trong ung thư đại trực tràng.

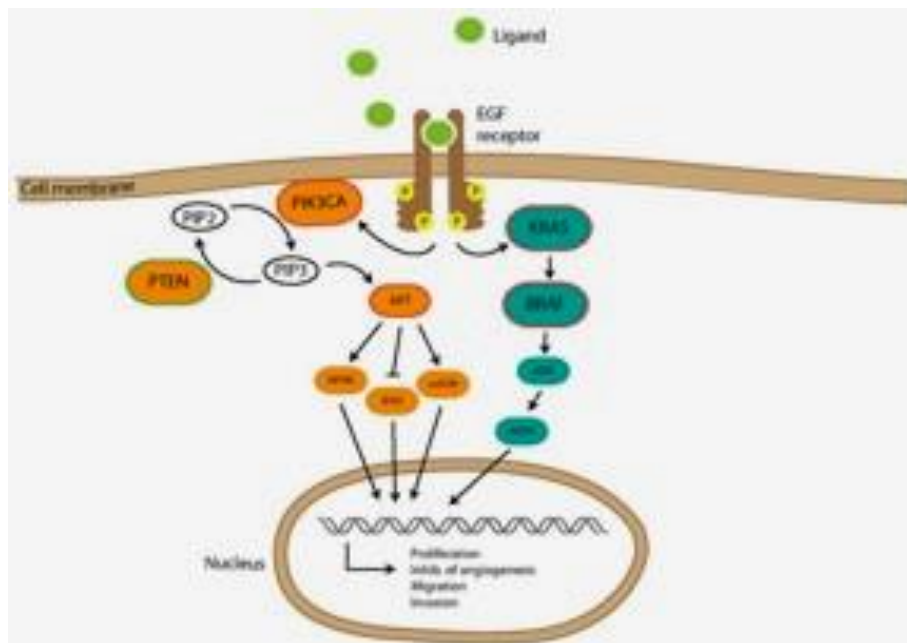


Hình 1.2. Các con đường tín hiệu trong ung thư da [27].

Sự mất điều hòa của con đường Wnt là do mất chức năng của các chất điều hòa âm tính như APC hoặc axin hoặc bởi sự đột biến sinh ung thư hoạt hóa β -catenin. Vì vậy, APC được xem như chất ức chế khối u và chất sinh ung thư [29],[30],[31].

* Con đường tín hiệu ERK/MAPK (*Extracellular regulated kinases/ Mitogen activated protein kinase*)

Con đường ERK/MAPK là một trong những con đường tín hiệu quan trọng nhất cho sự phát triển tế bào. Các con đường MAPK nằm ở hạ lưu của nhiều thụ thể yếu tố tăng trưởng, trong đó có các yếu tố tăng trưởng biểu bì EGFR. Hoạt động quá mức và sự kích hoạt các thụ thể này thường được phát hiện trong ung thư đại trực tràng và cũng đóng một vai trò quan trọng trong sự tiến triển của bệnh ung thư này. Con đường ERK/MAPK có thể được hoạt hóa thông qua protein Ras. Sự hoạt hóa con đường ERK/MAPK là yếu tố quyết định nhất đối với sự kích thích tăng sinh tế bào ung thư song song với sự biến đổi của Ras [27],[32],[33].



Hình 1.3. Con đường tín hiệu RAS/MAPK từ EGFR [27].

* *Con đường tín hiệu phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)*

Enzyme PI3K xúc tác quá trình phosphoryl hóa phosphatidylinositol và các dẫn chất của chất này để tạo ra các chất dẫn truyền thông tin thứ cấp điều hòa các hoạt động của tế bào như quá trình sao chép và sinh tổng hợp protein, quá trình phân chia và chết tế bào... PI3K được hoạt hóa bởi protein Ras, nhưng chính enzyme này cũng có khả năng tác động vào điểm then chốt của các con đường tín hiệu của Ras. Con đường tín hiệu PI3K là con đường tín hiệu ung thư, các chất ức chế con đường này như PTEN chính là chất ức chế khối u [27].

* *Con đường tín hiệu TGF- β (Transforming growth factor - beta)*

Con đường tín hiệu TGF- β kiểm soát sự phân chia, biệt hóa tế bào và thúc đẩy quá trình apoptosis của tế bào bình thường nên được gọi là con đường ức chế khối u. Khi TGF- β bị đột biến, các bộ phận của con đường tín hiệu TGF- β bị biến đổi và mất chức năng, hậu quả là các tế bào ung thư sinh sôi nảy nở. TGF- β còn thúc đẩy tế bào ung thư di căn và kích thích sự hình thành mạch máu của khối u [31],[32]. Đột biến TGF- β xảy ra ở khoảng một phần ba số người bệnh ung thư [34],[35],[36].

1.2.2.3. *Oncogen (gen sinh ung thư hay gen ung thư)*

Đa số oncogen bắt nguồn từ proto - oncogen. Các proto - oncogen là những gen bình thường có mặt trong tế bào mã hoá cho các protein điều chỉnh thuộc hệ thống kích thích sinh trưởng, phân chia và biệt hoá của tế bào. Các protein này có thể là các yếu tố sinh trưởng (growth factor), các receptor của các yếu tố sinh trưởng, các protein chuyên nạp thông tin từ màng vào nhân hoặc các yếu tố sao mã. Khi đột biến xảy ra ở proto - oncogen nó có thể trở thành oncogen. Tác động chung của các oncogen là tạo protein bất thường tác động vào các khâu của quá trình điều chỉnh, để kích thích tăng sinh tế bào

manh mẽ. Các oncogen là trội ở mức tế bào, chỉ một bản copy của một oncogen đột biến góp phần vào dây truyền gồm nhiều bước để hình thành khối u. Trái ngược với các gen ức chế khối u, phát sinh ung thư bằng những đột biến mất chức năng, còn oncogen phát sinh ung thư bằng những đột biến làm thêm chức năng. Hầu hết oncogen tìm thấy ở các khối u không di truyền, nhưng cũng có những đột biến oncogen của tế bào tạo giao tử có di truyền, nhưng không phổ biến.

Bảng 1.1. Một số oncogen thường gặp [37]

Oncogene	Vị trí trên NST	Loại ung thư liên quan
<i>Tác nhân sinh trưởng</i>		
HST	11q13	U dạ dày
SIS	22q12	U não
Receptor tác nhân sinh trưởng		
RET	10q	U nhiều tuyến nội tuyến
Erb.A	17q11	Leukemia
<i>Tín hiệu chuyển nạp</i>		
H.RAS		U đại tràng, phổi, tụy
K.RAS,	11q15	U da, u tuyến giáp, đại
BRAF	12q12	tràng
ABL	7q	U da, tuyến giáp, đại tràng
<i>Tác nhân phiên mã</i>		
N - Myc	9q34	Leukemia
MYB	2p24	U thần kinh, phổi
Fos	6q22	U da, leukemia
	14q24	U xương

Xét về nguồn gốc có thể phân biệt hai nhóm oncogen:

- Oncogen- virus (v - oncogen): Có trong virus mà chủ yếu là virus RNA. Do có enzyme phiên mã ngược nên khi xâm nhập vào tế bào virus tạo ra phân tử lai DNA - RNA từ đó hình thành DNA bổ sung (cDNA) và do vậy

protein được tổng hợp theo mã của virus kích thích phân bào mạnh mẽ, có thể dẫn đến ung thư.

- Oncogen tế bào (c - oncogen).
- Oncogen thường gặp trong các thể ung thư không di truyền.

Do các proto - oncogen bình thường vốn có sẵn trong tế bào bị đột biến tạo thành c - oncogen. C - oncogen hoạt động gây ung thư có thể do những đột biến điểm ở những nucleotid nào đó, hoặc do sự sắp xếp lại của NST tạo “gen lai” hoặc bằng sự khuếch đại của gen. Chuỗi DNA của c -oncogen có trình tự tương tự như oncogen virus tuy nhiên oncogen virus chỉ có exon còn proto - oncogen chứa cả exon và intron. C - oncogen gây tăng sinh tế bào mạnh mẽ bất thường dẫn đến ung thư.

1.2.2.4. Gen sửa chữa DNA

Đa số tế bào phân chia liên tục trong suốt quá trình sống. Sự tái bản DNA một cách chính xác là cần thiết để di truyền bộ gen giống hệt nhau cho mọi thế hệ tế bào trong cơ thể. Mỗi lần phân chia tế bào có khoảng 6 tỉ cặp bazơ nitơ được tổng hợp, kết nối trong một khoảng một thời gian rất ngắn, nên khả năng xảy ra sai sót là rất lớn. Trong quá trình tái bản DNA, nếu có sai sót, thì các sai sót này thường được sửa chữa nhờ hoạt động bình thường của hệ thống gen sửa chữa DNA.

Hoạt động sửa chữa DNA này bị giảm hoặc mất do di truyền hay do đột biến mắc phải của hệ thống gen sửa chữa DNA sẽ làm các sai sót trên DNA không được sửa chữa gây đột biến ở nhiều gen khác nhau, trong đó có các sai sót làm proto-oncogen thành oncogen hay làm gen ức chế khối u bị bất hoạt dẫn tới phát sinh ung thư.

Một số ung thư có tính chất gia đình như ung thư vú, da khô nhiễm sắc tố (Xeroderma pigmentosum) liên quan với bất thường gen sửa chữa DNA.

Trong một số ung thư khác, bất thường DNA biểu hiện ở dạng rối loạn NST (NST bị đứt gãy, lệch bội), ví dụ trong hội chứng Bloom, thiếu máu Fanconi, Atasia- telangiectasia, lơ xê mi, nhiều NST bị đứt gãy.

Bảng 1.2. Một số gen ức chế khối u [37]

<i>Tên gen</i>	<i>Vị trí trên NST</i>	<i>Bệnh do đột biến ở dòng tế bào sinh dục</i>
Rb-1 (Retinoblastoma)	13q14	Ung thư võng mạc Ung thư xương
APC (Adenomatous polyposis coli)	5q21	Polyp gia đình
NF1	17q11	U xơ thần kinh I
NF2 (Neurofibromatosis)	22q12	U xơ thần kinh II
TP53	17p13	H/chứng Li- Fraumeni
P16	9q21	Ung thư da gia đình
BRCA1	17q21	Ung thư vú, ung thư buồng trứng gia đình
BRCA2	13q12	Ung thư vú gia đình

1.2.2.5. Đột biến nhiễm sắc thể gây ung thư

Ngày nay bằng kỹ thuật hiện đại, người ta thấy nhiều bất thường DNA đặc trưng trong lơ xê mi là do bất thường NST tạo gen lai như gen lai ABL/BCR trong lơ xê mi kinh là do chuyển đoạn NST 9 và NST 22. Gen lai AMLI/ETO trong lơ xê mi cấp là do chuyển đoạn NST 8 và NST 21. Các gen lai này tạo sản phẩm protein lai đột biến có tác động kích hoạt phân bào mạnh mẽ gây lơ xê mi.

Một số bệnh có NST không bền vững như hội chứng Fanconi, hội chứng Bloom có tỷ lệ mắc bệnh lơ xê mi cao hơn người bình thường nhiều lần. Có những nghiên cứu còn cho thấy, ngoài lơ xê mi, những bệnh nhân bị

hội chứng Fanconi còn dễ mắc ung thư phổi.

Các nghiên cứu khác cũng cho thấy tia xạ gây đứt gãy NST, đồng thời nhiều thông báo cũng khẳng định tia xạ có vai trò gây lơ xê mi. Những người điều trị bằng tia xạ hay bị nhiễm xạ có tỷ lệ bị bệnh ác tính cao.

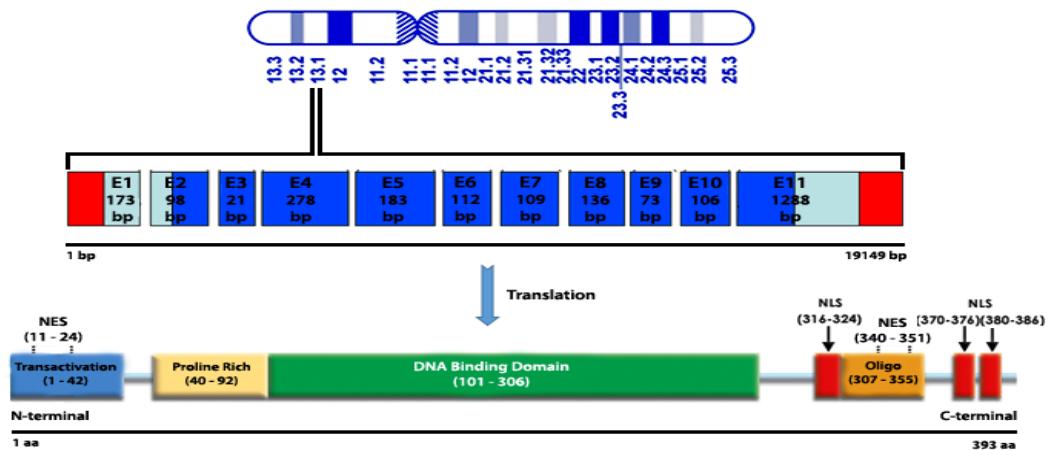
Một số dạng đột biến NST nêu trên đã tạo điều kiện cho các proto-oncogen trở thành dạng oncogen có tính chất gây ung thư. Các đột biến NST về số lượng thường gây mất cân bằng gen (tăng gen sinh u) còn các đột biến cấu trúc NST có thể làm biến đổi đến cấu trúc của các gen tiền sinh u hoặc gen ức chế khối u tạo gen đột biến hoặc gen lai gây tăng sinh hỗn loạn gây u.

1.2.2.6. Ung thư phát sinh do sự tương tác của môi trường và di truyền

Có nhiều dạng ung thư phát sinh có thể được giải thích bằng sự tương tác của di truyền và môi trường, bệnh ung thư vú là một ví dụ. Người ta thấy tỷ lệ mắc ung thư vú có mối liên quan với mọi người trong họ hàng, đồng thời liên quan với sự mãn kinh, với nội tiết tố sinh dục.

1.3. GEN TP53 VÀ UNG THƯ DA

1.3.1. Cấu trúc và sản phẩm của gen TP53



Gen TP53 nằm trên nhánh ngắn của NST số 17 (17p13.1), gen TP53 có kích thước 22.000bp, gồm 11 exon [38].

Hình 1.4. Sơ đồ vị trí, cấu trúc gen TP53 và sơ đồ protein p53

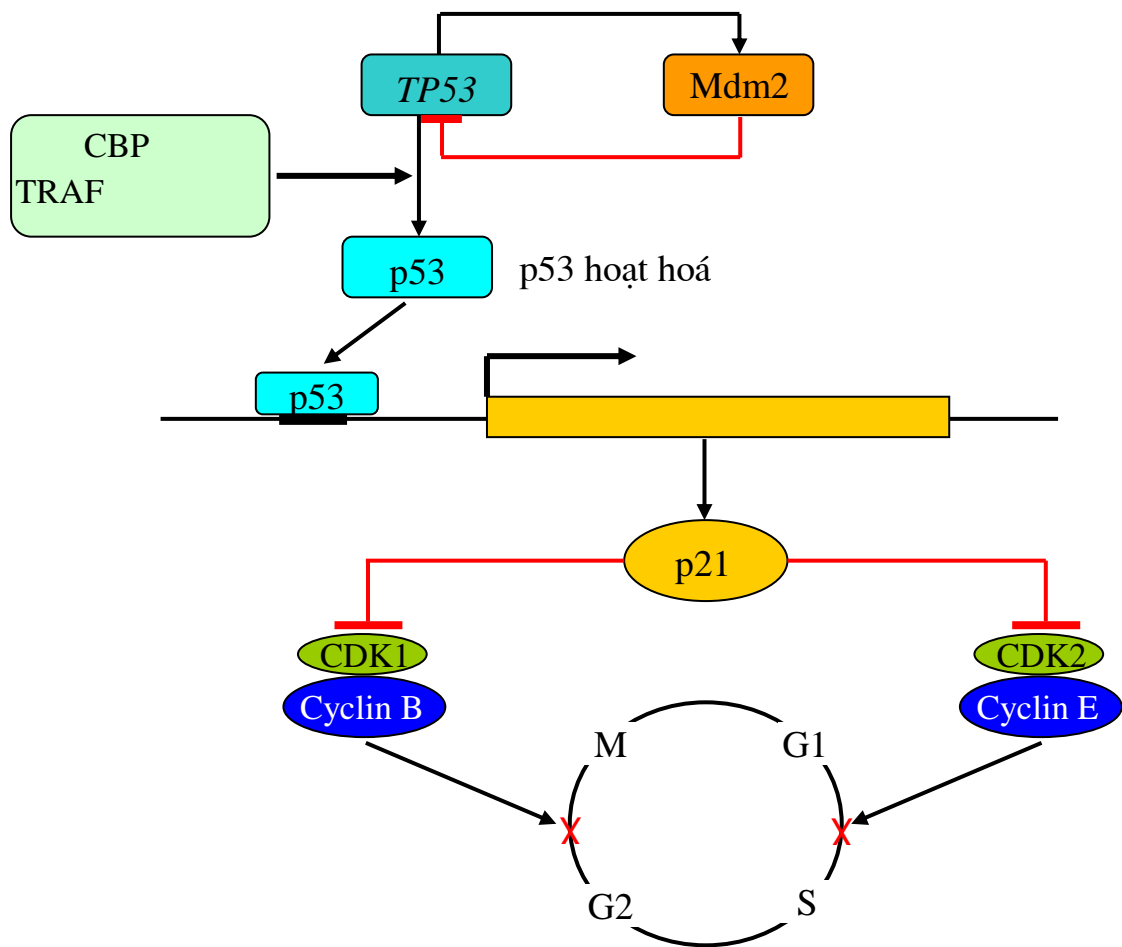
Gen *TP53* còn được gọi là gen ức chế khối u được phát hiện từ năm 1979, nó nằm trên nhánh ngắn thuộc vùng 1, băng 3 băng phụ 1 của NST số 17 (17p13.1). Gen *TP53* có kích thước 22.000bp, gồm 11 exon mã hóa cho protein p53 có trọng lượng phân tử 53kDa.

Bình thường gen *TP53* ở trạng thái không hoạt động. Gen *TP53* được hoạt động khi có sự sai lệch về vật chất di truyền nhằm [38],[39],[40]:

- Chống tăng sinh tế bào, chống tế bào chuyển ác tính bằng kiểm soát chu kỳ tế bào, cảm ứng quá trình chết theo chương trình (apoptosis), có tác dụng sửa chữa các tổn thương DNA, ngăn cản sự xuất hiện đột biến của tế bào.
- Kích thích hoạt tính các gen ức chế ung thư khác, được coi là gen đích của gen *TP53*.

Sản phẩm protein p53 được chọn là phân tử của năm 1993, là chìa khóa di truyền của sự phát triển ung thư. Protein p53 có khả năng hạn chế các đột biến xảy ra ở tế bào thông qua tác dụng của nó trên chu kỳ tế bào.

Cơ chế tác dụng của protein p53 trên chu kỳ tế bào là ức chế chu kỳ tế bào và làm ngừng chu kỳ ở các giai đoạn chuẩn bị G1 chuyển sang S và ở giai đoạn G2 chuyển sang M. Sự kiểm soát chu kỳ tế bào do các protein - kinase đảm nhiệm, đó là các protein - kinase phụ thuộc cyclin, viết tắt là CDK. Cyclin là các protein chi phối hoạt tính của các CDK. Để tế bào đi từ một pha này sang một pha khác tiếp theo thì một CDK nhất thiết phải phối hợp với một cyclin. Muốn chuyển G1 sang S cần phải có phức hợp cyclin E - CDK2, muốn chuyển pha G2 sang M cần có phức hợp cyclin B - CDK1. Các phức hợp bị ức chế bởi các protein p21, sự tổng hợp protein p21 phụ thuộc vào protein p53 gắn vào promoter và khởi động gen đó. Do vậy protein p53 ức chế chu kỳ tế bào thông qua sản phẩm của gen *p21* và một số sản phẩm của gen khác là gen đích của gen *TP53* [29],[38],[39].



Hình 1.5. Vai trò của gen *TP53* trong chu kỳ tế bào

Các thời gian dừng chu kỳ tế bào này là để sửa chữa các tổn thương DNA do các yếu tố vật lý, hóa học, sinh học... gây ra, làm cho tế bào không bị đột biến và được sống sót, không bị tiến triển thành ác tính. Khi tế bào dừng ở giai đoạn G1 sẽ tránh được sự nhân đôi DNA tổn thương, dừng ở G2 tránh được việc duy trì các tế bào có các DNA hư hại không được sửa chữa mà bước ngay vào quá trình phân bào. Gen *TP53* tham gia vào quá trình sửa chữa này bằng cách tăng phiên mã để tổng hợp một số protein có chức năng sửa chữa DNA. Nếu DNA bị tổn thương sửa chữa được thì tế bào được phép thực hiện nốt chu trình của mình. Nhưng vì một số nguyên nhân nào đó mà cơ chế sửa chữa không thành công, thì gen *TP53* sẽ dừng quá trình phân chia của các tế bào đột biến và khởi động quá trình chết theo chương trình (apoptosis).

Như vậy khi một tế bào bị tổn thương DNA nếu không sửa chữa được, thì protein p53 sẽ tác động trực tiếp để đưa tế bào vào giai đoạn chết theo chương trình. Với những chức năng này, gen *TP53* được gọi là “người bảo vệ bộ gen” [29].

Protein p53 cảm ứng cho quá trình chết tế bào theo chương trình (apoptosis): quá trình chết tế bào theo chương trình là hiện tượng quan trọng trong các cơ quan, giữ gìn hằng định số lượng tế bào và giúp phá hủy các tế bào có khả năng gây phản ứng tự miễn. Như vậy, khi thiếu protein p53 hoặc protein p53 bị biến đổi thì hiện tượng chết theo chương trình sẽ giảm, lúc này tế bào có đột biến cũng không chết và hiện tượng tăng phân bào tiếp tục xảy ra đó là cơ chế duy trì các tế bào có đột biến, khi tích lũy thêm các đột biến ở mức độ nhất định sẽ hình thành các tế bào ung thư (có đột biến). Đặc biệt khi cả 2 alen từ bố và mẹ của gen *TP53* bị tổn thương thì sự ức chế tế bào chết theo chương trình càng xảy ra dễ dàng hơn khi chỉ bị tổn thương 1 alen, lúc này tế bào không chết mà cứ tăng phân bào.

Đột biến gen *TP53* là biến đổi di truyền hay gặp trong nhiều loại ung thư ở người, đặc biệt là các loại ung thư như ung thư da, phổi, vú và đại tràng... Các đột biến gen *TP53* hầu hết là đột biến điểm hay gặp ở đoạn exon 5 đến 9, kết quả làm cho protein sản phẩm mất chức năng nhưng nó lại trở nên bền vững hơn và gây tích tụ với một nồng độ cao trong nhân tế bào, tạo ra các sản phẩm gọi là protein p53 đột biến. Trong ung thư da, đột biến thường xảy ra ở exon 5,7 trên các vị trí sau: 175, 177, 248, 282 [40],[41]. Protein p53 làm tăng tính nhạy cảm với xạ trị và có thể cả với hóa trị liệu. Khi thiếu protein p53 hoặc p53 bị đột biến mất chức năng, tế bào sẽ kém nhạy cảm với xạ trị .

* Các loại tổn thương, đột biến hay mất chức năng của gen *TP53* [42]:

Hoạt tính gen *TP53* được thể hiện chức năng của phân tử protein p53

trong dịch sinh học và ở các mô. Các tổn thương gen *TP53* có thể gặp:

+ Đột biến điểm: do chuyển đổi vị trí pyrimidin này bằng pyrimidin khác, hoặc cặp pyrimidin này bằng cặp pyrimidin khác.

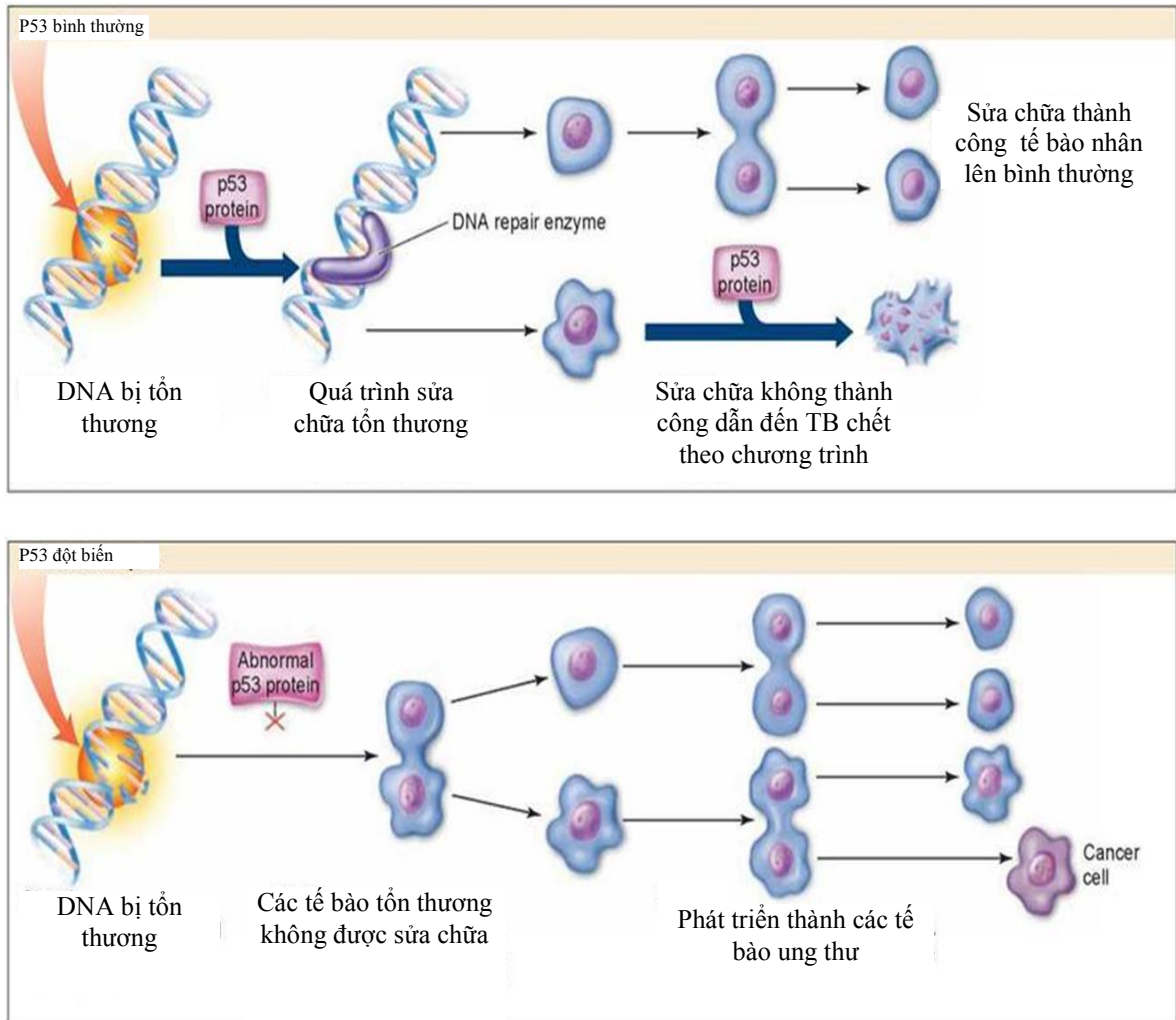
+ Đột biến mất đoạn: do mất các vùng trên nhiễm sắc thể làm bất hoạt, mất gen *TP53*. Biểu hình là mất tính dị hợp tử (LOH: loss of heterozygosity) do mất đoạn nhiễm sắc thể chứa gen *TP53* ở một trong hai NST tương đồng gây ra mất một trong hai alen của tế bào. Tuy nhiên, trong ung thư tế bào đáy thì tần suất mất tính dị hợp tử thấp hơn so với các ung thư khác [43],[44].

1.3.2. Vai trò của gen TP53 trong cơ chế bệnh sinh ung thư da

Quá trình chết tế bào theo chương trình là tiến trình thầm lặng và còn chưa biết đầy đủ. Chết tế bào theo chương trình là một hiện tượng cơ bản của sự sống ở cơ thể đa bào. Nó liên quan đến quá trình phát triển của phôi và liên quan đến khả năng giữ hằng định nội môi của cơ thể trưởng thành (cân bằng giữa tái sinh, tăng sinh và chết) đặc biệt đối với các tổ chức thường xuyên đổi mới như hệ thống miễn dịch. Quá trình chết tế bào theo chương trình do nhiều gen điều khiển và kiểm soát. Một điều kiện trong xuất hiện và phát triển ung thư là tế bào mất cảm ứng với chết tế bào theo chương trình. Quá trình chết tế bào theo chương trình có thể xảy ra như sau [40],[41]:

- Các kích thích từ bên ngoài (exogenous) như các hormon, thuốc điều trị, tia cực tím,... sẽ làm các chemokine hoạt hóa một receptor trên tế bào thuộc tuýp receptor APO-1 và Fas (tên khác của Fas là CD95 hay receptor của TNF). Tín hiệu này sẽ truyền đến một loại protein có tương tác vật lý với receptor đó ở domain gây chết (death domain - DD hay dead effector domain - DED) làm hoạt hóa một dây chuyền nhiều protease gây phân rã cystein, có tên gọi là caspase. Các caspase đầu tiên của chuỗi caspase (ICE/caspase 1, CPP31/caspase 3) sẽ gây phân rã một loạt các protein cấu trúc tế bào hay các

protein kiểm soát chu kỳ tế bào (pRb) hay các enzyme sửa chữa thương tổn ở DNA, protein của RNA thông tin trưởng thành làm cho các tế bào chết.



Hình 1.6. Vai trò của gen *TP53* trong quá trình phân bào [37]

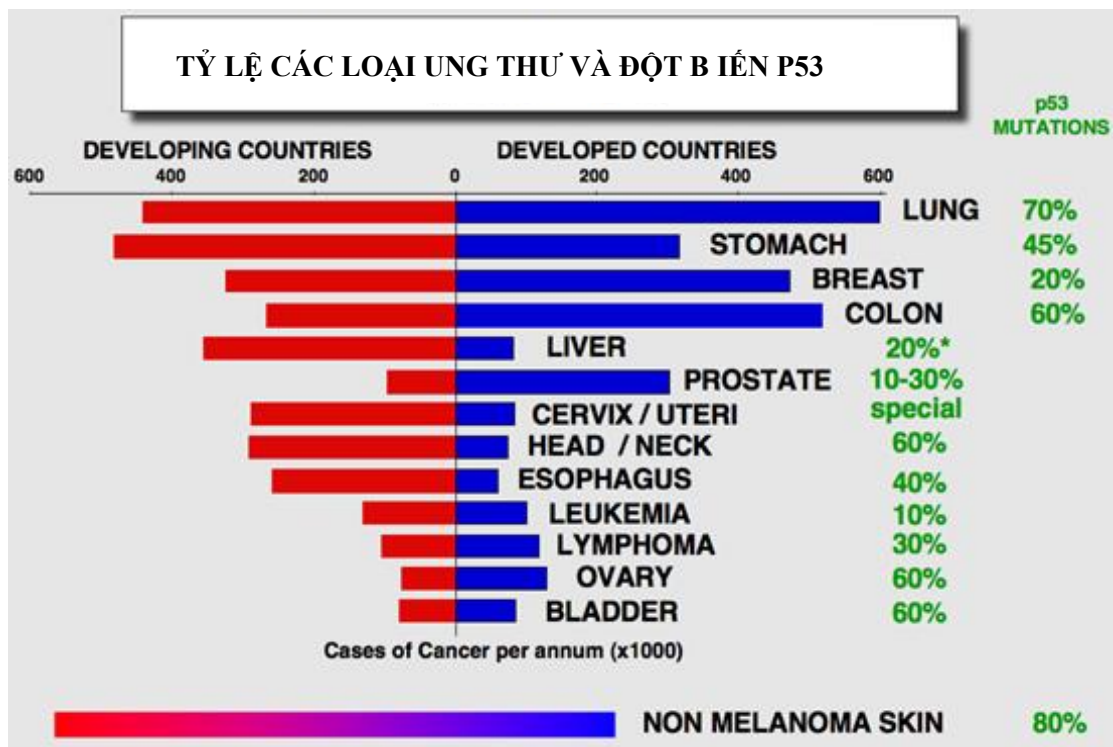
- Yếu tố kích thích nội sinh (endogenous) là gen *TP53*. Protein p53 xuất hiện khi có tổn thương DNA ở dạng đứt sợi đơn (SSB: single strand break) hay đứt sợi kép (DSB: double strand break) hay khi sai lệch về cấu trúc DNA. Protein p53 hoạt hóa trực tiếp chết tế bào theo chương trình hay gián tiếp thông qua các sản phẩm của gen Bcl-2 và Bax. Ngoài gen *TP53*, các SSB và DSB còn giải phóng ra topoisomerase I và II. Các topoisomerase của DNA được xem như là: “trạm gác khu vực” của bộ gen có trong một tế bào dù là bình thường hay ác tính. Các topoisomerase tách đôi sợi xoắn kép của DNA để sao chép

hay sửa chữa tổn thương DNA bằng cách làm gãy sợi DNA (topoisomerase tuýp I làm gãy một sợi, tuýp II làm gãy 2 sợi) nên rất cần cho sự phân bào. Khi thiếu các topoisomerase, đặc biệt là tuýp II thì các nhiễm sắc thể không phân ly được, tế bào không phân bào được, dễ bị chết nhất là khi có tác động của kháng sinh và các thuốc gây độc tế bào (thuốc chống ung thư).

Sự hằng định nội môi là do sự cân bằng giữa số lượng tế bào mới tái sinh và số tế bào già chết đi. Có nhiều nguyên nhân và cơ chế gây chết tế bào. Có thể các tế bào chết do các telomere (6 nucleotid cuối cùng của nhiễm sắc thể làm cho các đầu mút nhiễm sắc thể không dính vào nhau được) nên không bảo vệ được tính toàn vẹn trong nhân đôi DNA. Một số chết tế bào do thiếu oxy, do tác dụng nhiệt độ không thuận lợi cho sự sống của tế bào, do oxy hóa, do tia cực tím gây các tổn thương DNA quá lớn vượt quá khả năng sửa chữa của tế bào.

1.3.3. Các đột biến gen TP53 trong ung thư da

Ý nghĩa của gen *TP53* trong ung thư nói chung và ung thư da nói riêng vẫn đang được các nhà khoa học trên thế giới tiếp tục nghiên cứu. Tuy nhiên, các nghiên cứu đã chứng minh rằng gen *TP53* ức chế sự phát triển của ung thư, mã hóa cho protein p53 của nhân tế bào, điều hòa sự sinh sản và chết tế bào theo chương trình, ngăn ngừa đột biến DNA... Đột biến gen *TP53* là biến đổi di truyền thường gặp nhất trong các ung thư ở người. Do gen *TP53* điều hòa sự ổn định của bộ gen và ngăn cản tế bào bước vào chu trình phân bào khi có tổn thương DNA nên khi *TP53* bị đột biến, mất chức năng sẽ liên quan đến khả năng ức chế sự phát triển tế bào, do đó sẽ tăng tỷ lệ tế bào sinh sản bất thường [45],[46],[47].



Hình 1.7. Tỷ lệ đột biến gen *TP53* trong một số loại ung thư [48]

Đột biến gen *TP53* là biến đổi di truyền hay gặp trong nhiều loại ung thư ở người, đặc biệt là các loại ung thư da, phổi, vú và đại tràng... Các đột biến hầu hết là đột biến điểm trong vùng từ exon 2 đến 9, kết quả làm cho sản phẩm protein p53 mất chức năng, và nó trở nên bền vững hơn, gây tích tụ với một nồng độ cao trong nhân tế bào, tạo ra các sản phẩm gọi là protein p53 đột biến. Ở ung thư da đột biến thường xảy ra ở exon 2 đến exon 9 trên các vị trí sau: 175, 177, 248, 282 [35]. Khi tổn thương cả hai alen của gen *TP53* thì DNA trong tế bào bị tổn thương sẽ không được sửa chữa, các đột biến còn tồn tại nhiều hơn khi chỉ tổn thương một alen và dẫn tế bào đến trạng thái chuyển dạng ác tính dễ dàng hơn.

P53 là một protein nội bào nên nó được tìm thấy nhiều nhất ở các mô, nhưng cũng có thể gặp trong huyết thanh với nồng độ thấp (do thời gian bán hủy của protein p53 bình thường chỉ trong 20- 40 phút). Dựa vào nguyên lý của sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể, người ta có thể xác định được các protein p53 có trong huyết thanh bằng kỹ thuật miễn dịch đánh dấu enzyme

và protein p53 trong mô bằng kỹ thuật nhuộm HMMD. Khi gen *TP53* bị đột biến dẫn đến protein của gen *TP53* bị biến đổi thì nồng độ protein này tại mô có thể tăng cao đồng thời protein biến đổi có thời gian bán hủy kéo dài hơn và protein biến đổi này cũng được phát hiện bằng kỹ thuật nhuộm HMMD.

Bệnh nhân ung thư da có đột biến gen *TP53* liên quan đến giảm tỷ lệ sống thêm không tái phát và tỷ lệ sống thêm chung. Gen *TP53* được coi là yếu tố tiên lượng độc lập về tỷ lệ sống thêm trong ung thư da.

Protein p53 làm tăng tính nhạy cảm với xạ trị. Thiếu protein p53 làm tế bào trở với xạ vì tế bào không dừng ở G1. Tuy nhiên nhạy cảm với xạ trị và hoá trị còn phụ thuộc nhiều protein khác nữa như pRb, oncoprotein...

Trên thế giới nghiên cứu đột biến gen *TP53* và sự biểu lộ protein p53 trong mô ung thư da cũng đã được nhiều tác giả quan tâm. Venza M. và cs cho rằng sự biểu lộ protein p53 ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào vảy là 46,7% và không có sự khác biệt giữa ung thư da nguyên phát và ung thư da tái phát có di căn [49]. Bukhari M. H. và cs xác định đột biến gen *TP53* và biểu lộ protein p53 đột biến ở 140 mẫu mô sinh thiết da cho thấy: cả hai dấu hiệu trên đều không phát hiện được trên da bình thường, nhưng trong ung thư tế bào đáy là 70% và trong ung thư tế bào vảy là 96,25% và đột biến gen *TP53* có liên quan đến sự biểu lộ protein đột biến với [50]. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Mlmquist L. M. và cs cho thấy có mối liên quan giữa đột biến gen *TP53* và sự biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da [51]. Như vậy protein p53 là một yếu tố quan trọng trong theo dõi, tiên lượng ung thư da. Những trường hợp đột biến gen *TP53* thường có đáp ứng kém với điều trị hoá chất, do đó xác định tình trạng biểu lộ protein này được dùng để đánh giá khả năng đáp ứng với hoá chất và tia xạ trong điều trị.

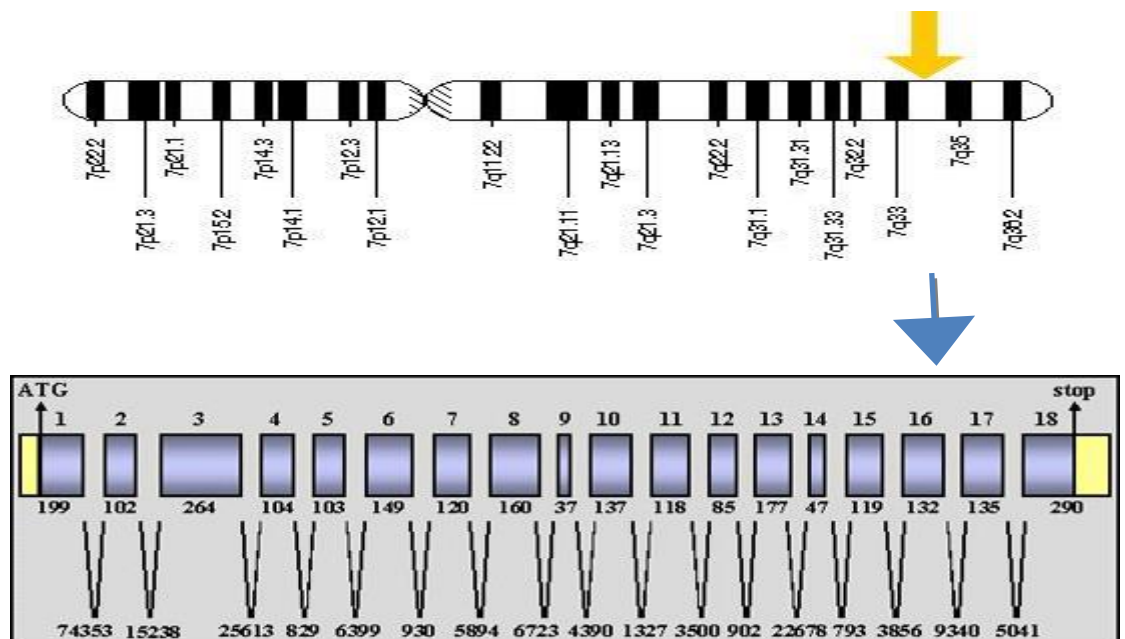
Ở Việt Nam cũng có một số tác giả nghiên cứu sự biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư như kết quả nghiên cứu của Tạ Văn Tờ cho thấy tỷ lệ protein p53 dương tính trong mô ung thư biểu mô tuyến vú là 42,1%

(n=95) và sự biểu lộ này tăng dần theo độ mô học [46]. Trong ung thư da, đã có một số nghiên cứu đi sâu vào cơ chế phân tử nói chung và đột biến gen *TP53*, nhưng chưa có nghiên cứu nào xác định sự biểu lộ của protein đột biến này ở mô ung thư. Việc tìm hiểu mối liên quan giữa đột biến gen *TP53* và sự biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư là cần thiết, kết quả đó sẽ giúp các nhà lâm sàng có thể xác định đột biến gen *TP53* phức tạp bằng kỹ thuật đơn giản hơn. Đó là kỹ thuật xác định sự biểu lộ protein p53 đột biến bằng phương pháp hóa mô miễn dịch, đây cũng là xét nghiệm dễ làm hơn và cho phép phát hiện sự tích lũy bất thường của protein p53 trong tế bào ung thư. Kích thích hoạt tính các gen ức chế ung thư khác, được coi là gen đích của gen *TP53*.

1.4. GEN *BRAF* VÀ UNG THƯ DA

1.4.1. Cấu trúc gen *BRAF*

Gen *BRAF* gồm 18 exon có 208.816 bp nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 7 vị trí 7q34 [52].



Gen BRAF gồm 18 exon có 208.816 bp
nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 7q34.

Hình 1.8. Vị trí gen *BRAF* trên nhiễm sắc thể số 7 [52].

Gen *BRAF* được xem như là một gen tiền ung thư, gen mã hóa thông tin cho protein BRAF có trọng lượng phân tử 94 kDa là chất có hoạt tính kinase với chức năng truyền tín hiệu nội bào xuôi dòng phía dưới protein KRAS của con đường tín hiệu RAS-MAPK [48]. Protein BRAF tương tác đặc hiệu với Serine/ Threonine điều hòa thông qua các tín hiệu dẫn truyền. Nó bao gồm 3 vùng bảo thủ đặc trưng của họ Raf-kinase: vùng tự điều hòa CR1- vị trí liên kết giữa Ras với GTP, vùng giàu Serine CR2, vùng (chức năng) xúc tác CR3-phosphoryl trình tự đặc hiệu trên protein cơ chất. Khi hoạt động chức năng/ ở trạng thái hoạt hóa, BRAF tạo ra các dimer bằng liên kết hidro và tương tác tĩnh điện giữa các miền kinase của nó.

1.4.2. Gen BRAF và con đường tín hiệu sinh ung thư

Sự phát triển, biệt hóa và sống còn của tế bào bình thường được điều hòa bởi một số lượng giới hạn các con đường tín hiệu. Các con đường tín hiệu truyền và kết hợp các tín hiệu từ ngoại bào như: các yếu tố phát triển, hormon, các liên kết tế bào - tế bào, tế bào - khoảng gian bào thông qua các thụ thể trên màng tế bào đi vào bên trong tế bào, rồi tiếp tục qua các protein dẫn truyền trong bào tương để đi vào nhân tế bào. Ở trong tế bào các tín hiệu này sẽ hoạt hóa các gen sao chép dẫn đến sự tăng sinh và biệt hóa tế bào. Các loại protein tín hiệu, protein màng, protein bào tương và protein nhân liên quan đến tăng sinh, biệt hóa tế bào đều là sản phẩm của c-oncogen (proto-oncogen) trong điều kiện bình thường. Khi có sự mất điều hòa hoạt động của chúng, các c-oncogen đột biến trở thành oncogen có thể xuất hiện ung thư và trong tình huống này con đường tín hiệu sẽ trở thành “con đường tín hiệu sinh ung thư”.

Sự mất cân bằng giữa oncogen và gen ức chế ung thư, sự hoạt động không phù hợp hoặc sự bất hoạt của các con đường tín hiệu là yếu tố quyết định đối với sự phát triển ung thư ở người. Nhiều gen sinh ung thư và nhiều gen ức chế ung thư cũng hoạt động trong khuôn khổ “con đường tín hiệu sinh

ung thư” này [53],[54].

Các con đường tín hiệu có thể được khái quát như sau:

- Các tín hiệu ngoại bào (GF, cytokine, hormon...).
- Các tín hiệu ở màng tế bào (thụ thể màng tế bào).
- Các tín hiệu ở bào tương (RAS, RAF, ERK, của con đường MAPK...).
- Các tín hiệu trong nhân tế bào (Jun, Myc...).

Trong khuôn khổ của đề tài này chúng tôi chỉ đề cập đến yếu tố RAF do gen *BRAF* mã hóa tham gia vào con đường tín hiệu MAPK.

1.4.2.1. Quá trình hoạt động của con đường tín hiệu MAPK

Con đường dẫn truyền tín hiệu RAF-MEK-ERK là dòng thác protein kinase được hoạt hóa bởi RAS. Con đường này điều hòa sự phát triển, tăng sinh và biệt hóa tế bào đáp ứng với những kích thích từ các yếu tố phát triển, kháng thể, cytokine và hormone... [55]. Qua con đường này, RAS được cho là để thúc đẩy sự thay đổi về khung và hình dạng tế bào, sự kết dính và di chuyển tế bào. Điều đó được thể hiện phổ biến ở các tế bào với RAS sinh ung thư [56],[57],[58]. Sự biến đổi RAS trong ung thư là do chức năng điều hòa nút của nó ở một số con đường liên quan với các đặc tính thiết yếu của tế bào ung thư. Trong số các tác dụng khác nhau này sự hoạt hóa con đường ERK MPK là quyết định nhất đối với sự kích thích tăng sinh tế bào ung thư cùng với sự biến đổi về RAS. Một trong các lý luận của nguyên lý này chính là sự biến đổi loại trừ lẫn nhau của gen *RAS* và *BRAF* trong một số ung thư, nổi bật là trong u hắc tố [59].

Trong hoạt tính chuyển dạng của gen ung thư nguồn gốc virus (v-oncogen) thì RAS và RAF là các yếu tố được đề cập đến nhiều trong các nghiên cứu và chính RAF là yếu tố hiệu ứng đầu tiên được xác định của dòng tín hiệu được hoạt hóa từ RAS [60],[61],[62],[63].

Hoạt hóa RAF được khởi đầu bởi sự kết hợp RAS-GTP với vùng gắn

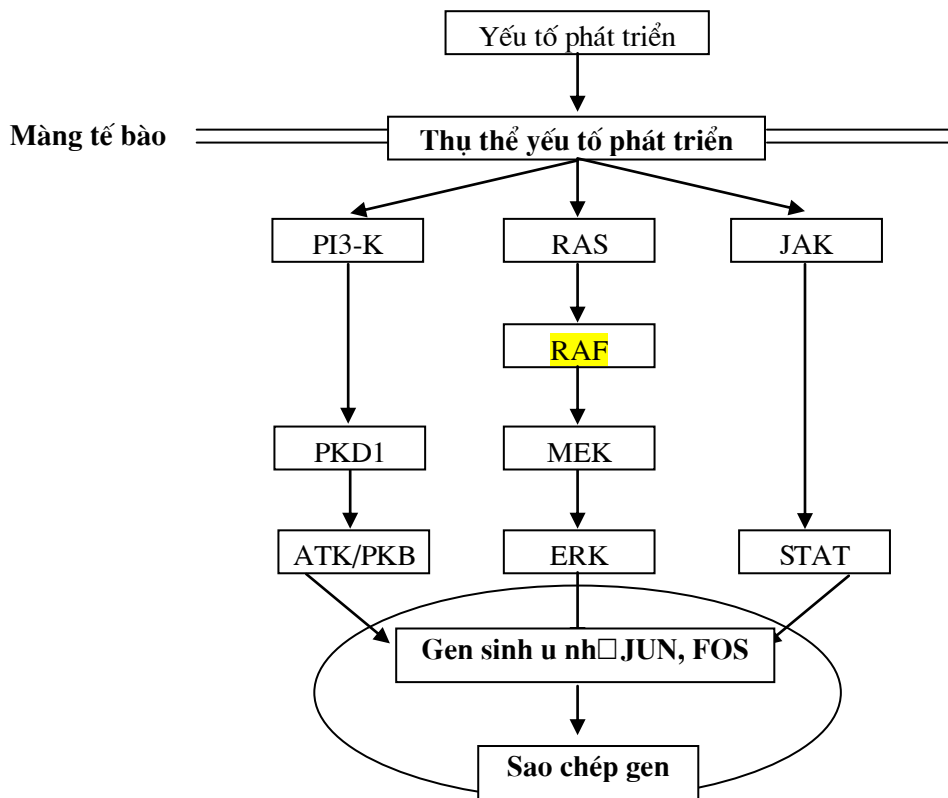
RAS (RBD: RAS binding domain) nằm trong khu vực điều hòa N tận của kinase. Sự thay đổi thích ứng và sự kết hợp lên màng tế bào làm khởi động quá trình phosphoryl hóa RAF, điều đó kết hợp với việc kích thích hoạt tính serine/threonine/kinase của RAF gây phosphoryl hóa liên tục và gây hoạt hóa MEK và ERK [62],[63]. Ba protein RAF có chức năng ở người là ARAF, BRAF và CRAF hoạt động phụ thuộc vào sự phosphoryl hóa của đoạn mang hoạt tính [64]. Mọi thông tin liên lạc giữa RAF, MEK và ERK cần có protein kết nối, đó là một đồng dạng của RAF không có hoạt tính kinase [61].

MAPK tạo tín hiệu qua bào tương vào nhân và nhân kích thích các yếu tố điều khiển các tế bào ở trạng thái nghỉ trở thành tế bào ở trạng thái phân bào. Trong nhân tế bào, hai phân tử rất quan trọng để điều khiển sự phát triển tế bào qua các giai đoạn phân chia tế bào là các cyclin và các enzyme hoạt hóa phụ thuộc cyclin (CDKS: Cyclin Dependent Kinases). Nếu không có các cyclin thì các CDKS không hoạt động được. Tuy nhiên, cần phải có các CDKS thì các cyclin mới làm cho các tế bào từ trạng thái nghỉ trở nên hoạt động và vì thế hoạt hóa quá trình phân chia tế bào. Một trong những cyclin rất quan trọng này là cyclin D. Nó đóng vai trò quan trọng đặc biệt trong tiến trình phân chia tế bào [65]. Sự kết hợp của cyclin D hình thành bước cuối cùng trong con đường liên kết hoạt hóa thụ thể yếu tố phát triển biểu mô và phân chia tế bào. Khi MAPK đi vào trong nhân tế bào, nó gây kết hợp cyclin D và tác động lên “chất kìm hãm sinh học” và khi sự kìm hãm sinh học bị bất hoạt thì tế bào buộc phải vận chuyển sang trạng thái phân chia hoạt động [66].

1.4.2.2. Vai trò con đường tín hiệu MAPK trong ung thư

Sự hoạt hóa liên tục của con đường tín hiệu RAS-MEK-ERK là phổ biến với nhiều loại ung thư. Xấp xỉ 15% ung thư ở người có sự biến đổi hoạt động của RAS và biến đổi BRAF gần đây được xác định qua sàng lọc trên phạm vi rộng của gen đột biến trong ung thư ở người [67],[68],[69]. Đột biến của BRAF liên quan đến 60% các khối u hắc tố ác tính và xảy ra với tần suất

từ vừa đến cao ở ung thư biểu mô đại trực tràng, ung thư biểu mô buồng trứng [70], ung thư phổi và ung thư biểu mô tuyến giáp thể nhú [71]. Điều đó có gợi ý rằng việc hoạt hóa biến đổi gen sinh ung thư *BRAF* như là yếu tố khởi động chủ chốt của khối u ác tính. Sự biến đổi *BRAF* và *RAS* được giới hạn một cách có ý nghĩa với các loại u tương tự và thông thường là theo cách loại trừ lẫn nhau. Điều này cho phép các tác giả nghĩ rằng các gen này cùng trên một con đường tín hiệu sinh ung thư với nhau; đồng thời cũng gợi ý rằng *RAS* tác động gây hoạt hóa *BRAF* ở các loại hình ung thư này [72].



Hình 1.9. Con đường tín hiệu MAPK [66]

Sự hoạt hóa con đường JNK MAPK (JNK: Jun kinase N tận - một con đường thành viên khác trong con đường tín hiệu MAPK) bởi *RAS* là một khía cạnh khác trong chức năng đa chiều của protein này. Sự tăng cường hoạt hóa của protein *RAS* ở tế bào bình thường có thể gây ngừng phát triển, chết theo

chương trình hoặc suy yếu sự sao chép tế bào. Ở một số loại tế bào, sự hoạt hóa RAS cũng có thể gây biệt hóa tế bào. Chính vì thế, ngoài tác dụng tăng sinh tế bào, các protein RAS ở trạng thái hoạt hóa còn kích thích các đáp ứng khác, thậm chí cả việc chấm dứt tác dụng của chúng. Trong một vài trường hợp, nó còn tạo ra phản ứng bảo đảm an toàn chống lại sự tăng sinh quá mức. Tùy theo tình huống mà con đường JNK MAPK có thể hoạt động theo cách thức này [66],[67].

Như vậy khi các thụ thể yếu tố phát triển trên màng tế bào được hoạt hoá thì các protein RAS, RAF sẽ hoạt hóa hầu như liên tục, chúng làm trung gian cho nhiều hiệu ứng của hoạt động sinh lý hoặc là hoạt động sinh ung thư của các thụ thể tyrosin kinase (RTK), đặc biệt là hoạt động của con đường MAPK theo chiều của protein RAS, RAF. Thực vậy, protein RAS, RAF làm trung gian không những cho các tín hiệu qua thụ thể tyrosin kinase mà còn liên quan đến việc đáp ứng của tế bào với các cytokin và hormon. Ngược lại thụ thể tyrosin kinase và các yếu tố khác điều chỉnh hoạt động của MAPK và các con đường ung thư khác nữa không chỉ thông qua RAS, RAF mà còn qua nhiều cơ chế khác nhau [72],[73].

1.4.2.3. Đột biến gen BRAF trong ung thư da

Yếu tố tín hiệu RAF thuộc con đường tín hiệu MAPK có ba đồng dạng là ARAF, BRAF và CRAF. Đồng dạng CRAF biểu lộ khắp nơi trong khi BRAF biểu lộ ở mức cao hơn trong tế bào máu, thần kinh và tinh hoàn [74],[75], BRAF là đồng dạng nổi trội ở tế bào da. Mặc dù tất cả các đồng dạng RAF đều hoạt hoá MEK nhưng chúng được hoạt hoá một cách khác nhau bởi RAS [76],[77]. Theo Peyssonnaud C. và cs thì BRAF có ái tính cao hơn với MEK1 và MEK2 và có nhiều khả năng phosphoryl hóa MEK hơn các đồng dạng RAF khác [57]. Theo Paul T.C. và cs đã khám phá rằng biến đổi hoạt tính gen sinh ung thư BRAF xảy ra ở 2/3 các u hắc tố ác tính và ở tần suất cao trong các ung thư khác [36].

Đột biến gen *BRAF* trong ung thư nói chung và ung thư da nói riêng thường xảy ra ở vị trí: A1023G (P341P); A1227G (S409S); T1799A (V600E); A1383G (Q461Q); A1797C (T599T); A1929G (G643G); G2272A (G758R). Trong đó vị trí 1799 T→A làm thay thế Valine bằng Glutamate của chuỗi acid amin (V600E) chiếm khoảng 80 - 90%. 70% đột biến gen *BRAF* được tìm thấy ở những bệnh nhân ung thư da [72]. Sự thay đổi này dẫn đến con đường tín hiệu MAPK bị kích hoạt liên tục, và không đáp ứng với sự kiểm soát thông thường. Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng tập trung nghiên cứu đột biến gen *BRAF* (V600E), là đột biến xảy ra với tần suất cao trong mô ung thư da.

Sự biến đổi gen *BRAF* có thể minh chứng rằng BRAF là dấu ấn quan trọng của kiểu hình lâm sàng và mô bệnh học của ung thư da, đặc biệt là ung thư tế bào hắc tố, nó trở thành một dấu ấn chẩn đoán và tiên lượng có giá trị, dựa vào việc sử dụng các chất ức chế protein BRAF [72],[74]. Nghiên cứu này sẽ góp phần vào việc xác định đột biến của gen *BRAF* ở bệnh nhân ung thư da tại Việt Nam, từ đó giúp các bác sỹ lâm sàng lựa chọn phương pháp điều trị hỗ trợ thích hợp cho các bệnh nhân ung thư da, nhằm cải thiện thời gian sống thêm của bệnh nhân.

1.5. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN *TP53* VÀ GEN *BRAF*

1.5.1. Phương pháp giải trình tự gen

1.5.1.1. Phương pháp giải trình tự gen Sanger

Giải trình tự của gen là xác định được thứ tự sắp xếp của 4 loại nucleotide trên phân tử DNA của đoạn gen đó. Hiện nay, trong lĩnh vực sinh học nói chung và sinh học phân tử nói riêng thì việc giải trình tự nucleotide của một đoạn gen được ứng dụng nhiều trong việc xác định các gen, các alen, các đột biến gen. Từ những năm 1977 một số phương pháp giải trình tự gen đã được phát minh như [78]:

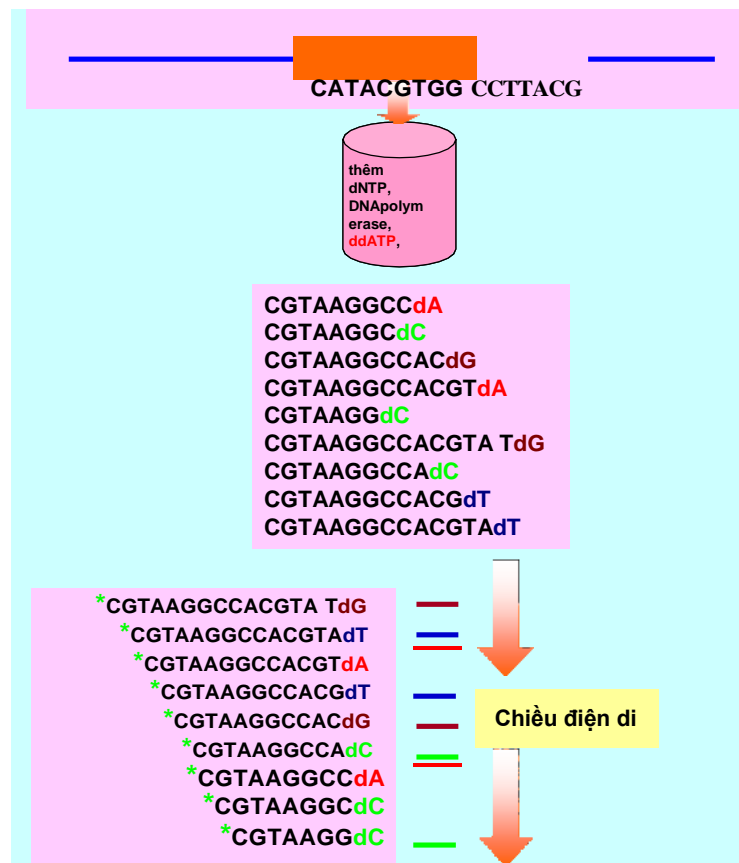
- Phương pháp giải trình tự gen theo phương pháp hóa học của Alan

Maxam và Walter Gilbert.

- Phương pháp giải trình tự gen bằng enzyme hay phương pháp Dideoxy của Frederick Sanger.

Cả hai phương pháp này đã đánh dấu bước ngoặt lớn trong lịch sử phát triển y sinh học hiện đại. Ngày nay, rất nhiều máy giải trình tự gen tự động đều dựa trên nguyên tắc chính là phương pháp giải trình tự gen của Sanger.

Để thực hiện được giải trình tự bằng máy tự động thì các mạch DNA đơn được sinh trong ống phản ứng giải trình tự phải được đánh dấu huỳnh quang để các vạch điện di của các mạch đơn này phát sáng khi đi qua một chùm tia sáng laser. Cấu tạo của một máy tự động giải trình tự gồm hai phần chính yếu, đó là: phần điện di với gel polyacrylamide và phần phát hiện các vạch điện di.



Các ddNTP đánh dấu huỳnh quang khác nhau, tương ứng với nucleotide tận là A, T, C và G.

Hình 1.10. Nguyên lý giải trình tự gen trên máy giải trình tự gen tự động

Phần điện di polyacrylamide có thể là một bản gel hay là một ống mao quản chứa gel. Phần phát hiện vạch điện di là những mắt cảm quang và một chùm tia laser đi qua trước nó. Nguyên tắc hoạt động của máy là trong suốt quá trình điện di, mỗi khi có một vạch điện di đi qua chùm tia laser thì vạch điện di sẽ phát sáng lên và sự phát sáng này sẽ được mắt cảm quang ghi nhận và lưu lại thành một đỉnh cường độ sáng trong biểu đồ. Từ biểu đồ của các đỉnh cường độ sáng này, máy sẽ so dòng của các đỉnh tương ứng với các màu để cuối cùng phân tích thành trình tự của đoạn DNA. Sau khi đã xác định được trình tự của gen, so sánh trình tự thu được và trình tự gốc của gen đó trên genebank bằng phần mềm để phát hiện các đột biến ở các gen.

Phương pháp giải trình tự gen này cho phép xác định trình tự các nucleotid chính xác tới 99%, tuy nhiên để ứng dụng xác định các đột biến các gen liên quan trong ung thư thì độ nhạy còn thấp vì phương pháp đòi hỏi lấy được vùng có từ 15-20% tế bào ung thư trở lên. Khi thực hiện phương pháp này để xác định các đột biến gen trong ung thư thông thường phải phối hợp với phương pháp nhuộm Hematoxylin để xác định và đánh dấu vùng có chứa nhiều tế bào ung thư.

1.5.1.2. Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới NGS (Next Generation Sequencing) [79]

Công nghệ giải trình tự thế hệ mới NGS đã có mặt và phát triển trong những năm gần đây. Với ưu thế thời gian đọc nhanh, chính xác các công nghệ NGS được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, từ nghiên cứu cơ bản cho đến các nghiên cứu về chẩn đoán lâm sàng, hệ gen học trong nông nghiệp và khoa học hình sự... Các phương pháp giải trình tự này có ưu điểm thực hiện được hàng ngàn cho tới hàng triệu phản ứng giải trình tự cùng lúc, kết quả giải trình tự được xác định trực tiếp không cần thông qua điện di.

* Phương pháp giải trình tự gen pyrosequencing 454[79]

Pyrosequencing 454 do 2 nhà khoa học Nyren và Ronaghi của Viện Kỹ thuật Stockholm, Thụy Điển phát minh, và được phát triển bởi Công ty 454 Life Science, là một hệ thống giải trình tự DNA 2 bước có độ tương đồng cao với dung lượng lớn hơn rất nhiều so với hệ thống giải trình tự Sanger. Kỹ thuật này dựa trên nguyên lý “giải trình tự bằng tổng hợp” bao gồm khởi động một sợi DNA đã được giải trình tự và giải trình tự sợi bổ sung bằng phản ứng của enzyme. Đây là hệ thống có thể khuếch đại một số lượng lớn các đoạn DNA trong các giếng picotiter. Nguyên lý “giải trình tự bằng việc tổng hợp” cũng dựa trên việc nhận biết các pyrophosphate được giải phóng trong quá trình gắn nucleotide, tạo ra một tín hiệu ánh sáng, hiệu quả hơn kỹ thuật kết thúc chuỗi bằng dideoxynucleotide.

Công nghệ pyrosequencing có tính linh hoạt cao khi liên kết cặp primer, có khả năng phân tích được nhiều đột biến, dữ liệu và thông tin trình tự tập hợp được đầy đủ. Kỹ thuật này có tính nhạy cao hơn hẳn so với phương pháp truyền thống, độ chính xác lên tới 99,9% với các đoạn 200 base và 99% với các đoạn 400 base. Hệ thống giải trình tự được 400-600 triệu bp trong vòng 10 giờ, giúp giảm giá thành đáng kể so với khi sử dụng phương pháp Sanger để giải trình tự một số lượng lớn DNA. Công nghệ này cùng với các kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới khác có nhiều ảnh hưởng đến hoạt động nghiên cứu có lượng dữ liệu đầu vào lớn, và yêu cầu xử lý trong thời gian ngắn, nhờ đó đã tạo ra nhiều đột phá trong các lĩnh vực: công nghệ sinh học, sinh học pháp y, hệ thống học và y học.

* Phương pháp giải trình tự gen SBS (sequencing by synthesis)[79]

Công nghệ giải trình tự bằng tổng hợp SBS sử dụng 4 nucleotide đánh dấu huỳnh quang để giải trình tự hàng chục triệu cluster đồng thời trên bề mặt flow-cell. Trong mỗi chu trình giải trình tự, một deoxynucleoside triphosphate đánh dấu (dNTP) được thêm vào chuỗi acid nucleic. Nhãn huỳnh quang của

nucleotide đóng vai trò như một khóa dừng phản ứng polymer hóa, do đó sau khi mỗi dNTP được tích hợp, dye huỳnh quang được ghi lại để xác định nucleotide và sau đó bị cắt bỏ để tổng hợp nucleotide tiếp theo. Vì cả 4 loại dNTP gắn khóa dừng tổng hợp thuận nghịch có mặt đồng thời dưới dạng đơn phân tử, sự cạnh tranh ngẫu nhiên giúp giảm thiểu việc tổng hợp mất cân đối. Việc xác định các base dựa vào cường độ tín hiệu đo được trong mỗi chu trình, giúp giảm thiểu các sai số thô so với công nghệ khác. Kết quả cuối cùng là trình tự được đọc từng base một với độ chính xác cao, loại bỏ được các lỗi do đặc thù trình tự, cho phép quá trình giải trình tự mạnh mẽ trên toàn bộ genome, bao gồm các trình tự lặp lại.

* Phương pháp giải trình tự gen SOLiD[79]

Công nghệ giải trình tự SOLiD được thiết kế dựa trên nguyên lý ghép nối, toàn bộ genome được cắt thành các đoạn DNA ngắn, sau đó từng đoạn được gắn với các adapter rồi cố định vào các hạt từ. Quá trình giải trình tự được thực hiện thông qua các oligonucleotide được đánh dấu huỳnh quang. Đầu tiên các primer được ghép cặp thông qua liên kết bổ sung với các đoạn adapter, quá trình tổng hợp được thực hiện như sau: 4 loại oligonucleotide có đánh dấu huỳnh quang được gắn vào các vị trí tiếp theo bắt đầu từ vị trí 5'P của mỗi. Sau mỗi một lượt gắn của các đoạn oligonucleotide thì một tín hiệu huỳnh quang được ghi nhận, tiếp đến nhờ hoạt tính của enzyme, các nucleotide bắt đầu từ số 6 bị loại ra, kèm theo đó nhãn huỳnh quang được loại bỏ để lộ ra vị trí 5'P, quá trình gắn được tiếp tục thực hiện cho tới hết chiều dài của đoạn DNA. Kết thúc quá trình thứ nhất, một primer mới tiếp tục được gắn với sợi khuôn ở vị trí tịnh tiến 1 nucleotide về phía trước so với vị trí gắn của primer đầu tiên và tiếp tục quá trình thu nhận tín hiệu thông qua các phản ứng ghép nối. Quá trình được lặp lại 5 lần, mỗi lần sử dụng một môi mới và tịnh tiến 1 nucleotide về phía trước so với vị trí gắn môi trước đó. Dữ liệu xuất ra của hệ thống có thể lên tới 60 Gb với khoảng hơn 1 tỷ đoạn được đọc

sau mỗi lượt chạy.

* Phương pháp giải trình tự gen SMRT (Single Molecular Real-Time)[79]

SMRT là công nghệ giải trình tự tiên tiến nhất hiện nay. Nếu tất cả các công nghệ giải trình tự nêu trên đều dựa trên phương pháp cơ bản do Sanger phát minh ra năm 1977, gọi là “phương pháp gián đoạn chuỗi” (chain-termination method), thì SMRT xác định trình tự DNA theo một cách hơi khác: nó “quan sát” quá trình tổng hợp một chuỗi DNA tự nhiên bằng DNA polymerase đơn lẻ, các tín hiệu từ nucleotide được đánh dấu phosphate sẽ được phát hiện theo thời gian thực giúp xác định chính xác nucleotide nào trong 4 loại nucleotide đang được gắn vào mạch, do đó khi đoạn DNA được sao chép xong thì máy cũng xác định xong trình tự đoạn DNA đó. Công nghệ này vô cùng hữu ích cho các ứng dụng giải trình tự toàn bộ hệ gen của các sinh vật chưa có thông tin về hệ gen (de novo genome sequencing).

1.5.2. Phương pháp realtime PCR Taqman Probe [80]

Các phản ứng Real-time PCR Taqman Probe sử dụng những môi hoặc mẫu dò đặc hiệu cho từng đột biến hoặc kiểu gen muốn phát hiện. Nếu sử dụng các chất phát huỳnh quang gắn DNA như SYBR Green thì mỗi phản ứng chỉ dành riêng cho một đột biến, tức là singleplex. Nếu sử dụng mẫu dò TaqMan đánh dấu màu huỳnh quang khác nhau, chúng ta có thể phát hiện lên đến 4-5 đột biến trong cùng 1 phản ứng, sẽ tiết kiệm hóa chất và thời gian. Độ nhạy kỹ thuật khá cao, có thể phát hiện được đột biến khi tế bào ác tính mang đột biến ở mức trên 1%. Vì thế phương pháp này không chỉ ít phụ thuộc vào các nhà giải phẫu bệnh mà còn có thể khoanh vùng các khu vực có tế bào ác tính và thậm chí có thể áp dụng phát hiện đột biến lưu hành tự do trong máu ngoại vi, thay vì phải sinh thiết khối u, làm mô bệnh học.

1.5.3. Phương pháp lai phân tử Southern blot

Phương pháp Southern blot được E. Southern phát minh vào năm 1975,

cho phép nghiên cứu DNA của bộ gen, kiểm tra kết quả chuyển gen hoặc kiểm tra sự có mặt của một gen nào đó trong bộ gen của tế bào. Để thực hiện được quá trình lai, đầu tiên, người ta phải tách DNA bộ gen của tế bào. Sử dụng enzyme cắt giới hạn để cắt phân tử DNA thành những đoạn nhỏ, điện di trên gel agarose để tách những đoạn có kích thước khác nhau. Gây biến tính DNA trên gel bằng dung dịch NaOH-0,5M, sau đó, chuyển DNA từ gel sang màng lai (nitrocellulose). Trong quá trình chuyển, vị trí của DNA phải được giữ nguyên. DNA cố định trên màng được lai với mẫu dò có đánh dấu phóng xạ. Sau quá trình lai người ta rửa màng lai để loại bỏ những mẫu dò không bắt cặp chuyên biệt với DNA cố định trên màng lai.

Kỹ thuật chuyển DNA từ gel agarose lên màng lai cuối cùng, người ta dùng kỹ thuật phóng xạ tự ghi để định vị các phân tử lai. Trong kỹ thuật này, người ta đặt một phim nhạy cảm với tia xạ áp sát vào màng lai. Các phân tử lai có đánh dấu phóng xạ sẽ tác động lên phim và kết quả được thể hiện qua các chấm đen trên phim. Ứng dụng quan trọng của Southern blot phát hiện các đột biến mất đoạn, đột biến điểm hay tái tổ hợp trên một gen.

1.5.4. Phương pháp hóa mô miễn dịch (HMMD)

1.5.2.1. Nguyên lý kỹ thuật

HMMD là một kỹ thuật nhuộm đặc biệt, sử dụng kháng thể (KT) đặc hiệu để xác định sự hiện diện của các kháng nguyên (KN) tương ứng trên các lát cắt mô học hoặc trên các loại tế bào có trong mô [69]. Nguyên tắc: cho KT đặc hiệu lên mô, nếu trong mô có KN sẽ có phản ứng kết hợp KN - KT. Có 2 cách quan sát phức hợp này:

- + Miễn dịch huỳnh quang: KT được gắn với một chất phát huỳnh quang (quan sát kết quả dưới kính hiển vi huỳnh quang).
- + Miễn dịch enzyme: KT được gắn với một vài loại enzyme, enzyme này xúc tác cho một phản ứng hóa học để chuyển một chất không màu thành

một chất có màu (quan sát được dưới kính hiển vi quang học).

Kháng nguyên: các KN thường là các protein, một số khác là carbohydrate, có thể từ ngoài cơ thể vào (vi khuẩn, độc tố, virus...) hoặc từ trong cơ thể (các thụ thể hormon, các protein là sản phẩm của đột biến gen..., có thể hiện diện ở bào tương, màng tế bào hoặc nhân) [81].

Kháng thể: là các globulin miễn dịch nhận biết và kết hợp đặc hiệu với KN, KT kết hợp trực tiếp với KN gọi là KT thứ nhất.

Hệ thống nhận biết: vì các phức hợp KN - KT không quan sát thấy được dưới kính hiển vi quang học nên cần một hệ thống để hiển thị vị trí có phản ứng KN-KT. Hệ thống này gồm 2 phần: KT thứ 2 (KT bắc cầu) và hệ thống phóng đại dấu hiệu nhận biết (gồm enzyme, các phân tử phát hiện, chất kết nối và chất màu).

+ Kháng thể thứ hai (KT bắc cầu, KT kết nối): là KT phản ứng đặc hiệu với KT thứ nhất sau khi KT này đã gắn với KN. KT thứ hai thường được gắn biotin và được coi như kit phát hiện chung.

+ Các enzyme: enzyme là một protein gây ra sự thay đổi hoá học của các chất khác nhưng bản thân nó không thay đổi, enzyme đóng vai trò như chất chỉ điểm. Trong kỹ thuật HMMD, enzyme cần phải đảm bảo được các điều kiện sau:

- Phải tạo ra một sản phẩm phản ứng mà không thể hoà tan, màu rõ ràng, kết tủa trực tiếp tại sản phẩm đó.

- Phải được bền vững ở nhiệt độ phòng, có thể sản xuất được nhiều và có thể duy trì hầu hết các hoạt động của nó sau khi đã kết nối.

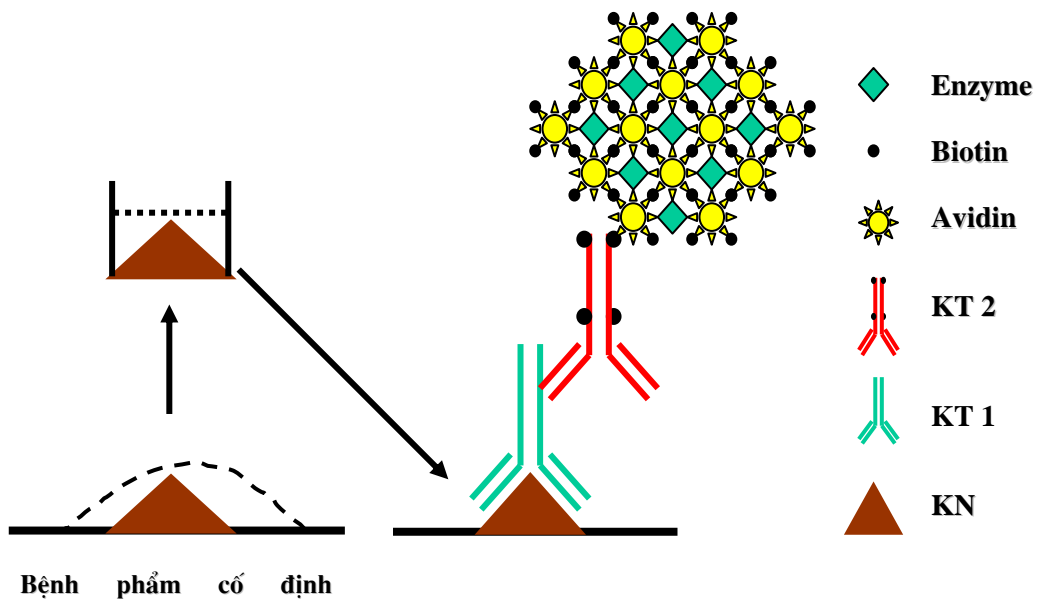
Chỉ có một vài loại enzyme đáp ứng được những nhu cầu trên, hai loại enzyme được sử dụng rộng rãi do sản xuất dễ và giá thành thấp là peroxydase, được chiết xuất từ rễ cây cải ngựa và phosphatase kiềm (Alkaline

phosphatase), chiết xuất từ E. Coli.

+ Các phân tử phát hiện: protein A, biotin và avidin là những phân tử phát hiện. Sự kết nối hoá học gây nên bởi cầu nối này phải không bị thay đổi và không bị phá huỷ bởi các hoạt động của enzyme và của kháng thể. Càng giữ cho hoạt động sinh học của các thành phần này tốt thì quá trình kết nối càng được thực hiện tốt.

+ Chất tạo hợp chất màu: dùng để tạo ra một sản màu tại vị trí kết hợp KN-KT mà có thể quan sát được trên kính hiển vi quang học. Phản ứng này cũng để chứng minh sự có mặt của enzyme. Hiện nay, các phòng xét nghiệm HMMD thường sử dụng diaminobenzidine (DAB), loại này tạo ra một sản phẩm màu nâu, bền vững trong nhiều năm [81].

1.5.1.2. Các kỹ thuật nhuộm miễn dịch enzyme [81]



Hình 1.11. Sơ đồ phương pháp hóa mô miễn dịch với phức hợp Avidin - Biotin

+ Miễn dịch enzyme trực tiếp: KN mô kết hợp với KT thứ nhất có gắn enzyme, phương pháp này đơn giản, nhanh, có tính đặc hiệu nhưng ít nhạy do

thiếu hệ thống phóng đại dấu hiệu nhận biết.

+ Miễn dịch enzyme gián tiếp (phương pháp cầu nối): gồm KN mô + KT thứ nhất + KT thứ hai (kháng Ig loài của KT thứ nhất) gắn với hệ thống phóng đại dấu hiệu nhận biết.

Hiện nay có nhiều phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch, các phương pháp thường dùng là:

+ Phương pháp enzyme chống enzyme (Peroxydase-antiperoxydase): KN mô + KT thứ nhất + KT thứ hai gắn phức hợp enzyme chống enzyme (peroxydase- antiperoxydase).

+ Phương pháp cầu nối Avidin - Biotin (Avidin - Biotin conjugate), (phương pháp ABC): KN mô + KT thứ nhất + KT thứ hai gắn phức hợp Avidin, Biotin và peroxydase.

+ Phương pháp cầu nối Biotin - streptavidin: KN mô + KT thứ nhất + KT thứ hai gắn phức hợp Biotin, Streptavidin và peroxydase.

+ Phương pháp phosphatase kiềm - kháng phosphatase kiềm (Alkaline phosphatase - antialkaline phosphatase) (phương pháp APAAP).

Thực tế cho thấy rằng với những u đặc thì nhuộm bằng phương pháp ABC có độ nhạy cao hơn, ít gây nhuộm nền hơn so với các phương pháp khác [81].

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu là những bệnh nhân vào viện, đã được chẩn đoán xác định là ung thư da bằng mô bệnh học tại Bệnh viện da liễu Trung ương.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân

- Bệnh nhân được chẩn đoán xác định là ung thư da các thể tế bào đáy, tế bào vảy và tế bào hắc tố bằng xét nghiệm mô bệnh học.
- Có đầy đủ các khối nén chứa bệnh phẩm đủ để làm xét nghiệm giải trình tự gen và xét nghiệm hoá mô miễn dịch.
- Có đầy đủ hồ sơ lưu trữ.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Bệnh nhân bị ung thư khác ở da hoặc ung thư từ các cơ quan khác di căn đến da.
- Các ung thư da tái phát, đã được điều trị hoá chất và tia xạ tiền phẫu.
- Những bệnh nhân mắc 2 ung thư trở lên.
- Những bệnh nhân không có đầy đủ hồ sơ bệnh án lưu trữ.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang

Tính cỡ mẫu theo công thức cỡ mẫu cho nghiên cứu mô tả

$$n = z_{(1-\alpha/2)}^2 \frac{px(1-p)}{d^2}$$

Trong đó:

- $z_{(1-\alpha/2)} = 1,96$ với $\alpha = 0,05$
- $d = 0,15$ Sai số về tỷ lệ của quần thể nghiên cứu
- $p = 0,392$ lấy theo kết quả nghiên cứu trước đây về tỷ lệ đột biến gen *BRAF* trong ung thư da [35]: $n = 40,7$
- $p = 0,244$ lấy theo nghiên cứu về tỷ lệ đột biến gen *TP53* trong ung thư da [16]: $n = 31,5$

Nghiên cứu của chúng tôi, $n = 63$ mẫu ung thư da gồm 03 thể chính:

- + 21 mẫu ung thư tế bào đáy
- + 21 mẫu ung thư tế bào vảy
- + 21 mẫu ung thư tế bào hắc tố

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Xác định các đột biến của gen P53 và BRAF ở mô ung thư da, các kỹ thuật sau được sử dụng:

- Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số.
- Kỹ thuật PCR.
- Kỹ thuật tinh sạch sản phẩm PCR.
- Kỹ thuật sequencing.

2.2.2.2. Xác định biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da, sử dụng kỹ thuật: Hóa mô miễn dịch

2.2.2.3. Xác định mối tương quan giữa đột biến gen TP53 và biểu lộ protein p53 đột biến ở mô ung thư da.

2.2.3. Các qui trình và kỹ thuật nghiên cứu

2.2.3.1. Qui trình kỹ thuật tách chiết DNA tổng số từ mô ung thư

- Mô ung thư được nghiền trong 1ml isogen bằng cối nghiền đồng thể, sau đó chuyển sang ống Eppendorf 1.5 ml.

- Thêm 0,2 ml chloroform vào dung dịch. Giữ ở nhiệt độ phòng 2-3 phút.
- Ly tâm với tốc độ 15.000 vòng/ phút trong 15 phút ở 4°C.
- Hút lớp dịch trên cùng có chứa DNA.
- Thêm 0,5 ml dịch ethanol lạnh và giữ ở nhiệt độ phòng 10-15 phút.
- Ly tâm với tốc độ 15000 vòng/ phút trong 5 phút ở 4°C.
- Loại bỏ dịch nổi, thu lấy cặn màu trắng đục. Đây chính là cặn DNA thu được.
- Thêm ít nhất 1 ml ethanol 70% ống Eppendorf có chứa cặn, dùng tay lộn ngược ống Eppendorf vài lần để rửa cặn.
- Ly tâm với tốc độ 15000 vòng/ phút trong 5 phút ở 4°C.
- Loại bỏ dịch nổi, thu lấy cặn DNA.
- Giữ khoảng 1 phút để thu cặn DNA. Lưu ý là không để cặn khô quá để tránh làm giảm chất lượng DNA và cặn sẽ khó được hòa tan.
- Hòa tan cặn trong nước khử ion
- Bảo quản dịch DNA ở -70°C.

2.2.3.2. *Xác định nồng độ, độ sạch DNA bằng phương pháp quang phổ kế*

Nguyên lý của phương pháp dựa vào sự hấp thụ mạnh ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260nm của các base. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260nm (OD_{260nm} : Optical Dencity_{260nm}) của các mẫu đo cho phép xác định nồng độ nucleic dựa vào tương quan sau:

Một đơn vị OD_{260nm} tương ứng với nồng độ là:

- 50 μ g/ml cho một dung dịch DNA sợi đôi.
- 40 μ g/ml cho một dung dịch RNA hay DNA sợi đơn.

Để kiểm tra độ sạch của dung dịch, người ta cho thêm giá trị OD ở 280nm (OD_{280nm}). Các protein có mức hấp thụ cao nhất ở bước sóng 280nm,

nhưng cũng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260nm như các acid nucleic. Do đó làm sai lệch giá trị thật của nồng độ acid nucleic. Một dung dịch acid nucleic đạt tiêu chuẩn về độ sạch (không nhiễm protein) khi tỷ số OD_{260nm}/OD_{280nm} nằm trong khoảng 1,8 - 2,0.

Dựa vào nguyên lý trên, tất cả các mẫu DNA tách chiết đều được đo bằng phương pháp quang phổ để xác định nồng độ và độ tinh sạch, chỉ những mẫu nào đạt nồng độ tối ưu và độ tinh sạch dao động từ 1,8-2,0 mới được sử dụng vào phản ứng PCR.

Sử dụng máy quang phổ Nanodrop 2000 để đo nồng độ và tính toán độ tinh sạch của DNA tách được (hình 2.1).

- + Chọn bước sóng 260nm, là bước sóng hấp thụ cực đại của acid nucleic.
- + Nhỏ 2 μ l dung dịch TE hoặc nước cất lên đầu đo cảm ứng (chứng blank).
- + Lau khô bề mặt đầu đo cảm ứng bằng giấy thấm.
- + Lấy 2 μ l dung dịch DNA/1 mẫu để đo.
- + Kết quả: kết quả đo được kết nối với hệ thống máy vi tính thể hiện bằng đồ thị độ hấp thụ và các thông số ở các bước sóng 260nm, 280nm.



Hình 2.1. Máy đo quang phổ Nanodrop 2000

2.2.3.3. Phương pháp điện di kiểm tra DNA

Nguyên lý:

DNA là đại phân tử tích điện âm, trong điện trường có điện thế và cường độ thích hợp DNA sẽ di chuyển từ cực âm sang cực dương.

Để kiểm tra và xác định tính chất của DNA, cần điện di DNA trên gel. Phân tử DNA càng nhỏ di chuyển càng nhanh.

Để quan sát hình ảnh điện di, nhuộm DNA bằng Ethidium bromide, dưới ánh sáng tử ngoại DNA gắn với Ethidium bromide sẽ phát sáng.

Tiến hành:

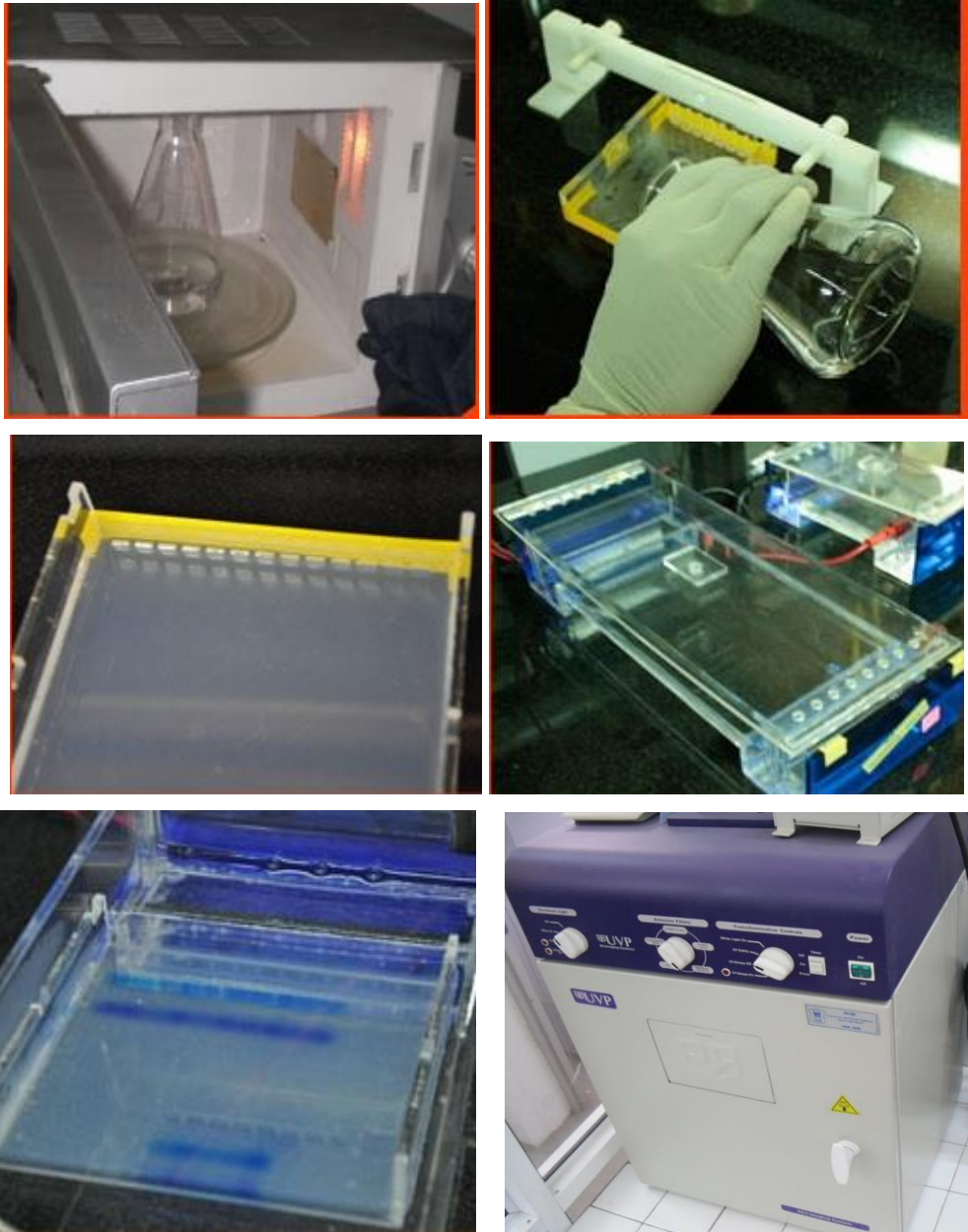
- Chuẩn bị gel nồng độ 0,8%: lấy 0,6g Agarose hòa tan trong 48ml TBE.
 - + Đun sôi 2 - 3 phút bằng lò vi sóng
 - + Để thạch nguội khoảng 70⁰C rồi tạo giếng.
- Đặt thạch vào khay điện di.
- Viết sơ đồ các mẫu DNA điện di.
- Lấy 5µl DNA trộn với 2µl chỉ thị bromphenol blue, nhỏ dung dịch đã trộn vào giếng theo thứ tự như ở sơ đồ.
- Điện di ở hiệu điện thế 100mV trong 30 phút.
- Nhuộm Ethidium bromide.
- Dùng hệ thống UVP chụp ảnh gel và phân tích kết quả.

2.2.3.4. Kỹ thuật PCR khuếch đại gen *BRAF* và *TP53*

Các phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen *BRAF* và *TP53* được sử dụng cặp mồi và Taq polymerase của hãng Sigma Aldrich (Mỹ) sản xuất.

a. Quy trình PCR khuếch đại gen BRAF

Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen *BRAF* với cặp mồi đặc hiệu phát hiện đột biến V600E:



**Hình 2.2. Chuẩn bị thạch, điện di DNA và hệ thống UVP
chụp ảnh gel sau khi điện di**

BRAF-F:5'-CTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA-3

BRAF-R:5'-ATCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT- 3

Chu trình nhiệt: 94°C-2 phút → [94°C-30 giây, 58°C-30 giây, 72°C-30 giây] 35 chu kì → 72°C-5 phút.

b. Qui trình PCR khuếch đại các đoạn gen TP53

Mỗi mẫu đều được giải trình tự ở các exon 2 - 4, 5 - 6, 7 - 9 là các exon thường xảy ra đột biến trong ung thư da với các cặp môi:

Môi	Trình tự 5' - 3'	Sản phẩm (bp)
Exon 2 - 4	F - TCCTGGATCCCCACTTTTCC	611
	R - TCCTGGATCCCCACTTTTCC	
Exon 5 - 6	F - CACTTTCAACTCTGTCTCCTTCC	378
	R - CCCCCCTACTGCTCACCCGG	
Exon 7 - 9	F - TCTTCGGCCTGTGTTATCTCC	755
	R - CAGGTCCCAAGACTTAGTACC	

Chu kỳ luân nhiệt cho việc khuếch đại đoạn gen như sau:

Chu kỳ luân nhiệt: 40 chu kỳ luân nhiệt:

95°C-5 phút → [95°C-30 giây, 55°C-30 giây, 72°C-60 giây]x40 chu kỳ
→72°C-5 phút.

c. Qui trình tinh sạch sản phẩm PCR-Sequencing

- Thêm vào mỗi giếng 32μl Isopropyl alcohol (3Iso : 1 H₂O).
- Lắc 500 rpm/1phút ở nhiệt độ phòng 30 phút.
- Ly tâm 3600 rpm/30 phút/10 °C.
- Ly tâm ngược plate 96rpm/30giây.
- Thêm vào mỗi giếng 80μl Isopropyl alcohol 75%.
- Để ở nhiệt độ phòng 3 phút.
- Ly tâm 3600rpm/10 phút/ 10 °C.
- Ly tâm ngược plate.
- Đặt plate vào tủ ấm 56 °C/20 phút.
- Thêm vào mỗi giếng 10μl nước cất khử ion.

2.2.3.5. Kỹ thuật giải trình tự và xác định các biến đổi gen *TP53* và gen *BRAF*

Xác định trình tự gen *TP53* và gen *BRAF* được thực hiện trên máy ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer. Các thông số và chất lượng định được thu thập, kiểm định bằng các phần mềm ABI Data Collection v2.0 và Sequencing Analysis Software v5.3. Trình tự các đoạn gen *TP53* và *BRAF* của mẫu ung thư da người Việt Nam được so sánh với trình tự tham chiếu công bố trên GenBank thông qua sử dụng phần mềm phân tích BioEdit để xác định các đột biến.



Hình 2.3. Máy xác định trình tự gen ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer

2.2.3.6. Kỹ thuật hóa mô miễn dịch

Kỹ thuật hóa mô miễn dịch là phương pháp áp dụng các nguyên lý và kỹ thuật miễn dịch để nghiên cứu tế bào và mô. Dựa trên sự biểu lộ đặc hiệu của các kháng nguyên bề mặt tế bào hay tại khu vực gian bào, các kháng thể đặc hiệu sẽ giúp cho việc nhận ra và phân loại các tế bào hay mô trên lát cắt

tổ chức.

Trong các kỹ thuật sử dụng rộng rãi ngày nay, phương pháp sử dụng phức hợp avidin - biotin được hầu hết các phòng xét nghiệm mô bệnh học và miễn dịch sử dụng trong các nghiên cứu tế bào và mô. Với kỹ thuật này, ái lực cao của avidin đối với biotin được sử dụng để gắn chất đánh dấu theo peroxidase với kháng thể đặc hiệu kháng nguyên.

Nhuộm hoá mô miễn dịch theo phương pháp miễn dịch theo phương pháp ABC, Avidin Biotin Peroxidase trên các tiêu bản chuyển đúc paraffin, các kit được sử dụng của hãng Dako Cytomation (Đan Mạch).

Quy trình nhuộm tiêu bản hoá mô miễn dịch theo các bước sau:

- Bệnh phẩm đúc paraffin được cắt ở độ dày 4µm và dán lên các lam kính sạch trước đó đã được nhúng vào dung dịch silane để tăng độ kết dính.
- Các tiêu bản được tẩy paraffin theo phương pháp thường qui.
- Sau đó được thực hiện qua các bước sau:
 - + Khử hoạt động của peroxidase nội sinh bằng dung dịch H₂O₂ 0,6% trong cồn methylic, để ở nhiệt độ phòng 30 phút.
 - + Rửa tiêu bản bằng nước cất 2 lần trong 5 phút.
 - + Nhỏ dung dịch PBS (Phosphate Buffer Saline) trong 15 phút ở nhiệt độ phòng với pH = 7,4 có chứa 5% huyết thanh bê không miễn dịch và 0,05% tween 20.
 - + Ủ với kháng thể đơn dòng đã được pha loãng 3% ở nhiệt độ 37⁰C trong 15 phút.
 - + Rửa tiêu bản bằng dung dịch PBS, sau đó ủ tiêu bản với kháng thể kháng IgG chuột đã được biotine hóa (pha loãng với tỷ lệ 1:200) ở nhiệt độ 37⁰C trong 10 phút.
 - + Rửa tiêu bản bằng dung dịch PBS 2 lần.

+ Ủ với phức hợp gắn Peroxydase - Avidin - Biotin (pha loãng với tỷ lệ 1:100) ở nhiệt độ 37⁰C trong 10 phút.

+ Phủ dung dịch diaminobenzidine.

+ Rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy nhẹ.

+ Nhuộm Hematoxyline.

+ Khử nước, làm sạch tiêu bản, gắn lá kính rồi đọc kết quả trên kính hiển vi quang học.

* *Đối với p53:*

- Kháng thể 1: kháng thể đơn dòng chuột chống p53 đột biến.

- Kháng thể 2: Kháng thể ngựa chống Ig chuột.

* *Đối với BRAF(V600E):*

- Kháng thể 1: kháng thể đơn dòng chuột chống BRAF(V600E) đột biến.

- Kháng thể 2: Kháng thể ngựa chống Ig chuột.

- Cách đánh giá kết quả [69].

+ Tế bào âm tính: tế bào bắt màu xanh tím.

+ Tế bào dương tính: nhân các tế bào bắt màu nâu.

+ Dựa vào tỷ lệ % các tế bào dương tính chia các mức sau:

< 5% tế bào bắt màu: âm tính

5 - 25% tế bào bắt màu: dương tính (+)

26 - 50% tế bào bắt màu: dương tính (++)

51 - 75% tế bào bắt màu: dương tính (+++)

76 - 100% tế bào bắt màu: dương tính (++++)

2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

2.3.1. Thời gian nghiên cứu

- Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 9 năm 2011 đến tháng 9/2016.

2.3.2. Địa điểm nghiên cứu

- Bệnh viện Da liễu Trung ương, là nơi cung cấp bệnh nhân ung thư da.
- Bộ môn Miễn dịch - Sinh lý bệnh, bộ môn Giải phẫu bệnh và bộ môn Y sinh học - Di truyền trường Đại học Y Hà Nội là cơ sở tiến hành xét nghiệm chiết tách DNA, khuếch đại gen, giải trình tự gen xác định đột biến gen *TP53*, *BRAF* và hóa mô miễn dịch xác định sự biểu lộ protein đột biến của gen *TP53*, *BRAF* trong mô ung thư da.

2.4. ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU

- Nghiên cứu này là một phần của đề tài cấp nhà nước, đã được thông qua hội đồng đạo đức của Bệnh viện Da liễu Trung ương và hội đồng bảo vệ đề cương nghiên cứu sinh, đảm bảo được các nội dung sau:

- Nghiên cứu mang tính nhân văn vì hầu hết bệnh nhân bị ung thư da là do hậu quả của nhiều năm lao động phơi nắng, đặc biệt những người nông dân, những người vốn đã phải chịu nhiều thiệt thòi trong xã hội lại có tỷ lệ mắc ung thư da cao nhất. Do thiếu hiểu biết về bệnh kết hợp với nghèo khó nên nhiều bệnh nhân đến khám và điều trị rất muộn khi bệnh đã lan rộng, xâm lấn tại chỗ hay di căn xa. Đề tài nghiên cứu giúp nâng cao nhận thức, sự hiểu biết và chủ động phát hiện bệnh. Từ đó được điều trị sớm và triệt để, hạn chế tỷ lệ tái phát, nâng cao chất lượng cuộc sống cho người bệnh.

- Bệnh nhân sẽ được tư vấn đầy đủ, kỹ lưỡng khi tham gia nghiên cứu.
- Các thông tin của bệnh nhân trong quá trình nghiên cứu được giữ bí mật và mã hóa trên máy vi tính trong quá trình xử lý số liệu, đảm bảo không lộ thông tin.

2.5. QUẢN LÝ THÔNG TIN

- Các trường hợp nghiên cứu đều được ghi nhận đầy đủ thông tin và mã hóa các dữ liệu.

- Lưu giữ số liệu bằng chương trình Excel 2010.

2.6. PHÂN TÍCH XỬ LÝ SỐ LIỆU

Các số liệu thu được xử lý bằng:

- Chương trình Epi Info và phần mềm SPSS.

- So sánh hai hay nhiều tỷ lệ % được thực hiện bằng test thống kê χ^2 .

Chương 3

KẾT QUẢ

3.1. KẾT QUẢ VỀ THÔNG TIN CHUNG CỦA ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện trên 63 bệnh nhân ung thư da, gồm 3 nhóm ung thư da chính: ung thư tế bào đáy 21 bệnh nhân, ung thư tế bào vảy 21 bệnh nhân và ung thư tế bào hắc tố 21 bệnh nhân.

Bảng 3.1. Phân bố tỷ lệ ung thư da theo tuổi

Loại UT da	UT TB đáy (n=21)		UT TB vảy (n=21)		UT TB hắc tố (n=21)		Tỷ lệ UT da (n = 63)	
	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %
<40	1	4,8	0	0	2	9,5	3	4,8
40 - 49	3	14,3	1	4,8	5	23,8	9	19,0
50 - 59	7	33,3	7	33,3	7	33,3	21	33,3
60 - 69	1	4,8	6	28,6	3	14,3	10	15,9
>=70	9	42,9	7	33,3	4	19,0	20	31,7
Tổng	21	100	21	100	21	100	63	100

Về tỷ lệ nhóm tuổi trong ung thư da, hai nhóm tuổi 50 - 59 và trên 70 tuổi chiếm tỷ lệ cao ở cả 3 loại ung thư tế bào đáy, tế bào vảy và tế bào hắc tố, tỷ lệ của các nhóm tuổi này lần lượt là 33,3% và 31,7%; còn nhóm tuổi dưới 40 chiếm tỷ lệ thấp nhất 4,8%.

Bảng 3.2. Phân bố tỷ lệ ung thư da theo giới

Loại UT da	UT TB đáy (n=21)		UT TB vảy (n=21)		UT TB hắc tố (n=21)		Tỷ lệ UT da (n = 63)	
	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %
Nam	11	52,4	13	61,9	9	42,9	33	52,4
Nữ	10	47,6	8	38,1	12	57,1	30	47,6
Tổng	21	100	21	100	21	100	63	100

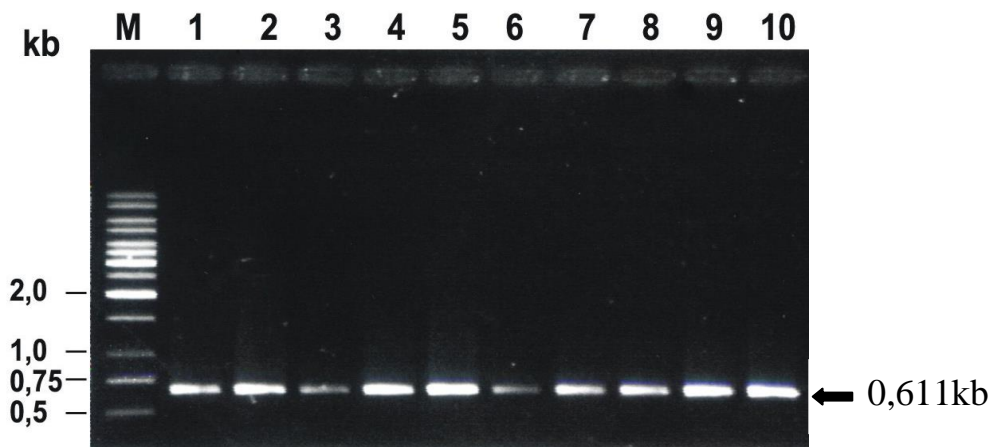
Về tỷ lệ giới tính trong nghiên cứu thu được tỷ lệ nam, nữ gần tương đương nhau, tỷ lệ giới nam/nữ là 1,1.

3.2. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH CÁC ĐỘT BIẾN GEN *TP53*

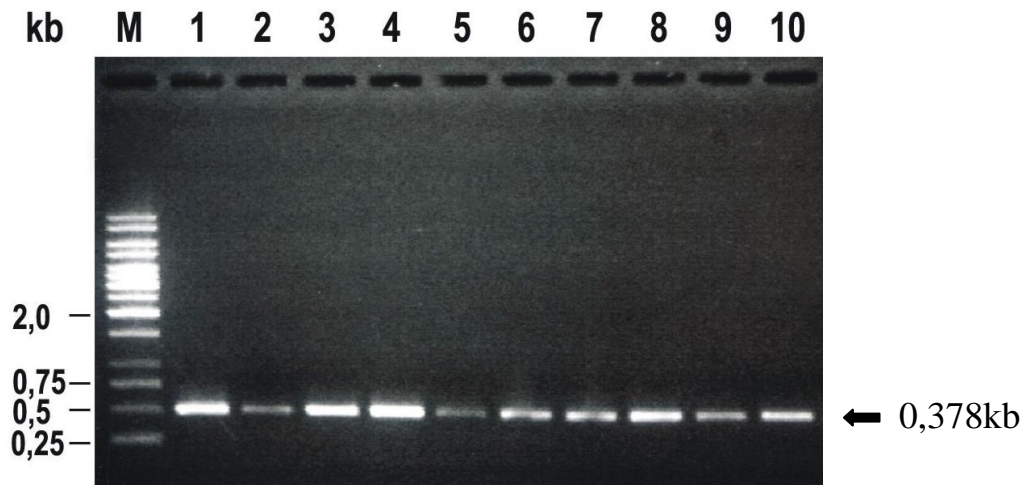
3.2.1. Kết quả đột biến gen *TP53* bằng phương pháp giải trình tự gen

3.2.1.1. Kết quả khuếch đại gen *TP53* bằng kỹ thuật PCR

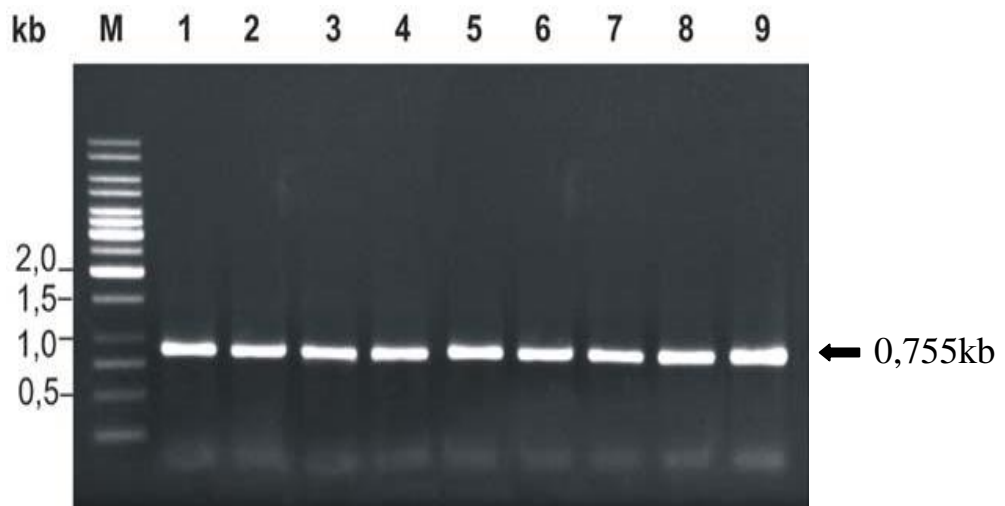
Khi khuếch đại các đoạn gen *TP53* bằng phương pháp PCR, chúng tôi thu được đúng các sản phẩm theo phân đoạn, exon 2 - 4 là 611bp; exon 5 - 6 là 378bp; exon 7 - 9 là 755bp so sánh với thang chuẩn DNA (M).



Hình 3.1. Sản phẩm PCR được khuếch đại từ exon 2 ÷ 4 (611bp)



Hình 3.2. Sản phẩm PCR được khuếch đại từ exon 5 ÷ 6 (378bp)



Hình 3.3. Sản phẩm PCR được khuếch đại từ exon 7 ÷ 9 (755bp)

3.2.1.2. Các vị trí đột biến trên các exon gen *TP53*

Các đoạn môi được thiết kế để nhân các đoạn nhỏ của gen *TP53* từ exon 2 đến exon 9. Quá trình khuếch đại gen *TP53* từ exon 2 đến exon 9 được chia thành 3 đoạn gen: exon 2 - 4, exon 5 - 6 và exon 7 - 9. Sản phẩm giải trình tự gen *TP53* của các mẫu ung thư da thu được bao gồm trình tự từ exon 2 cho đến exon 9 (trong đó có cả trình tự của intron 1 - IVS1, exon 2, IVS2, exon 3, IVS3, exon 4, IVS4, exon 5, IVS5, exon 6, IVS6, exon 7, IVS7, exon 8, IVS8, exon 9).

Bảng 3.3. Các loại đột biến gen *TP53* trên các đoạn exon ở các mẫu ung thư da (n=63)

STT	Đoạn exon	Vị trí biến đổi trên gen	Vị trí biến đổi trên cDNA	Codon thay đổi	Vị trí biến đổi acid amin
1	Exon 3	g.12112G>T	c.187G>T	GCT → TCT	p.A63S(*)
		g.12139C>A	c.215C>A	CCC → CAC	p.P72H
		g.12143T>A	c.218T>A	GTG → GAG	p.V73E(*)
		g.12145G>T	c.220G>T	GCC → TCC	p.A74S(*)
		g.12239G>A	c.314G>A	GGC → GAC	p.G105D(*)
2	Exon 4	g.13150C>T	c.471C>T	GTC → GTT	p.V157V
		g.13151C>T	c.472C>T	CGC → TGC	p.R158C
3	Exon 6	g.14049C>T	c.722C>T	TCC → TTC	p.S241F
		g.14060G>T	c.733G>T	GGC → TGC	p.G245C
		g.14062C>A	c.735C>A	GGC → GGA	p.G245G

Khi phân tích gen *TP53* các đoạn từ exon 2 đến exon 9 ở các mẫu ung thư da, phát hiện được 10 đột biến, các đột biến này đều nằm ở exon 3, exon 4 và exon 6, không phát hiện được các đột biến ở exon 2, exon 5, exon 7 và exon 8. Có hai đột biến đồng thời xảy ra tại exon 6 là đột biến c.733G>T và c.735C>A, đột biến này xảy ra tại 1 codon, GGC mã hóa cho acid amin Glycine (G) bị biến đổi thành TGA là mã kết thúc (X).

Có 2 đột biến không gây thay đổi acid amin: 1 xảy ra ở exon 4, vị trí biến đổi trên bộ gen là g.13150C>T, vị trí tương ứng trên cDNA là c.471C>T, mã qui định là GTC bị biến đổi thành GTT, nhưng acid amin không thay đổi do cả hai bộ ba này đều mã hóa cho acid amin valine, một loại biến đổi nữa là ở exon 6, vị trí biến đổi trên bộ gen là g.14062C>A, vị trí tương ứng trên cDNA là c.735C>A, có sự thay thế Adenine thành Cytosine, mã quy định là GGC nay bị đổi thành GGA nhưng acid amin không thay đổi

vẫn qui định Glycine. Trong 10 đột biến ở vùng exon này có 6 đột biến đã được các tác giả khác công bố, còn 4 đột biến chưa thấy tác giả nào công bố được đánh dấu (*) đều là các đột biến trên exon 3.

3.2.1.3. Các vị trí đột biến trên các intron gen TP53

Bảng 3.4. Các loại biến đổi gen TP53 trên các đoạn intron ở các mẫu ung thư da (n=63)

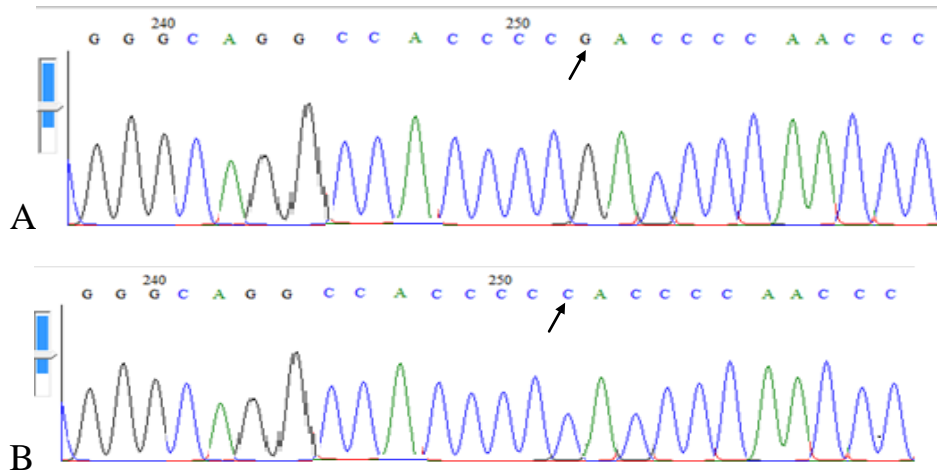
STT	Đoạn intron	Vị trí biến đổi trên gen
1	IVS1 (6 biến đổi)	g.11827C>G, g.11849G>A, g.11903T>A, g.11818-11819insC, g.11827-11828insC, g.11874-11875insC
2	IVS5 (1 biến đổi)	g.13451G>C
3	IVS6 (35 biến đổi)	g.14129C>A, g.14181C>T, g.14133C>A, g.14170T>G, g.14177G>T, g.14187T>G, g.14183T>C, g.14185T>C, g.14189T>C, g.14201T>G, g.14203G>T, g.14236T>C, g.14237T>C, g.14238C>T, g.14239C>T, g.14242T>C, g.14243T>C, g.14245-14246insG, g.14247-14248insG, g.14251-14252insG, g.14274T>C, g.14276T>C, g.14280C>T, g.14319A>C, g.14320C>A, g.14321A>C, g.14322C>A, g.14322C>T, g.14323T>A, g.14324T>C, g.14325C>A, g.14325A>T, g.14326C>A, g.14328T>C, g.14329A>T

Phân tích trình tự các nucleotid trên các đoạn intron, phát hiện được tổng số có 42 biến đổi trên vùng intron của các mẫu ung thư da, trong đó chỉ phát hiện biến đổi ở đoạn IVS1, IVS5, IVS6, không thấy các biến đổi trên các đoạn IVS2, IVS3, IVS4, IVS7 và IVS8. Ở đoạn IVS1, có 6 biến đổi,

đoạn IVS5 chỉ có 1 biến đổi, đoạn IVS6 xảy ra nhiều biến đổi nhất,

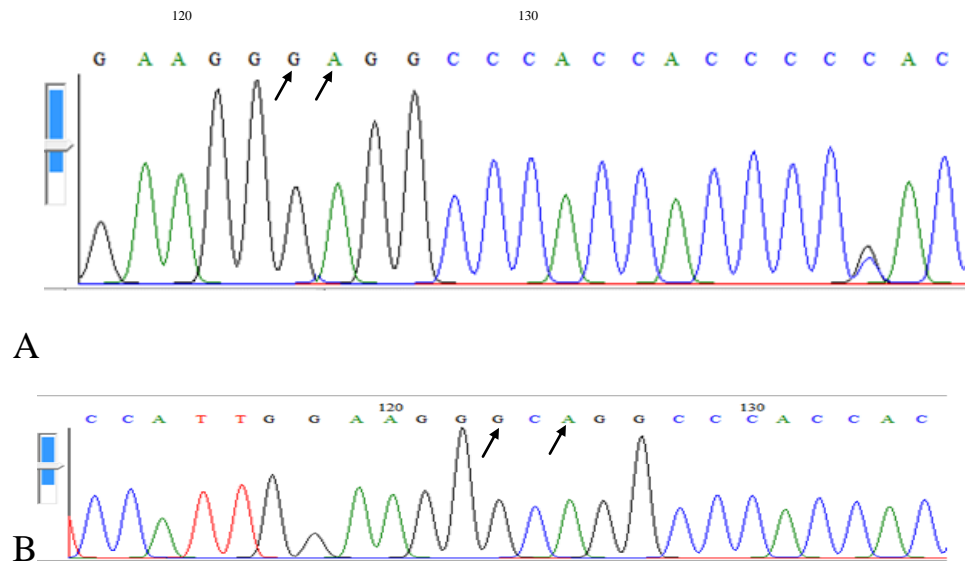
tổng cộng đoạn này xảy ra 35 biến đổi. Các biến đổi hầu hết là thay thế và chèn thêm nucleotid.

3.2.1.4. Một số hình ảnh biến đổi gen TP53 qua phân tích gen bằng phương pháp xác định trình tự gen



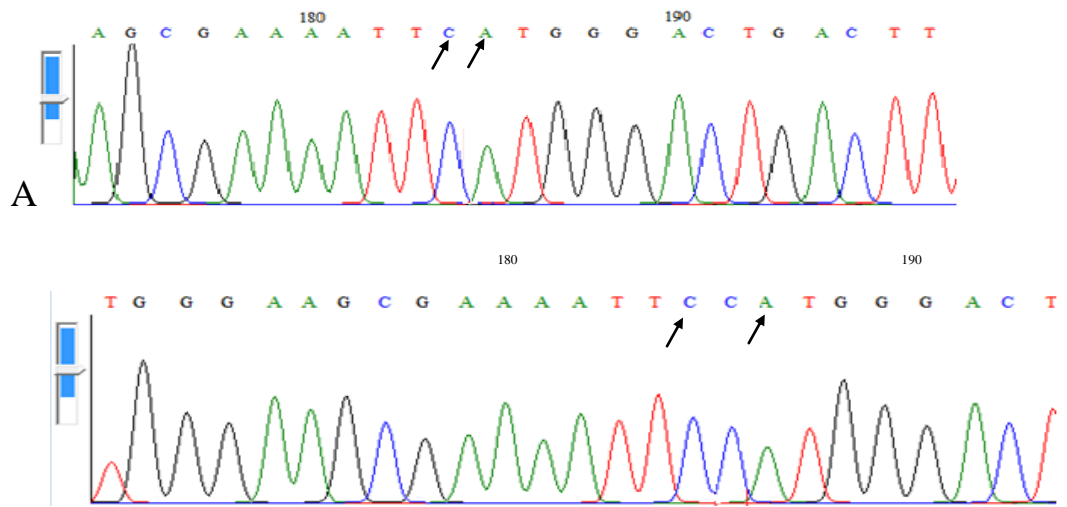
A. Wild type; B. Biến đổi g.11827G>C

Hình 3.4. Biến đổi g.11827G>C ở IVS1



A. Wild type; B. Biến đổi g.11818-11819insC

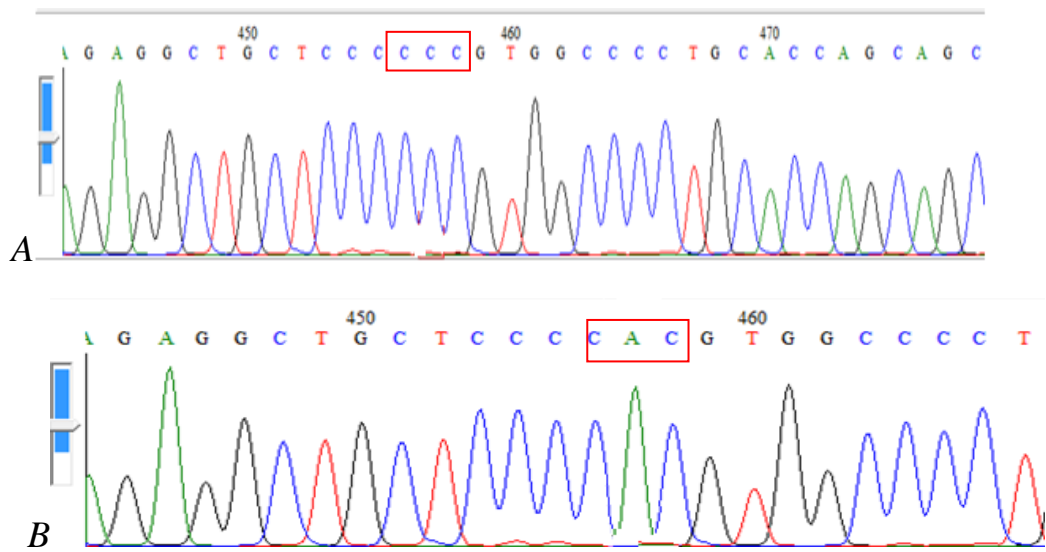
Hình 3.5. Biến đổi g.11818-11819insC ở IVS1



B

A. Wild type; B. Biến đổi g.11874-11875insC

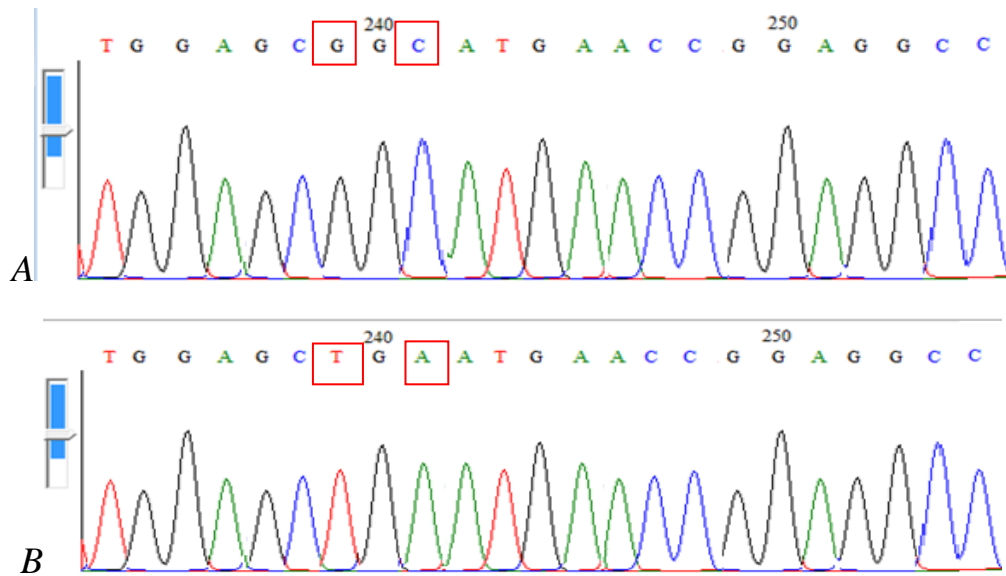
Hình 3.6. Biến đổi g.11874-11875insC ở IVS1



p.P72H (CCC: Proline → CAC: Histidine)

A. Wild type; B. đột biến g.12139C>A

Hình 3.7. Đột biến g.12139C>A (c.215C>A) ở exon 3

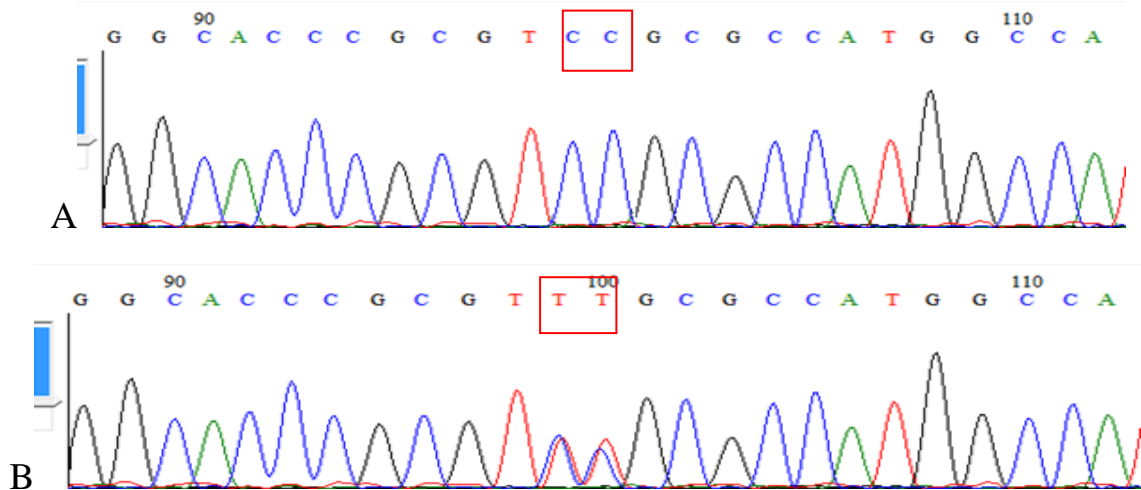


p.G245X (GGC: Glycine → TGA: X - mã kết thúc)

A. Wild type; B. Đột biến kép *g.14060G>T* và *g.14062C>A*

Hình 3.8. Đột biến kép *g.14060G>T* và *g.14062C>A*

(*c.733G>T* + *c.735C>A*) ở exon 6



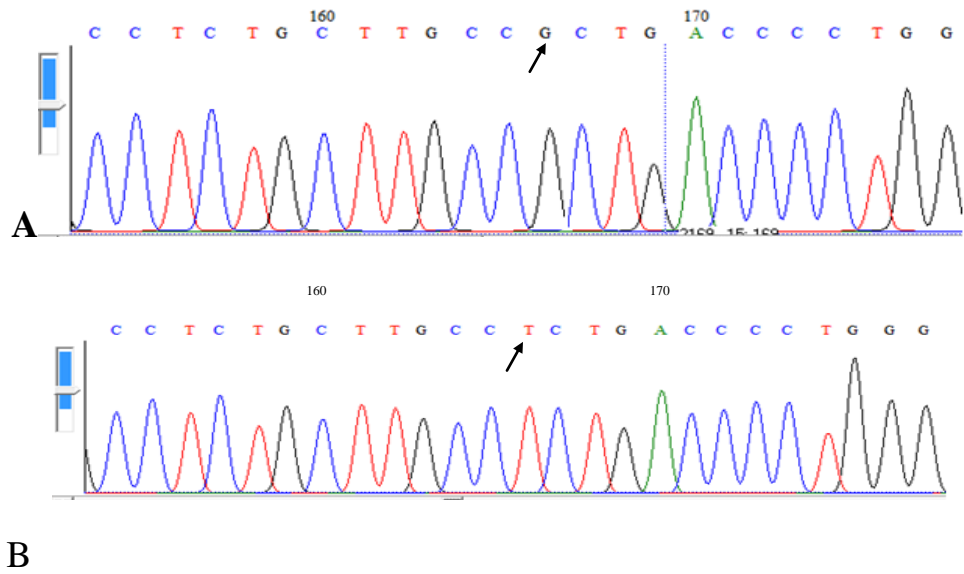
Biến đổi hai nucleotid liên tiếp thuộc 2 codon khác nhau

p.V157V (GTC: Valine → GTT: Valine);

p.R158C (CGC: Arginine → TGC: Cysteine)

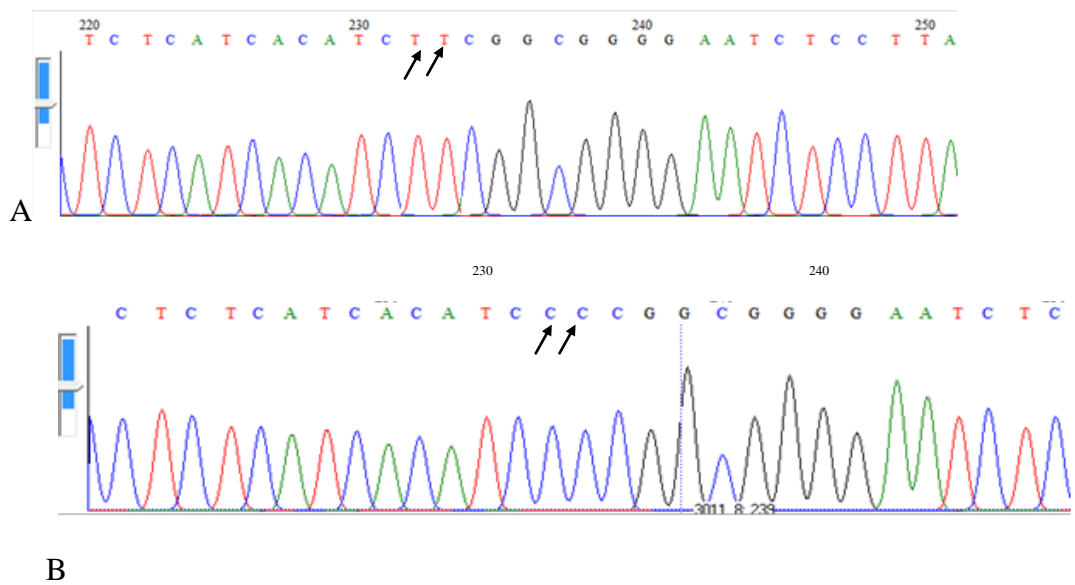
A. Wild type; B. Đột biến *g.13150CC>TT* (dị hợp tử)

Hình 3.9. Đột biến *g.13150C>T* và *g.13151C>T* (*g.13150C>T*) ở exon 4



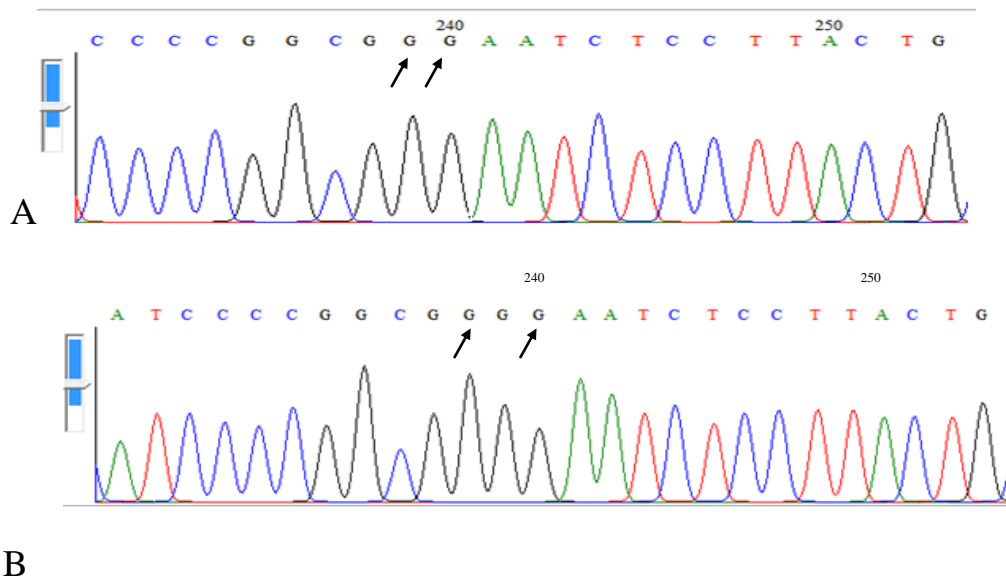
A. Wild type; B. Biến đổi g.14177G>T

Hình 3.10. Biến đổi g.14177G>T ở IVS6



A. Wild type; B. Biến đổi g.14242TT>CC

Hình 3.11. Biến đổi g.14242T>C và 14243T>C (g.14242TT>CC) ở IVS6



A. Wild type; B. Biến đổi g.14251-14252insG

Hình 3.12. Biến đổi g.14251-14252insG ở IVS6

3.2.1.4. Tỷ lệ biến đổi đoạn gen TP53 ở các mẫu ung thư da

* Tỷ lệ biến đổi các đoạn gen TP53 ở từng loại ung thư da

Bảng 3.5. Tỷ lệ biến đổi gen TP53 của các thể ung thư da

Loại biến đổi gen TP53	UT TB đáy (n=21)		UT TB vảy (n=21)		UT TB hắc tố (n=21)		Tổng số (n=63)	
	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %
Có biến đổi gen TP53	21	100	21	100	21	100	63	100
Exon	14	66,7	3	14,3	0	0	17	27,0
Intron	18	85,7	21	100	21	100	60	95,2
Cả exon và intron	11	52,4	3	14,3	0	0	14	22,2

Bảng 3.5 cho thấy 100% các mẫu ung thư da có biến đổi gen *TP53* trong đó tỷ lệ đột biến ở các đoạn exon trong ung thư da chiếm 27,0 % trong tổng số 63 bệnh nhân nghiên cứu, trong đó loại ung thư tế bào đáy là cao nhất chiếm 66,7%, ung thư tế bào vảy là 14,3%, không phát hiện thấy đột biến exon trong loại ung thư tế bào hắc tố. Biến đổi trong các đoạn intron của ung thư da có tỷ lệ khá cao chiếm 95,2% trong tổng số ung thư da nói chung. Biến đổi phối hợp các đoạn exon và intron chiếm tỷ lệ 22,2%.

Bảng 3.6. Tỷ lệ biến đổi các đoạn gen *TP53* của từng loại ung thư da

Đoạn gen <i>TP53</i>	UT TB đáy (n=21)		UT TB vảy (n=21)		UT TB hắc tố (n=21)		Tổng số (n=63)	
	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %
IVS1	12	57,1	21	100	21	100	54	85,7
Exon 3	13	61,9	3	14,3	0	0	16	25,4
Exon 4	1	4,8	0	0	0	0	1	1,6
IVS5	1	4,8	0	0	0	0	1	1,6
Exon 6	8	38,1	0	0	0	0	8	12,7
IVS6	12	57,1	16	76,2	21	100	49	77,8

Ở mẫu ung thư tế bào đáy, các biến đổi tập trung ở các đoạn IVS1, exon 3 và IVS6 (57,1%, 61,9% và 57,1%), có 38,1% đột biến xảy ra ở exon 6. Đối với mẫu ung thư tế bào vảy, biến đổi xảy ra ở đoạn là IVS1 (100%), IVS6 (76,2%) và exon 3 (14,3%). Đối với ung thư tế bào hắc tố, biến đổi xảy ra ở 2 đoạn intron là IVS1 và IVS6, đều chiếm 100%.

Kết quả ở bảng 3.6 cho thấy, biến đổi gặp nhiều nhất ở IVS1 và IVS6. Các đột biến ở các exon chỉ gặp ở exon 3, exon 4 và exon 6, và gặp chủ yếu trong ung thư tế bào đáy với tỷ lệ tương ứng là 61,9%, 4,8% và 38,1%. Ung thư tế bào vảy cũng gặp các đột biến ở exon 3 với tỷ lệ 14,3%. Ở ung thư tế bào hắc tố thì không gặp các đột biến ở các vùng exon. Trong các biến đổi ở các đoạn gen *TP53*, một loại biến đổi có thể xảy ra ở nhiều mẫu và một mẫu có thể gặp nhiều biến đổi.

* *Biến đổi ở đoạn IVS1*

Bảng 3.7. Biến đổi ở đoạn IVS1 trong các loại ung thư da

STT	Vị trí biến đổi	UT TB đáy (n=21)	UT TB vảy (n=21)	UT TB hắc tố (n=21)	Tổng (n=63)	
					n	%
1	g.11818-11819insC	1	18	0	19	30,2
2	g.11827C>G	1	0	0	1	1,6
3	g.11827-11828insC	0	4	0	4	6,3
4	g.11849G>A	1	0	0	1	1,6
5	g.11874-11875insC	12	13	21	46	73,0
6	g.11903T>A	1	0	0	1	1,6

Trong các vùng IVS1 phát hiện có 6 vị trí biến đổi trong đó có 3 vị trí biến đổi chèn thêm nucleotid, 3 vị trí thay thế nucleotid. Các biến đổi chèn

thêm nucleotid và xảy ra chủ yếu ở vị trí g.11818-11819insC và g.11874-11875insC với tỷ lệ tương ứng là 30,2% và 73,0%, đặc biệt biến đổi chèn g.11874-11875insC xảy ra 100% ở các tế bào ung thư tế bào hắc tố. Biến đổi thay thế nucleotid xảy ra ở các vị trí g.11827C>G, g11849G>A, g11903T>A, các biến đổi này có tỷ lệ thấp chiếm 1,6%.

- Trong tất cả các mẫu nghiên cứu của chúng tôi không phát hiện thấy biến đổi nào trên vùng IVS2.

* *Đột biến ở đoạn Exon 3*

Bảng 3.8. Đột biến ở đoạn exon 3

STT	Vị trí đột biến	UT TB đáy (n=21)	UT TB vảy (n=21)	UT TB hắc tố (n=21)	Tổng (n=63)	
					n	%
1	g.12112G>T	3	0	0	3	4,8
2	g.12139C>A	10	3	0	13	20,6
3	g.12143T>A	1	0	0	1	1,6
4	g.12145G>T	1	0	0	1	1,6
5	g.12239G>A	1	0	0	1	1,6

Kết quả ở bảng trên cho thấy: trong các đột biến ở vùng exon 3 của gen *TP53*, loại đột biến g.12139C>A (c.215C>A) là cao nhất, có 10/21 mẫu ung thư tế bào đáy bị đột biến dạng này, nếu tính chung trong 63 bệnh nhân thì loại này chiếm tỷ lệ 20,6 %.

* Đột biến ở đoạn Exon 4

Bảng 3.9. Đột biến ở đoạn exon 4

STT	Vị trí đột biến	UT TB đáy (n=21)	UT TB vảy (n=21)	UT TB hắc tố (n=21)	Tổng (n=63)	
					n	%
1	g.13150C>T	1	0	0	1	1,6
2	g.13151C>T	1	0	0	1	1,6

Ở exon 4 gặp 2 vị trí đột biến cả hai vị trí này đều xảy ra ở 1 mẫu bệnh nhân ung thư da tế bào đáy, hai vị trí đột biến này nằm sát nhau trên vị trí của gen, nhưng thuộc hai bộ ba mã hóa hai acid amin khác nhau.

* *Biến đổi ở đoạn IVS5*

- Trong nghiên cứu này chúng tôi không thấy biến đổi ở vùng IVS4 ở tất cả các mẫu ung thư da.

- Ở vùng IVS5 chỉ gặp 1 biến đổi ở vị trí g.13451G>C của loại ung thư tế bào đáy chiếm 4,8%, biến đổi này ở trạng thái dị hợp tử.

* Đột biến ở đoạn Exon 6

Bảng 3.10. Tỷ lệ đột biến ở đoạn Exon 6

STT	Vị trí đột biến	UT TB đáy (n=21)	UT TB vảy (n=21)	UT TB hắc tố (n=21)	Tổng (n=63)	
					n	%
1	g.14049C>T	1	0	0	1	1,6
2	g.14060G>T	7	0	0	7	11,1
3	g.14062C>A	7	0	0	7	11,1

Kết quả ở bảng trên cho thấy: đột biến ở exon 6 chỉ xuất hiện ở các mẫu ung thư tế bào đáy. Không thấy đột biến exon 6 xảy ra với các mẫu ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào hắc tố. Các đột biến exon 6 của các mẫu ung thư tế bào đáy đều là đột biến đồng hợp tử, các đột biến này gây thay đổi trình tự mã hóa các acid amin. Có 7 mẫu bị đột biến đồng thời ở cả hai vị trí g.14060G>T và g.14062C>A, hai vị trí này trên exon 6 liên quan đến 1 bộ ba mã hóa (GGC, mã hóa acid amin là Glycine), khi đồng thời hai đột biến xảy ra, bộ ba mã này bị đổi thành TGA, chuyển thành mã kết thúc (hình 3.10).

** Biến đổi ở đoạn IVS6*

Kết quả biến đổi xảy ra ở IVS6 gặp với tần suất cao, trong đó ung thư tế bào đáy cũng chiếm chủ yếu các biến đổi ở IVS6, tiếp đó là ung thư tế bào vảy và cuối cùng là ung thư tế bào hắc tố. Mặc dù các biến đổi IVS ở ung thư tế bào hắc tố ít, nhưng là toàn bộ các mẫu xảy ra cùng một biến đổi. Các biến đổi ở dạng thay thế nucleotid tại vùng intron là vùng không mã hóa nên về mặt lý thuyết sẽ không ảnh hưởng tới sự phiên mã và hậu phiên mã. Tuy nhiên trong số 35 biến đổi IVS6, có 3 biến đổi chèn thêm nucleotid trên đoạn gen là g.14245-14246insG, g.14247-14248insG và g.14251-14252insG (bảng 3.4).

** Tỷ lệ các biến đổi phối hợp của gen TP53*

Chúng tôi thống kê tỷ lệ các mẫu ung thư da có các biến đổi phối hợp của từng đoạn gen và trên toàn bộ gen *TP53* đã phân tích. Hầu hết các mẫu ung thư da các loại đều có từ 2 biến đổi trở lên.

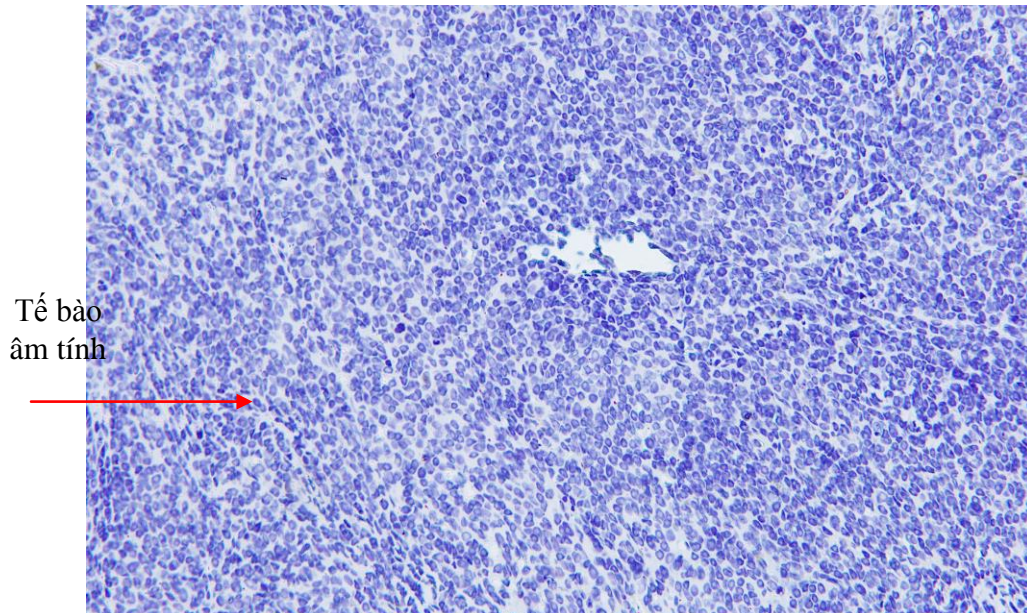
Bảng 3.11. Biến đổi phối hợp các điểm trên gen *TP53* ở các loại ung thư da

Số biến đổi phối hợp	UT TB đáy (n=21)	UT TB vảy (n=21)	UT TB hắc tố (n=21)	Tổng (n=63)	
				n	%
1	4	0	0	4	6,3
2	7	5	0	12	19,0
3	1	3	0	4	6,3
4	1	4	0	5	7,9
5	1	4	0	5	7,9
6	6	0	0	6	9,5
9	0	1	0	1	1,6
10	0	0	21	21	33,3
13	1	0	0	1	1,6
14	0	1	0	1	1,6
15	0	1	0	1	1,6
19	0	2	0	2	3,2
Tổng	21	21	21	63	100

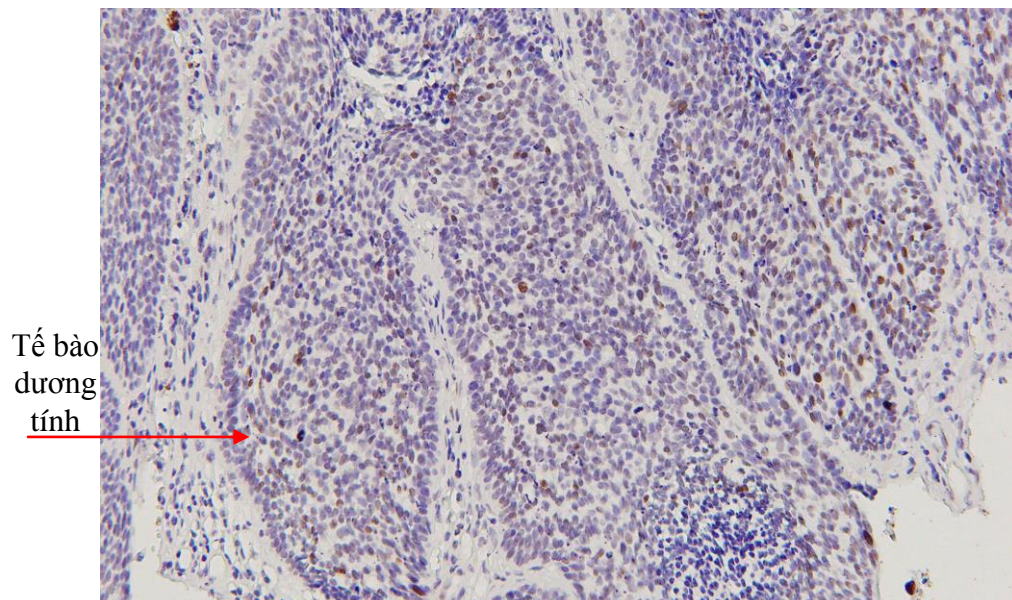
Kết quả ở bảng trên cho thấy có tới 93,7% các mẫu ung thư da có từ 2 biến đổi trở lên trên gen *TP53*, trong đó có 41,3% có từ 10 biến đổi trở lên và có 2 mẫu ung thư da tế bào vảy có tới 19 biến đổi trên gen *TP53*.

3.2.2. Kết quả xác định biểu lộ protein p53 đột biến bằng phương pháp hóa mô miễn dịch

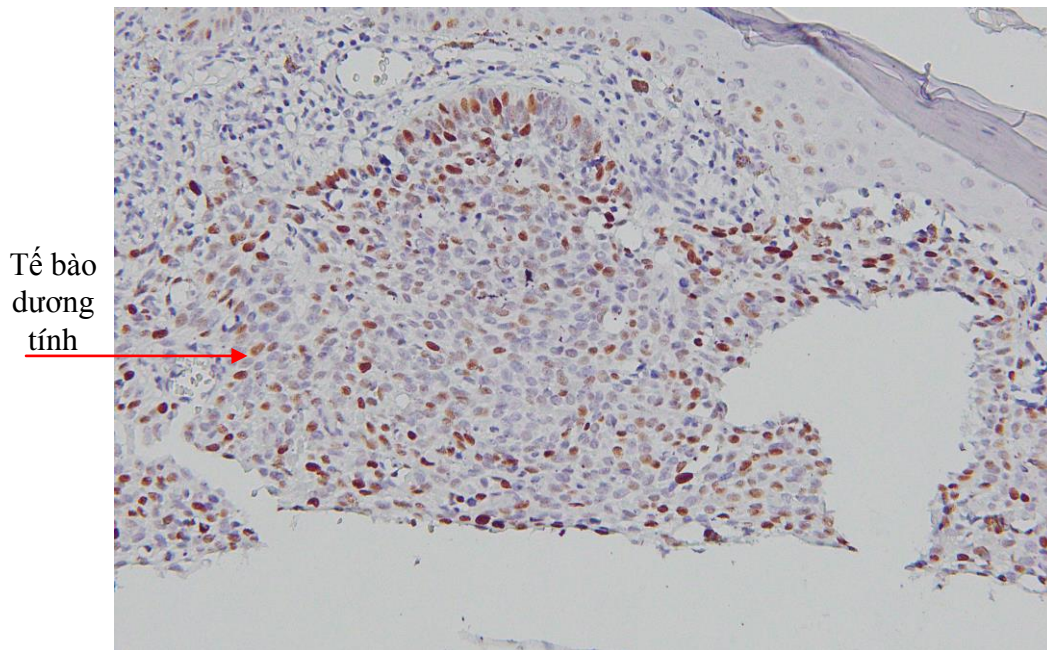
3.2.2.1. Một số hình ảnh đột biến protein p53 trong mô ung thư da.



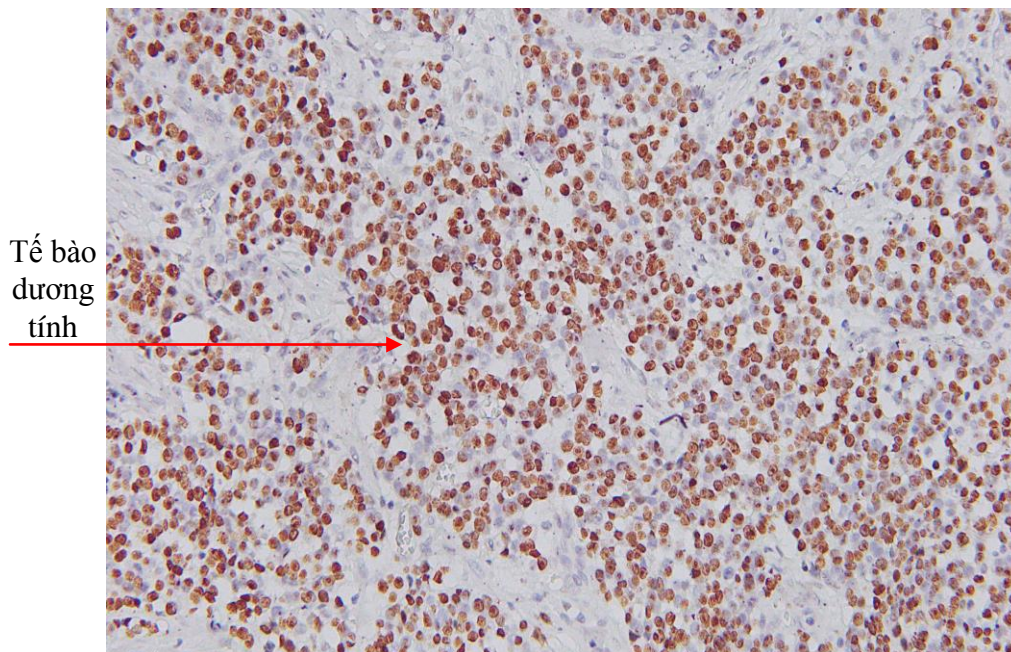
Hình 3.13. Hình ảnh biểu lộ protein p53 âm tính
(độ phóng đại 200 lần)



Hình 3.14. Hình ảnh biểu lộ protein p53 dương tính (+)
(độ phóng đại 200 lần)



**Hình 3.15. Hình ảnh biểu lộ protein p53 dương tính (++)
(độ phóng đại 200 lần)**



**Hình 3.16. Hình ảnh biểu lộ protein p53 dương tính (+++)
(độ phóng đại 200 lần)**

3.2.2.2. Kết quả xác định protein p53 đột biến trong mô ung thư da

Bảng 3.12. Tỷ lệ biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da

Các loại UT da	Số lượng	Đột biến gen <i>TP53</i>	Biểu lộ p53 đột biến	Tỷ lệ %
UT TB đáy	21	14	14	66,7
UT TB vảy	21	3	3	14,3
UT TB hắc tố	21	0	0	0
Tổng số	63	17	17	27,0

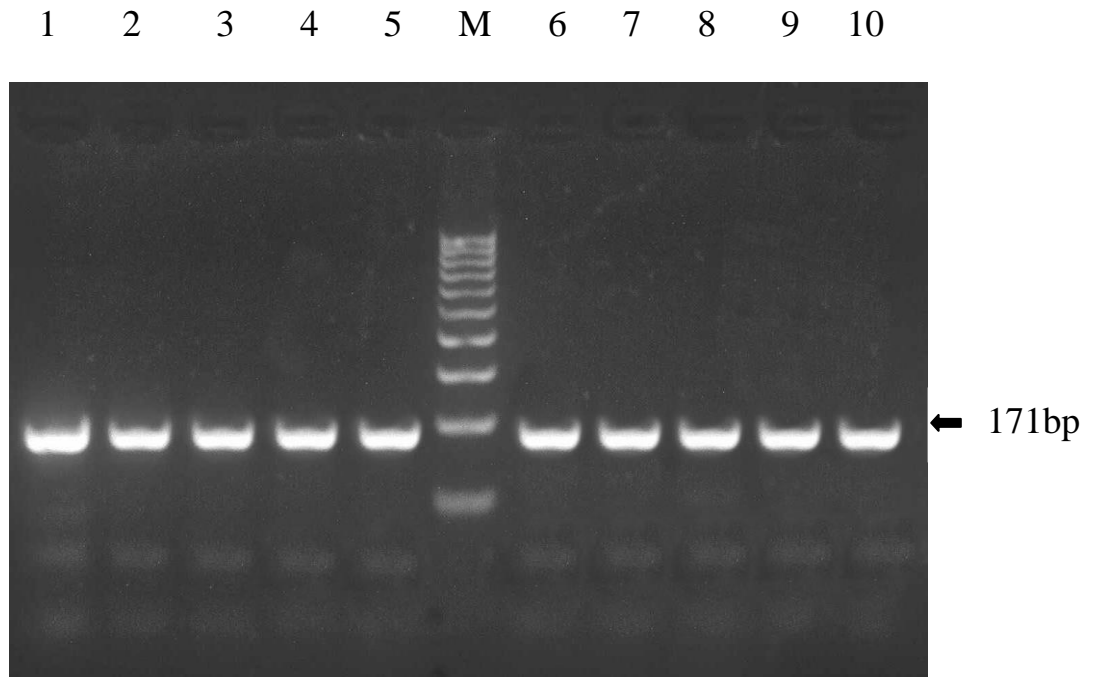
Bảng trên cho thấy, tỷ lệ biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da là 27,0%. Trong đó tỷ lệ đột biến cao nhất là ở loại ung thư tế bào đáy 14/21 mẫu, sau đó là ung thư tế bào vảy 3/21 mẫu, không phát hiện được biểu lộ protein p53 đột biến ở các mẫu ung thư tế bào hắc tố. Ở các mẫu có đột biến gen *TP53* ở các vùng exon thì ở đều có biểu lộ protein p53 trong mô ung thư da. Các mẫu chỉ có biến đổi ở các vùng intron thì không phát hiện được biểu lộ protein p53 đột biến ở trong mô.

3.3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐỘT BIẾN GEN *BRAF* (V600E) Ở CÁC MẪU UNG THƯ DA

3.3.1. Phân tích đột biến gen *BRAF* (V600E) bằng phương pháp giải trình tự gen

3.3.1.1. Kết quả khuếch đại gen *BRAF*

Với các mẫu DNA được tách chiết từ mô ung thư da, chúng tôi tiến hành đồng thời khuếch đại các đoạn gen *TP53* và gen *BRAF*, kết quả thu được đoạn gen *BRAF* có kích thước tương đồng với đoạn gen thiết kế là 171bp (hình 3.17).

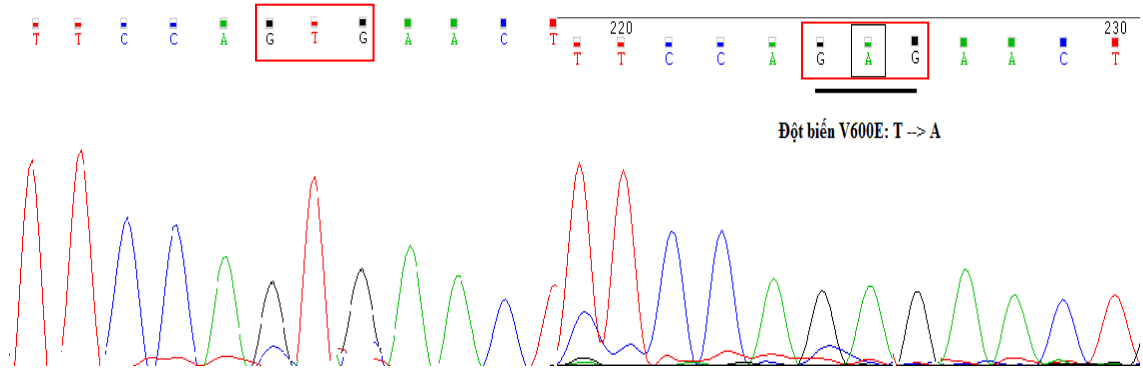


Hình 3.17. Sản phẩm PCR được khuếch đại từ gen *BRAF* (171bp)

Kết quả phân tích biến đổi V600E của gen *BRAF* trong mô ung thư da, tất cả các mẫu ung thư tế bào đáy và ung thư tế bào vảy đều ở dạng wild type (không có đột biến), vị trí codon 600 vẫn là mã GTG, mã hóa cho acid amin Valine (V). Nếu đột biến thì vị trí mã 600, bộ 3 GTG biến đổi nucleotid ở vị trí giữa Thymine → Adenine, tạo thành GAG, mã hóa cho acid amin Glutamate (V600E). Chỉ có 1 mẫu ung thư tế bào hắc tố phát hiện thấy có đột biến V600E. Kết quả phân tích đột biến V600E ở 63 mẫu ung thư da, được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3.13. Tỷ lệ đột biến gen *BRAF* ở các mẫu ung thư da

Các loại UT da	Số lượng	Biến đổi <i>BRAF</i>	Tỷ lệ %
UT TB đáy	21	0	0
UT TB vảy	21	0	0
UT TB hắc tố	21	1	4,8
Tổng số	63	1	1,6



A

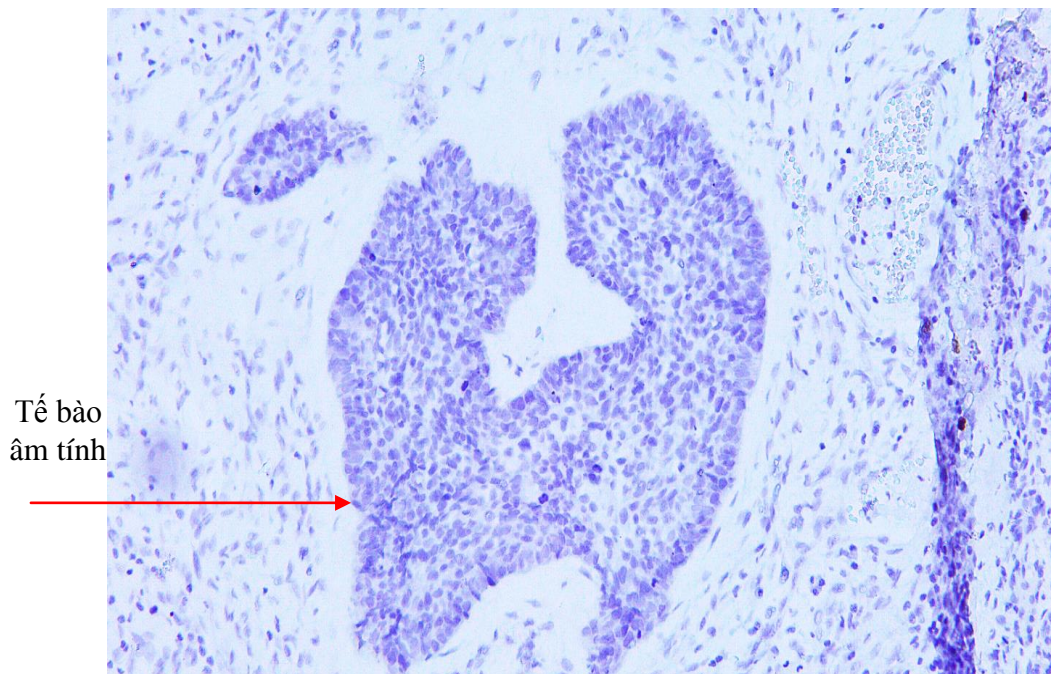
B

A: Wild type (GTG: V600); B: Đột biến $T \rightarrow A$ (GAG: E600)

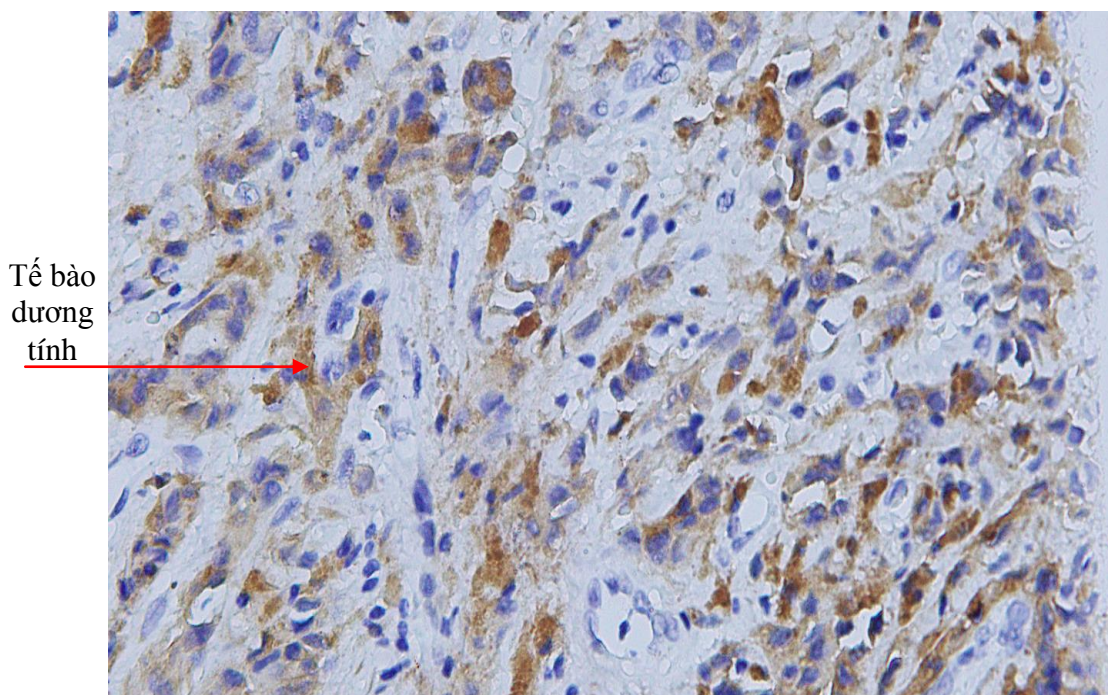
Hình 3.20. Đột biến gen *BRAF* (V600E) ở bệnh nhân ung thư tế bào hắc tố

3.3.2. Kết quả xác định protein *BRAF* (V600E) trong mô ung thư da

3.3.2.1. Hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch đột biến *BRAF*(V600E).



Hình 3.21. Hình ảnh nhuộm HMMD có kết quả đột biến *BRAF*(V600E) âm tính (độ phóng đại 200 lần).



Hình 3.22. Hình ảnh nhuộm HMMD có kết quả đột biến BRAF(V600E) dương tính (độ phóng đại 400 lần)

3.3.2.2. Kết quả biểu lộ protein BRAF đột biến (V600E) trong mô UT da

Bảng 3.14. Tỷ lệ biểu lộ protein BRAF(V600E) đột biến ở các mẫu UT da

Các loại UT da	Số lượng	Đột biến gen BRAF(V600E)	Biểu lộ protein BRAF(V600E)	Tỷ lệ %
UT TB đáy	21	0	0	0
UT TB vảy	21	0	0	0
UT TB hắc tố	21	1	1	4,8
Tổng số	63	1	1	1,6

Kết quả ở bảng trên cho thấy, 63 mẫu ung thư da, trong đó gồm ung thư tế bào đáy, ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào hắc tố, chỉ phát hiện thấy có 1 trường hợp có biểu lộ protein BRAF đột biến V600E ở bệnh nhân

ung thư tế bào hắc tố. Đây cũng là bệnh nhân có đột biến gen *BRAF* (*V600E*), còn các trường hợp không có đột biến gen *BRAF* (*V600E*) thì cũng không thấy biểu lộ protein BRAF (*V600E*) đột biến.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. THÔNG TIN CHUNG VỀ BỆNH NHÂN NGHIÊN CỨU

Cũng như một số bệnh ung thư khác, ung thư da có liên quan đến một số các đặc trưng cá nhân như tuổi, giới, chủng tộc, nơi sinh sống... của bệnh nhân. Các nghiên cứu ở trong nước và ngoài nước đều cho thấy nguy cơ ung thư da đều liên quan đến tuổi tác, người lớn tuổi thường có nguy cơ dễ mắc ung thư da hơn người trẻ tuổi và có khoảng trên 90% bệnh nhân ung thư da xuất hiện ở lứa tuổi 50 và cao hơn nữa [83],[84],[85]. Nghiên cứu của chúng tôi độ tuổi hay mắc ung thư da nhất cũng từ 40 tuổi trở lên, trong đó cao nhất ở lứa tuổi 50 – 59 và trên 70 tuổi có tỷ lệ tương ứng là 33,3% và 31,7%, ở lứa tuổi dưới 40 tỷ lệ ung thư da là thấp nhất 4,8%. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu khác ở một số nước trên thế giới [84],[86],[87],[88]. Điều này cho thấy tuổi đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành và phát triển ung thư da. Các nghiên cứu đều cho thấy ung thư da nói chung và đặc biệt là ung thư tế bào đáy thường có liên quan đến tiếp xúc với ánh sáng mặt trời kéo dài và thường xuyên, giống các yếu tố phơi nhiễm khác, tiếp xúc với ánh sáng mặt trời phụ thuộc vào 2 yếu tố, đó là cường độ tiếp xúc và thời gian tiếp xúc. Độ tuổi trung bình của các bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đương với các nghiên cứu khác ở châu Á [84],[89],[90] nhưng cao hơn so với người da trắng [91],[92]. Điều này hoàn toàn hợp lý, người da trắng thường sống ở các nước phát triển có trình độ hiểu biết về bệnh hơn, do đó có điều kiện và khả năng dự phòng chống nắng tốt hơn. Mặt khác người da trắng thường sống ở các nước phát triển do đó họ có điều kiện bảo vệ và tiếp cận với các cơ sở y tế tốt hơn vì thế tỷ lệ mắc ung thư da của họ cũng thấp hơn.

Các nghiên cứu về ung thư da ở châu Âu, Mỹ và châu Úc đều cho thấy tỷ lệ ung thư ở nam giới cao hơn so với nữ giới [83],[86],[93]. Trong khi đó,

các nghiên cứu ở châu Á đều cho thấy có sự chênh lệch không nhiều giữa nam và nữ [84],[88]. Nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bệnh ở nam và nữ là gần tương đương nhau, tỷ lệ giới nam/nữ trong số bệnh nhân ung thư da là 1,1. Sự khác biệt về tỷ lệ giới tính nam/nữ trong ung thư da có thể do sự khác nhau về màu da cũng như lối sống, khí hậu và thời gian làm việc ngoài trời. Theo các tác giả ở châu Âu nam giới mắc ung thư da nhiều hơn nữ là do nam giới phải làm những công việc ở ngoài trời nắng (công nhân, trồng trọt). Trong khi đó, nữ giới thường làm các công việc ở trong nhà. Còn ở châu Á, có lẽ tỷ lệ phụ nữ làm các công việc ở ngoài trời nắng nhiều nên tỷ lệ mắc bệnh ở nữ có cao hơn ở nam giới. Ở Việt Nam, kết quả nghiên cứu của Hoàng Anh Tuấn, về ung thư da loại tế bào đáy vùng mi mắt cũng cho tỷ lệ nữ/nam là 1,1 [94].

4.2. ĐỘT BIẾN GEN *TP53* TRONG UNG THƯ DA

Trong các nghiên cứu về cơ chế bệnh sinh ung thư nói chung và ung thư da nói riêng thì hướng tiếp cận chính là nghiên cứu về di truyền phân tử nhằm tìm ra các gen gây ung thư hay các tổn thương của hệ di truyền tế bào do các tác nhân tại chỗ hay các tác nhân bên ngoài. Các tác nhân này được truyền vào trong nhân tế bào thông qua các con đường tín hiệu, qua một loạt phản ứng dây chuyền để tác động lên quá trình sao chép DNA và qua đó tham gia sự điều hòa sự tăng sinh và biệt hóa tế bào.

Trong hàng loạt các tác nhân gây biến đổi làm rối loạn phân bào, tăng sinh không giới hạn và rối loạn biệt hóa tế bào thì cơ thể cũng có những cơ chế bảo vệ chống lại sự rối loạn đó. Một trong các yếu tố đó là protein p53 do gen *TP53* mã hóa có hoạt tính chống sự tăng sinh tế bào, sửa chữa các DNA tổn thương ngăn cản sự đột biến tế bào chống biến chuyển ác tính và trong một số trường hợp gây chết tế bào theo chương trình.

Gen *TP53* còn được gọi là gen ức chế khối u, nó nằm trên nhánh ngắn thuộc vùng 1, băng 3 băng phụ 1 của NST số 17 (17p13.1). Gen *TP53* có kích

thước 22.000bp, gồm 11 exon mã hóa cho protein p53 có trọng lượng phân tử 53kDa. Bình thường gen *TP53* ở trạng thái không hoạt động. Gen *TP53* được hoạt động khi có sự sai lệch về vật chất di truyền nhằm [37],[38],[39]:

- Chống tăng sinh tế bào, chống tế bào chuyển ác tính bằng kiểm soát chu kì tế bào, cảm ứng quá trình chết theo chương trình (apoptosis).

- Sửa chữa các tổn thương DNA, ngăn cản sự xuất hiện đột biến của tế bào.

- Kích thích hoạt tính các gen ức chế ung thư khác, được coi là gen đích của gen *TP53*.

Khi có các đột biến gen *TP53* sẽ làm mất chức năng của phân tử protein p53 dẫn đến các tế bào ung thư dễ dàng xuất hiện và phát triển thành mô ung thư. Đột biến gen *TP53* là biến đổi di truyền thường gặp nhất trong các loại ung thư ở người. Do gen *TP53* điều hòa sự ổn định của bộ gen và ngăn cản tế bào bước vào chu trình phân bào khi có tổn thương DNA nên khi gen *TP53* bị đột biến, protein p53 mất chức năng sẽ liên quan đến khả năng ức chế sự phát triển tế bào, do đó sẽ tăng tỷ lệ tế bào sinh sản.

Đột biến gen *TP53* là biến đổi di truyền hay gặp trong nhiều loại ung thư ở người, đặc biệt là các loại ung thư da, phổi, vú và đại tràng... Các đột biến hầu hết là đột biến điểm trong vùng exon 2 đến 9, kết quả làm cho sản phẩm protein của gen bị mất chức năng nhưng nó lại trở nên bền vững hơn và gây tích tụ với một nồng độ cao trong nhân tế bào, tạo ra các sản phẩm gọi là protein p53 đột biến.

Sản phẩm protein p53 được chọn là phân tử của năm 1993, là chìa khóa di truyền của sự phát triển ung thư. Protein p53 có khả năng hạn chế các đột biến xảy ra ở tế bào thông qua tác dụng của nó trên chu kỳ tế bào.

Nghiên cứu này chúng tôi tiến hành song song cả hai kỹ thuật giải trình tự gen *TP53* và kỹ thuật hóa mô miễn dịch trên cùng một mẫu mô để xác định

đột biến. Kỹ thuật giải trình tự gen xác định trình tự các nucleotid trên các đoạn gen *TP53*, từ đó xác định các đột biến và biến đổi trên gen. Kỹ thuật hóa mô miễn dịch để xác định biểu lộ phân tử protein p53 đột biến trong mô của các thể ung thư da hay gặp là ung thư tế bào đáy, ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào hắc tố.

Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn 63 bệnh nhân ung thư da đã được chẩn đoán mô bệnh học, gồm 3 thể ung thư da là ung thư tế bào đáy (21 bệnh nhân), ung thư tế bào vảy (21 bệnh nhân) và ung thư tế bào hắc tố (21 bệnh nhân). Các mẫu mô của bệnh nhân được chiết tách DNA và kiểm tra độ tinh sạch và đứt gãy của phân tử DNA đảm bảo cho phản ứng PCR.

Gen *TP53* được giải trình tự ở 3 đoạn, đoạn 1 từ exon 2 - 4, đoạn 2 từ exon 5 - 6, đoạn 3 từ exon 7 - 9. Khi khuếch đại các đoạn gen *TP53* bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi thu được các sản phẩm theo phân đoạn, exon 2 - 4 là 611 bp, exon 5 - 6 là 378 bp và exon 7 - 9 là 755 bp. Các sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng thang chuẩn DNA và cho kết quả phù hợp với kích thước của đoạn gen đã thiết kế. Với kết quả khuếch đại gen này việc giải trình tự các đoạn gen sau này sẽ đảm bảo đúng đoạn gen cần phân tích.

Sản phẩm của khuếch đại gen *TP53* của các mẫu ung thư da thu được bao gồm trình tự từ exon 2 đến exon 9, trong đó bao gồm cả các đoạn exon và intron (intron1 - IVS1, exon 2, IVS2, exon 3, IVS3, exon 4, IVS4, exon 5, IVS5, exon 6, IVS6, exon 7, IVS 7, exon 8, IVS8, exon 9, IVS9). Đây cũng là các đoạn gen được các tác giả nước ngoài nghiên cứu và cho thấy thường có biến đổi khi bệnh nhân bị ung thư da [95],[96],[97],[98].

4.2.1. Phân loại các biến đổi ở các đoạn gen *TP53*

Khi phân tích gen *TP53* ở các mẫu ung thư da các loại, chúng tôi đều phát hiện được sự biến đổi gen *TP53* ở 100% các mẫu nghiên cứu. Các biến

đôi này phát hiện thấy có cả ở vùng intron (IVS) là vùng không mã hóa và vùng exon là vùng mã hóa chi phối tổng hợp phân tử protein. Đồng thời gặp rất nhiều loại biến đổi nucleotid trên các đoạn gen *TP53* khác nhau, tổng số loại biến đổi chúng tôi gặp là 52 loại. Trong đó, vị trí biến đổi nucleotid xuất hiện trên các đoạn exon là 10 loại, ở vùng intron có đến 42 loại. Các biến đổi phần lớn ở trạng thái đồng hợp tử, một số ít ở trạng thái dị hợp tử, như các biến đổi: g.11827-11828insC (IVS1); g.12139C>G (exon 3); g.13150C>T và g.13151C>T (exon 4); g.13248G>A; g.13451G>C (IVS5); g.14133C>A, g.14183T>C, g.14189T>C và g.14203G>T (IVS6). Biến đổi g.12139C>A ở exon 3 gặp với tỷ lệ khá cao, biến đổi ở exon 4 chỉ có 2 loại thì cả 2 loại này đều gặp dị hợp tử. Tuy nhiên, các biến đổi xảy ra hầu hết là biến đổi phối hợp, nên trong 1 mẫu nếu có biến đổi dị hợp với một exon nào đó thì cũng lại còn một biến đổi ở exon khác.

Với biến đổi trên gen *TP53*, người ta chia 2 loại là:

- Đa hình di truyền là trường hợp biến đổi ở vùng intron và không ảnh hưởng đến các exon tiếp theo hoặc có thay thế hoặc đảo nucleotid nhưng mã di truyền vẫn quy định acid amin như gen hoang dã. Trường hợp này protein do gen quy định không có thay đổi acid amin.

- Đột biến là trường hợp thay đổi trình tự các nucleotid ở trên gen dẫn đến thay đổi các mã di truyền gây ra thay đổi acid amin trong phân tử protein do gen đó quy định. Khi cấu trúc của phân tử protein bị thay đổi, chức năng của phân tử cũng biến đổi, có thể làm hoạt tính của phân tử protein bị giảm hoặc mất đi.

*** *Biến đổi ở các đoạn intron***

Các biến đổi trên vùng intron là các biến đổi đa hình di truyền, các biến đổi này không làm thay đổi cấu trúc và chức năng của phân tử protein. Một số

biến đổi trên vùng intron cũng tác động tới quá trình tổng hợp phân tử protein. Trong các biến đổi xảy ra ở vùng intron, thì chủ yếu gặp ở vùng IVS1, IVS5 và IVS6, các vùng intron còn lại là IVS2, IVS3, IVS4, IVS7, IVS8 đều không phát hiện thấy có biến đổi.

Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy, các biến đổi trên vùng IVS1 có 6 biến đổi, trong đó chủ yếu là biến đổi thay thế và chèn thêm nucleotid xảy ra ở các vị trí g.11818-11819insC, 11874-11875C chiếm tỷ lệ lần lượt là 30,2% và 73,0%, biến đổi chèn thêm nucleotid ở vị trí g11827-11828C có tỷ lệ thấp hơn 6,3% trong các mẫu ung da, biến đổi thay thế nucleotid g.11827C>G, 11849G>A và 11903T>A đều chiếm tỷ lệ khá thấp (1,6%). Đặc biệt biến đổi chèn nucleotid ở vị trí g.11874-11875insC xảy ra 100% ở các các mẫu ung thư tế bào hắc tố.

Các biến đổi nucleoid ở vùng intron hầu hết không ảnh hưởng gì đến biểu hiện gen, nhất là các thay thế, đảo vị trí của nucleotide không gây ra hậu quả gì, loại biến đổi này lại là biến đổi nhiều nhất. Tuy nhiên với các đột biến chèn nucleotide hoặc mất nucleotide thì đôi khi có thể ảnh hưởng đến exon tiếp theo của intron này. Việc cả một vùng của exon 2 trình tự nucleotid không thể so sánh được với trình tự gen gốc cần được nghiên cứu tiếp vì khi tham khảo các nghiên cứu của các tác giả khác thì họ cũng chỉ đưa ra nhận xét là có nhiều biến đổi ở vùng intron chứ không bình luận, liệu có loại nào trong số này có thể gây ảnh hưởng đến exon tiếp theo. Các tác giả cũng chủ yếu phân tích các biến đổi nucleotid ở các vùng exon.

Ở vùng IVS2, IVS3, IVS4 không phát hiện thấy có biến đổi trình tự nucleotid ở tất cả các mẫu ung thư da.

Vùng IVS5, chỉ phát hiện được 1 biến đổi nucleotid vị trí g.13451 thay thế nucleotid Guanine thành Cytosine (g.13451G>C). Biến đổi này cũng chỉ quan sát thấy ở 1 mẫu ung thư tế bào đáy, còn ung thư tế bào vảy và ung thư

tế bào hắc tố đều không phát hiện được.

Các biến đổi xảy ra ở IVS6 gặp với tần suất cao, trong đó ung thư tế bào đáy cũng chiếm chủ yếu các biến đổi ở IVS6, tiếp đó là ung thư tế bào vảy và cuối cùng là ung thư tế bào hắc tố. Mặc dù số lượng các biến đổi IVS6 ở ung thư tế bào hắc tố ít, nhưng là toàn bộ mẫu xảy ra cùng một biến đổi. Trong số 35 biến đổi của vùng IVS6, có 3 biến đổi chèn thêm nucleotid trên đoạn IVS6 của gen là g.14245-14246insG, g.14247-14248insG và g.14251-14252insG, 32 biến đổi là thay thế nucleotid ở các vị trí g.14129C>A, g.14181C>T, g.14133C>A, g.14170T>G, g.14177G>T, g.14187T>G, g.14183T>C, g.14185T>C, g.14189T>C, g.14201T>G, g.14203G>T, g.14236T>C, g.14237T>C, g.14238C>T, g.14239C>T, g.14242T>C, g.14274T>C, g.14276T>C, g.14280C>T, g.14319A>C, g.14320C>A, g.14321A>C, g.14322C>A, g.14322C>T, g.14323T>A, g.14324T>C, g.14325C>A, g.14325A>T, g.14326C>A, g.14328T>C, g.14329A>T g.14243T>C. Những biến đổi thay thế và chèn thêm nucleotid xảy ra ở IVS là vùng không mã hóa vì vậy về lý thuyết sẽ không làm biến đổi các acid amin của phân tử protein.

Các vùng intron IVS7, IVS8 cũng không phát hiện thấy có biến đổi trình tự nucleotid ở tất cả các mẫu ung thư da. Các biến đổi phần lớn là thay thế nucleotid này bằng nucleotid khác, hiện tượng này xảy ra ở hầu hết các đoạn gen được phân tích và tìm thấy biến đổi. Với loại biến đổi chèn nucleotid thì cả 6 loại mà chúng tôi gặp đều ở các vùng intron, 3 loại gặp ở IVS1, 3 loại còn lại gặp ở IVS6. Kết quả này cũng tương tự kết quả của các tác giả khác [97], [99], [100],[101],[102],[103],[104],[105]. Ảnh hưởng của các biến đổi này như thế nào, liệu có gây thay đổi mã di truyền ở exon tiếp theo hay không cần có đánh giá ở các nghiên cứu tiếp theo vì trong nghiên cứu này chúng tôi gặp chủ yếu là các biến đổi phối hợp. Trên 1 bệnh nhân có thể gặp nhiều biến đổi nucleotide ở các vị trí khác nhau, cả trên intron đồng thời lại có cả ở exon nên chưa đưa ra

được nhận xét gì về các thay đổi chèn thêm nucleotid ở các vùng intron. Có lẽ các tác giả nghiên cứu trước đây cũng gặp tình trạng tương tự nên nhìn chung họ đều chỉ tập trung bàn và phân tích các biến đổi nucleotid ở các vùng exon.

*** *Biến đổi ở các đoạn exon***

Khi giải trình tự gen *TP53* các đoạn từ exon 2 đến exon 9 ở các mẫu mô bệnh nhân ung da, đây là vùng thường xảy ra đột biến của gen *TP53* [101],[103],[104],[105],[106]. Kết quả chúng tôi phát hiện 10 vị trí biến đổi nucleotid nằm rải rác trên các đoạn exon. Các biến đổi là các đột biến điểm xảy ra ở exon 3, exon 4 và exon 6, không thấy các biến đổi ở exon 2, exon 5 và exon 7 đến exon 9.

Trong các biến đổi ở exon, khi so sánh với genebank, ở 10 loại biến đổi phát hiện được, chúng tôi thấy có 8 biến đổi nucleotid có sự thay đổi acid amin trong phân tử protein, đây chính là các đột biến của gen *TP53*. Có 2 loại biến đổi thay thế nucleotid tại vị trí g.13150C>T ở exon 4 và g14062C>A, cả 2 biến đổi này đều không gây ra sự thay đổi acid amin của phân tử protein.

Ở đoạn exon 3, có 5 vị trí đột biến, tất cả các đột biến này đều là đột biến thay thế các nucleotid, sự thay thế này đều làm thay đổi acid amin trên phân tử protein. Ở vị trí g.12072 của gen *TP53* Adenine được thay thế bằng Guanine (g.12112A>G) dẫn đến acid amin ở vị trí 63 biến đổi từ Alanin thành Serine (p.A63S). Tương tự như vậy ở vị trí g.12139 biến đổi Cytosine được thay thế bằng Adenine (g12139C>A), làm cho acid amin ở vị trí 72 bị biến đổi từ Proline hoặc Histamine (p.P72H). Vị trí g12143T>A trên gen *TP53* bị thay thế Thymine bằng Adenine làm phân tử protein bị đột biến ở acid amin 73 chuyển Valine thành Glutamate (p.V73E). Vị trí g.12145 của gen Guanine thay thế bằng Thymine (g12145G>T), sự thay thế này làm thay đổi acid amin ở vị trí 74 Alanine thành Serine (p.A74S). Tại vị trí g12239, thay thế nucleotid Guanine bằng Adenine (g.12239G>A), làm biến đổi acid amin ở vị

trí 105 Glycine thành Apartate (p.G105D).

Trong đoạn exon 4, xảy ra 2 vị trí đột biến, trong đó chỉ 1 vị trí đột biến làm thay đổi acid amin đó là vị trí g.13151 Cytosine bị thay thế bằng Thymine, làm cho phân tử protein ở vị trí 158 bị biến đổi acid amin từ Arginin thành Cysteine (p.A158C). Vị trí g.13150 cũng bị thay thế nucleotid Cytosine thành Thymine làm thay đổi bộ ba GTC thành GTT, nhưng không làm thay đổi acid amin vì cả hai bộ ba này đều mã hóa cho Valine.

Đoạn exon 6 của gen *TP53*, có 3 vị trí đột biến, là vị trí g.14049 được thay thế nucleotid Cytosine bằng Thymine, làm cho acid amin biến đổi Senine thành phenylalanine (p.S241F), còn vị trí g.14060 nucleotid Guanine được thay thế bằng Thymine làm biến đổi acid amin ở vị trí 245 thay thế acid amin Glycine thành Cysteine (p.G245C). Tại vị trí g.14062, Cytosine được thay thế bằng Adenine, bộ ba mã hóa GGC chuyển thành GGA, nhưng không làm thay đổi acid amin của phân tử protein vì cả hai bộ ba này đều mã hóa cho acid amin Glycine (p.G245G). Cũng tại exon này, có mẫu đồng thời xảy ra hai đột biến ở vị trí g.14060 và g.14062 của gen dẫn đến thay đổi trên cDNA là c.733G>T và c.735C>A, đột biến này xảy ra tại 1 codon, GGC mã hóa cho acid amin Glycine (G) bị biến đổi thành TGA là mã kết thúc (X). Trường hợp này, sự biến đổi trong phân tử protein là nhiều vì gen sẽ ngừng lại, kết thúc ngay khi xuất hiện đột biến.

Nghiên cứu của Forbes S. và cs [107] cũng ở các bệnh nhân ung thư tế bào vảy vùng đầu, cổ thấy các đột biến hay gặp ở gen *TP53* dẫn đến thay đổi các acid amin là Arg175His, Glu180Fs, Ser183Stop, Gln52InF, His179Arg, His193Leu, Gly266Arg, và một số đột biến ít gặp khác.

Một nghiên cứu khác là của Telmer C. A. và cs [108] cũng tiến hành ở các bệnh nhân ung thư tế bào vảy vùng đầu, cổ thấy các đột biến hay gặp ở gen *TP53* làm biến đổi các acid amin ở các vị trí: Arg306Stop, Thr155Pro,

His179Tyr, Arg248Gln, Arg175His, Arg273His, Pro151His, Glu224Stop, Arg282Trp, Thr155Pro, Glu294Stop, Arg2880Thr, Ile195Phe, Arg248Gln, His179Asn, Pro177Arg.

Cùng nghiên cứu ở một loại bệnh nhân ung thư tế bào vảy vùng đầu, cổ, tuy nhiên các biến đổi mà theo Viros A. và cs, Forbes S. và cs và của Telmer C. A. và cs cho thấy các đột biến trên gen *TP53* ở các nghiên cứu của tác giả hầu hết là khác nhau. Trong nhiều đột biến mà các tác giả này đề cập chỉ có đột biến Arg175His là cả 3 tác giả đều cùng phát hiện thấy, đột biến Pro151His thì cả Viros A. và Telmer C. A. cùng phát hiện thấy, các đột biến còn lại chỉ có 1 tác giả đề cập [107],[108],[109].

Năm 2007, Thierry Soussi [110] khi thống kê nhiều báo cáo nghiên cứu về biến đổi gen *TP53* ở các bệnh nhân ung thư tế bào vảy vùng đầu, cổ của các tác giả khác nhau, tiến hành nghiên cứu ở các địa điểm khác nhau và thấy 64 loại biến đổi ở gen *TP53* đã được phát hiện, tuy nhiên chỉ có 20 biến đổi là có từ 2 nghiên cứu trở lên cùng phát hiện thấy, có tới 44 biến đổi chỉ gặp trong 1 nghiên cứu. Như vậy, biến đổi của gen *TP53* rất đa dạng, rất có thể nó những biến đổi phụ thuộc vào chủng tộc người khác nhau và địa dư khác nhau thì có các biến đổi khác nhau.

Có lẽ với các lý do trên mà các biến đổi ở gen *TP53* trong nghiên cứu của chúng tôi vẫn có một số biến đổi không giống với các tác giả khác. Trong 10 đột biến mà chúng tôi phát hiện thấy ở vùng exon thì có 8 đột biến, 2 đột biến còn lại mặc dù có thay đổi nucleotide nhưng không thay đổi acid amin nên không gây biến đổi ở protein, đây là các đột biến câm lặng. Trong 10 đột biến mà chúng tôi phát hiện thấy ở bệnh nhân ung thư da thì có 6 đột biến là đã được nhiều nghiên cứu trước đó đề cập đến đó là:

Đột biến Ser241Phe (p.S241F) và Gly245Cys (p.G245C) ở exon 6. Đột biến p.S241F đã được nhiều tác giả nghiên cứu ở những bệnh nhân ung thư

da, ung thư đại trực tràng và một số ung thư khác phát hiện thấy như: Rodrigues N. R.và cs (1990) [111], Weiss J.và cs [112], Kastrinakis W. V.và cs (1995) [113], Rieger K. M.và cs (1995) [114], Van Gele M.và cs (2000) [115]. Đột biến p.G245C đã được các tác giả: Mitsudomi T.và cs (1992) [116], Forbes S. và cs (2006) [107] nghiên cứu ở bệnh nhân ung thư da và các ung thư khác phát hiện thấy. Nghiên cứu của Guiseppina Giglia Mari và Alanin Sarasin (2003) [117] cũng phát hiện thấy đột biến p.G245C của gen *TP53* ở những bệnh nhân ung thư da.

Đột biến c.472C>T (p.R158C) ở exon 4 cũng đã được đề cập trong bảng danh mục về đột biến trong ung thư [44] của Anh với code Cosm 87549. Đồng thời cũng trong bảng danh mục này biến đổi câm lặng c.471C>T (p.V157V) ở exon 4 do thay thế nucleotid Thymine bằng Cytosine, mã hoang đã là GTC nay đổi thành GTT nhưng acid amin vẫn là Valine, trong nghiên cứu của chúng tôi phát hiện thấy thì trong catalogue cũng đề cập đến là biến đổi có thể có ở bệnh nhân ung thư da với mã số là Cosm44526 [118].

Hai đột biến c.733G>T và c.735C>A, 2 thay đổi nucleotid ở 2 vị trí khác nhau nhưng đều ở một mã khi cùng xuất hiện dẫn đến tạo thành mã kết thúc, đột biến trên phân tử protein là p.G245X, kết quả làm cho gen bị ngăn lại, kết thúc ngay ở nơi xảy ra đột biến. Loại đột biến này xuất hiện ở exon 6 của gen *TP53* cũng đã được Guiseppina Giglia Mari và Alanin Sarasin (2003) đề cập trong nghiên cứu ở các bệnh nhân bị ung thư da [117].

Các đột biến gen *TP53*, làm thay đổi cấu trúc phân tử protein p53, tùy từng điểm đột biến khác nhau, có thể ảnh hưởng đến cấu hình không gian khác nhau của phân tử protein, từ đó ảnh hưởng đến chức năng của phân tử protein [119]. Các nghiên cứu hầu hết chưa chỉ rõ được biến đổi chức năng cụ thể của phân tử protein với các điểm đột biến. Một số nghiên cứu đã tập trung vào từng vị trí đột biến của gen *TP53* nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của các đột

biến đến chức năng của phân tử protein p53 và mối liên quan của các điểm đột biến với các loại ung thư [120], [121]. Nghiên cứu của Dong Z. và đã chỉ ra đột biến gen *TP53* ở vị trí codon 72 có liên quan đến ung thư đại trực tràng, ung thư biểu mô tế bào vảy [120]. Nghiên cứu của Zampiga V. cho thấy có mối liên quan đột biến gen *TP53* ở codon 175 có liên quan đến hội chứng Li – Fraumeni [122]. Mastellaro M.J cũng có kết luận có mối liên quan giữa đột biến gen *TP53* tại codon 337 có mối liên quan đến khối u vỏ thượng thận ở trẻ em [121]. Đột biến ở exon 3 c.215C>A dẫn đến thay đổi acid amin ở phân tử protein của p53 là p.P72H mà chúng tôi thấy trong nghiên cứu này cũng đã được nhiều tác giả đề cập như Zafeirious D. I. và cs (2001)... [119] phát hiện khi nghiên cứu ở những bệnh nhi bị ung thư da. Khi tìm ra được mối liên quan của các loại ung thư với từng điểm đột biến, các nhà khoa học có thể tìm được các chất gắn với điểm đột biến nhằm khôi phục chức năng gen *TP53*, từ đó góp phần vào điều trị hỗ trợ ung thư.

Như vậy trong 10 đột biến của protein p53 mà chúng tôi phát hiện thấy ở bệnh nhân ung thư da, có 6 đột biến đã được một số tác giả khác đề cập là p.P72H, p.V157V, p.R158C, p.S241F, p.G245C, p.G245G, 4 đột biến còn lại chỉ thấy ở trong nghiên cứu của chúng tôi là p.A63S, p.V73E, p.A74S, p.G105D. Trong 2 đột biến thay thế nucleotid mà không gây biến đổi acid amin của phân tử protein, một đột biến ở exon 4 (c.471C>T: biểu hiện trên protein là p.V157V) và một ở exon 6 c.735C>A (ở protein là p.G245G) thì đột biến ở exon 4 đã được đề cập trong bảng danh mục về đột biến ở bệnh nhân ung thư [118], đột biến ở exon 6 là c.735C>A (biểu hiện trên protein là p.G245G) cũng đã được Guiseppina Giglia Mari và Alanin Sarasin (2003) đề cập trong nghiên cứu ở các bệnh nhân bị ung thư da [117].

Các đột biến p.A63S, p.V73E, p.A74S và p.G105D tuy chưa được các tác giả khác đề cập nhưng khi các đột biến có gây thay đổi acid amin trong

phân tử protein thì đều có ảnh hưởng đến kiểu hình phân tử protein của cá thể mang đột biến đó.

Tóm lại kết quả nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện được 100% bệnh nhân ung thư da có biến đổi gen *TP53*. Trong đó đột biến ở vùng exon chiếm 27%, biến đổi ở vùng intron chiếm 95,2%, xảy ra cả đột biến vùng exon và biến đổi ở vùng intron là 22,2%. Xác định được 52 loại biến đổi nucleotide trên gen *TP53*, trong đó có 10 đột biến ở vùng exon và 42 biến đổi ở vùng intron. Trong 10 đột biến ở vùng exon có 5 đột biến ở exon 3, 2 đột biến ở exon 4 và 3 đột biến ở exon 6, các vùng exon 2, exon 5, exon 7, exon 8 và exon 9 không phát hiện có đột biến. 10 đột biến ở vùng exon thì có 6 đột biến đã được nhiều tác giả khác công bố ở các mẫu ung thư da các loại, 4 đột biến chỉ gặp trong nghiên cứu của chúng tôi. Trong các đột biến ở vùng exon, thì có 8 đột biến là thay đổi acid amin của phân tử protein còn 2 đột biến không làm thay đổi acid amin của phân tử protein p53, đây là những đột biến câm lặng. Trong 42 biến đổi ở vùng intron thì ở IVS1 có 6 biến đổi, IVS5 có 1 biến đổi, IVS6 có tới 35 biến đổi, các vùng IVS2, IVS3, IVS4, IVS7 và IVS8 không phát hiện có biến đổi gen *TP53*.

4.2.2. Về tỷ lệ biến đổi gen *TP53* ở trong ung thư da

Trong các đoạn gen *TP53* đã phân tích ở các mẫu ung thư da, tỷ lệ các mẫu ung thư da có đột biến gen *TP53* là 100%, trong đó ở các đoạn exon tỷ lệ đột biến là 27,0%, chủ yếu là các đột biến xảy ra ở exon 3, exon 4 và exon 6. Trong các đột biến này, đoạn hay xảy ra đột biến là exon 3 và exon 6 với tỷ lệ gặp ở các mẫu lần lượt là 25,4% và 12,7%, đoạn exon 4 chỉ gặp 1 mẫu có đột biến ở bệnh nhân ung thư tế bào đáy chiếm 1,6%. Các đoạn exon 2, exon 5 và exon 7 đến 9 không phát hiện thấy đột biến. Biến đổi ở các đoạn intron xảy ra ở hầu hết các mẫu ung thư da chiếm 95,2%, các đoạn có nhiều mẫu biến đổi chủ yếu là IVS1, và IVS6, tỷ lệ biến đổi chung cho các loại ung thư da tương

ứng là 85,7%, và 82,5%, đoạn IVS5 có tỷ lệ biến đổi tỷ lệ biến đổi thấp nhất là 1,6%. Các đoạn IVS2, IVS3, IVS4 và IVS7, IVS8 không thấy có biến đổi. Biến đổi phối hợp các đoạn exon và intron của gen *TP53* chiếm tỷ lệ 22,2%.

Theo Viros A. [109], các đột biến gen *TP53* gặp ở bệnh nhân ung thư da có (His39Tyr, Ser124Phe, Arg245Cis, Arg270Cis, Cis272Gly) với tần số 40%. Burns J. E. và cs [121] nghiên cứu ở các bệnh nhân ung thư tế bào vảy vùng đầu, cổ thấy các đột biến hay gặp là Trp146X, Ile332InF, Leu308Fs, Arg282Pro, Val173InF, Tyr126InF, Gln192Stop, Pro151His, Val216Gly, Glu258Lys, Glu224Fs, Arg209Fs, Arg175His, Pro151Ser, và nhiều đột biến khác nữa ít gặp hơn.

4.2.3. Biến đổi gen *TP53* ở trong từng loại ung thư da

Ở các mẫu ung thư tế bào đáy, các biến đổi gen *TP53* gặp ở 6 đoạn IVS1, Exon3, exon4, IVS5, exon6 và IVS6, các biến đổi tập trung ở các đoạn IVS1, exon 3, IVS6 và exon 6 với tỷ lệ lần lượt là 57,1%, 61,9%, 71,4%, và 38,1% . Biến đổi xảy ra ở vùng IVS5 và exon 6 chỉ gặp ở 1 mẫu và đều chiếm tỷ lệ 1,6%. Đối với mẫu ung thư tế bào vảy, biến đổi gen *TP53* xảy ra ở 3 đoạn IVS1, exon3 và IVS6, trong đó đoạn IVS1 có biến đổi xảy ra ở tất cả các mẫu ung thư tế bào vảy, đoạn IVS6 cũng có tỷ lệ biến đổi cao là 76,2% và biến đổi ở đoạn exon 3 có tỷ lệ 14,3%, các đoạn còn lại không phát hiện thấy có biến đổi. Đối với ung thư tế bào hắc tố, biến đổi chỉ xảy ra ở 2 đoạn là IVS1, IVS6 và xảy ra ở tất cả các mẫu, chiếm tỷ lệ 100%.

Nếu chỉ đề cập đến các biến đổi là các đột biến ở exon thì với ung thư tế bào đáy, tỷ lệ mẫu có đột biến ở exon 3 đã là 61,9%, ở exon 6 là 38,1%, ở exon 4 là 4,8%. Trong khi đó ung thư tế bào vảy chỉ có 14,3% mẫu có đột biến ở exon 3, không phát hiện thấy mẫu nào có đột biến ở exon 4 và exon 6. Với ung thư tế bào hắc tố thì chỉ thấy những biến đổi ở intron, không thấy những đột biến ở exon.

Biến đổi gen *TP53* gặp chủ yếu ở ung thư tế bào đáy, cũng đã được nhiều tác giả đề cập [96],[98],[101],[102],[103]. Với các nghiên cứu của các tác giả này cho thấy đột biến ở vùng exon 3 trên gen *TP53* gặp với tỷ lệ 71,1% số mẫu, trong đó loại đột biến g.12139C>G (c.215C>G) chiếm tỷ lệ chủ yếu, có tới 51,3% các mẫu ung thư tế bào đáy bị đột biến ở dạng này.

Với exon 4 chúng tôi phát hiện có 1 mẫu có đột biến ở exon 4, ở mẫu này đột biến ở cả 2 vị trí, tuy nhiên ở trạng thái dị hợp tử. Hai vị trí đột biến sát nhau trên gen là g.13150C>T và g.13151C>T, nhưng thuộc hai bộ ba mã hóa hai acid amin khác nhau. Tuy nhiên, loại đột biến ở vị trí g.13150C>T thì không gây thay đổi acid amin trên phân tử protein, đây là các đột biến câm lặng.

Đột biến ở exon 6 chỉ xuất hiện ở các mẫu ung thư tế bào đáy. Không thấy đột biến exon 6 đối với các mẫu ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào hắc tố. Các đột biến exon 6 của các mẫu ung thư tế bào đáy đều là đột biến hoàn toàn, các đột biến này gây thay đổi trình tự mã hóa các acid amin. Có 7 mẫu bị đột biến đồng thời ở cả hai vị trí g.14060G>T và g.14062C>A, hai vị trí này trên exon 6 liên quan đến 1 bộ ba mã hóa 1 acid amin là Glycine (GGC), khi đồng thời hai đột biến xảy ra, bộ ba mã này bị đổi thành TGA, chuyển thành mã kết thúc.

Trong các biến đổi ở các đoạn gen *TP53*, có một biến đổi xảy ra ở nhiều mẫu và có nhiều mẫu cùng bị một biến đổi. Bên cạnh các biến đổi ở trên các vùng có sao mã exon, chúng tôi cũng gặp nhiều biến đổi ở các vùng intron. Các biến đổi ở vùng intron hầu hết là không gây hậu quả gì. Tuy nhiên có rất ít các trường hợp biến đổi ở vùng intron nhưng lại làm cho vùng không mã hóa này có thể mã hóa và biến đổi này cũng gây nên các biểu hiện khác thường.

Một bệnh nhân có thể có nhiều biến đổi xảy ra, loại biến đổi kết hợp

hay gặp nhất là biến đổi IVS1 và IVS6, đây cũng là 2 đoạn của gen có tỷ lệ biến đổi cao, loại biến đổi phối hợp này gặp ở cả ung thư tế bào đáy, tế bào vảy và ung thư tế bào hắc tố. Biến đổi phối hợp ở IVS1 và IVS6 là biến đổi hay gặp cũng được một số tác giả khác đề cập [96],[102],[103]. Loại biến đổi hay gặp tiếp theo là biến đổi IVS1 và IVS6 và exon 3. Các loại biến đổi phối hợp khác gặp với tỷ lệ ít.

Tuy nhiên, hầu hết các mẫu ung thư da các loại đều có từ 2 biến đổi trở lên, thậm chí có mẫu biến đổi tới 19 vị trí trên gen *TP53*. Các biến đổi phối hợp có thể ở 1 vùng nào đó trên gen *TP53*, nhưng cũng có thể đồng thời xuất hiện ở nhiều vùng khác nhau. Nhiều nghiên cứu đã đề cập đến sự phối hợp của các biến đổi gen *TP53* trong ung thư như Ye X. H. và cs (2014) cho thấy sự tích lũy các biến đổi gen *TP53* ở codon 72, phối hợp với biến đổi ở các đoạn intron 3 và intron 6, làm tăng nguy cơ ung thư [124].

4.2.4. Phân tích biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng đồng thời hai phương pháp là giải trình tự gen để xác định đột biến gen *TP53* và nhuộm hóa mô miễn dịch để phát hiện protein p53 đột biến trong mô ung thư da. Bình thường, protein p53 có đời sống bán hủy ngắn và không phát hiện được bằng phương pháp hóa mô miễn dịch, nhưng khi gen này bị đột biến sẽ có đời sống bán hủy kéo dài hơn và có thể phát hiện được bằng hóa mô miễn dịch. Chính vì vậy, các nhà sản xuất đã cho ra hai loại chế phẩm là xác định biểu lộ protein p53 và protein p53 đột biến trong mô ung thư. Chúng tôi đã chọn phương pháp xác định protein p53 đột biến trong mô ung thư da để có kết quả so sánh với kết quả đột biến gen *TP53*. Từ đó có thể rút ra được sự tương đồng và khác biệt cũng như kết quả của hai phương pháp giúp đưa ra gợi ý cho các nhà lâm sàng về việc sử dụng kỹ thuật nào để xác định đột biến gen *TP53* trong mô ung thư.

Nghiên cứu này chúng tôi tiến hành nhuộm hóa mô miễn dịch với 63 mẫu ung thư da gồm 3 loại là ung thư tế bào đáy, ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào hắc tố (mỗi loại 21 mẫu) để phát hiện sự biểu lộ protein p53 đột biến. Kết quả thu được có 17 mẫu có kết quả dương tính chiếm 27,0% tổng số mẫu ung thư da. Trong đó tỷ lệ biểu lộ protein p53 đột biến ở loại ung thư tế bào đáy là cao nhất (chiếm 66,7% trong số bệnh nhân ung thư da loại tế bào đáy) và chiếm 14,3% trong ung thư tế bào vảy. Ở ung thư tế bào hắc tố không thấy có biểu lộ protein p53 đột biến.

Một điều thú vị là những mẫu có đột biến gen *TP53* ở các đoạn exon thì chúng tôi đều thấy có biểu lộ protein p53 đột biến ở mô ung thư da. Những mẫu không có đột biến ở các exon, mà có biến đổi ở các đoạn intron thì đều không thấy biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da. Trong số các đột biến ở đoạn exon, có 2 biến đổi không làm thay đổi acid amin, nhưng các biến đổi này lại kết hợp với các biến đổi ở vị trí khác nên kết quả mẫu đó vẫn dương tính với protein p53 đột biến. Điều này cho thấy có sự phù hợp về mặt chức năng của các đoạn gen khi tham gia vào quá trình tổng hợp protein, chỉ những đoạn exon mới tham gia làm khuôn mẫu để tổng hợp phân tử protein, những đoạn intron không tham gia làm khuôn mẫu để tổng hợp protein nên khi có biến đổi ở đoạn intron sẽ không gây nên sự thay đổi trình tự acid amin trên phân tử protein. Chính vì vậy những biến đổi intron được xác định bằng phương pháp giải trình tự gen mà không có biến đổi ở đoạn exon thì cũng không có biểu lộ protein đột biến trong mô ung thư da.

Kết quả của chúng tôi cũng tương tự như kết quả của Lê Đức Minh [16] nghiên cứu biểu lộ protein p53 đột biến trong mô 131 bệnh nhân ung thư da loại tế bào đáy cho thấy tỷ lệ dương tính là 24,4%. Một số tác giả nghiên cứu sự biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư khác như kết quả nghiên cứu của Tạ Văn Tờ cho thấy tỷ lệ protein p53 đột biến dương tính trong mô

ung thư biểu mô tuyến vú là 42,1% (n=95) và sự biểu lộ này tăng dần theo độ mô học. Việc tìm hiểu mối liên quan giữa đột biến gen *TP53* và sự biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư là cần thiết, kết quả này sẽ giúp các nhà lâm sàng có thể lựa chọn kỹ thuật giải trình tự gen để xác định đột biến gen *TP53* hay bằng kỹ thuật đơn giản hơn. Đó là kỹ thuật xác định sự biểu lộ protein p53 đột biến bằng phương pháp hóa mô miễn dịch, đây cũng là xét nghiệm dễ làm hơn, giá thành thấp hơn và cho phép phát hiện sự tích lũy bất thường của protein p53 trong tế bào ung thư.

Trên thế giới nghiên cứu đột biến gen *TP53* và sự biểu lộ protein p53 trong mô ung thư da cũng đã được nhiều tác giả thực hiện trên nhiều đối tượng khác nhau. Venza M. và cs cho rằng sự biểu lộ protein p53 ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào vảy là 46,7% và không có sự khác biệt giữa ung thư da nguyên phát và ung thư da tái phát có di căn [125]. Bukhari M. H. và cs xác định đột biến gen *TP53* và biểu lộ protein p53 đột biến ở 140 mẫu mô sinh thiết da cho thấy cả hai dấu hiệu trên đều không phát hiện được trên da bình thường, nhưng trong ung thư tế bào đáy là 70% và trong ung thư tế bào vảy là 96,25% và đột biến gen *TP53* có liên quan đến sự biểu lộ protein đột biến [126]. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Mlmquist L. M. và cs cho thấy có mối liên quan giữa đột biến gen *TP53* và sự biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da [127]. Như vậy protein p53 là một yếu tố quan trọng trong theo dõi, tiên lượng ung thư da. Những trường hợp đột biến gen *TP53* thường có đáp ứng kém với điều trị hoá chất, do đó xác định tình trạng biểu lộ protein này được dùng để lựa chọn phương pháp điều trị hỗ trợ thích hợp trong ung thư da.

Đột biến gen *TP53* là biến đổi di truyền hay gặp trong nhiều loại ung thư ở người, đặc biệt là các loại ung thư như: ung thư da, phổi, vú và đại tràng... Các đột biến hầu hết là đột biến điểm trong đoạn exon 2 đến 9, kết quả

làm cho sản phẩm protein mất chức năng nhưng nó lại trở nên bền vững hơn và gây tích tụ với một nồng độ cao trong nhân tế bào, tạo ra các sản phẩm gọi là protein p53 đột biến.

Kết quả đột biến gen *TP53* hoặc biểu lộ protein p53 đột biến có thể giúp các nhà lâm sàng can thiệp điều trị khôi phục lại chức năng của protein p53 đột biến cũng như cảm ứng quá trình tế bào chết theo chương trình là một cách đầy hứa hẹn để điều trị bệnh ung thư. Trong thực tế, một số phương pháp điều trị ung thư đã tác động theo cơ chế chết tế bào theo chương trình cũng đang được nghiên cứu và ứng dụng.

Theo nghiên cứu của Aggarwal và CS có thể kích hoạt lại chức năng của protein p53 bị đột biến bằng PEITC (phenethyl isothiocyanate), đặc biệt trong các trường hợp có đột biến ở vùng R175. Nghiên cứu cơ chế cho thấy PEITC gắn vào vị trí đột biến đặc biệt vị trí R175 từ đó khôi phục chức năng của phân tử protein p53 bị đột biến, cảm ứng quá trình chết theo chương trình của tế bào [128].

Nghiên cứu của Zhang M. và CS đã sử dụng các chất ức chế quá trình gắn protein p53 bị đột biến với Mdm2 gây phá vỡ các liên kết này hoặc ức chế các proteasom có thể làm tăng cường hoạt động của các phân tử protein p53 [129].

Nghiên cứu của Fujita Y. và CS cho thấy khôi phục chức năng của protein p53 đột biến bằng các chất có trọng lượng phân tử nhỏ gắn vào vùng đột biến có thể ngăn chặn sự hình thành và phát triển ung thư [130],[131].

Nghiên cứu của Tang X. và CS cũng cho thấy phân tử CP-31398 phục hồi chức năng ức chế khối u của protein p53 và ức chế sự hình thành ung thư da do UVB gây ra ở chuột [132].

Vì vậy, nghiên cứu này của chúng tôi bước đầu góp phần vào việc tìm

ra các điểm đột biến trên gen *TP53*, từ đó có thể có những gợi ý cho các nhà lâm sàng trong việc lựa chọn phương pháp điều trị hỗ trợ mới thay thế hoặc phối hợp với các phương pháp điều trị hỗ trợ hiện nay.

4.3. ĐỘT BIẾN GEN *BRAF* (V600E) Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ DA

Sự phát triển, biệt hóa và sống còn của tế bào bình thường được điều hòa bởi một số lượng giới hạn các con đường tín hiệu. Các con đường tín hiệu truyền và kết hợp các tín hiệu từ ngoại bào như các yếu tố phát triển, hormon, các liên kết tế bào-tế bào, tế bào-khoảng gian bào thông qua các thụ thể trên màng tế bào đi vào bên trong tế bào, rồi tiếp tục qua các protein dẫn truyền trong bào tương để đi vào nhân tế bào. Ở đây, chúng hoạt hóa các gen sao chép dẫn đến sự tăng sinh và biệt hóa tế bào. Các loại protein tín hiệu, protein màng, protein bào tương và protein nhân liên quan đến tăng sinh, biệt hóa tế bào đều là sản phẩm của c-oncogen (proto-oncogen) trong điều kiện bình thường. Khi có sự mất điều hòa hoạt động của chúng, các c-oncogen đột biến trở thành oncogen có thể xuất hiện ung thư và trong tình huống này con đường tín hiệu sẽ trở thành “con đường tín hiệu sinh ung thư”.

Sự mất cân bằng giữa gen sinh ung thư và gen ức chế ung thư, sự hoạt động không phù hợp hoặc sự bất hoạt của các con đường tín hiệu là yếu tố quyết định đối với sự phát triển ung thư ở người. Nhiều gen sinh ung thư và nhiều gen ức chế ung thư cũng hoạt động trong khuôn khổ “con đường tín hiệu sinh ung thư” này [50],[51].

Yếu tố tín hiệu RAF thuộc con đường tín hiệu MAPK có ba đồng dạng là ARAF, BRAF và CRAF. Đồng dạng CRAF biểu lộ khắp nơi trong khi BRAF biểu lộ ở mức cao hơn trong tế bào máu, thần kinh và tinh hoàn [72], BRAF là đồng dạng nổi trội ở tế bào da. Mặc dù tất cả các đồng dạng RAF đều hoạt hoá MEK nhưng chúng được hoạt hoá một cách khác nhau bởi RAS. Theo Peyssonnaud C. và cs thì BRAF có ái tính cao hơn với MEK1 và MEK2

và có nhiều khả năng photphoryl hóa MEK hơn các đồng dạng RAF khác [70],[71],[72]. Sự thay đổi này dẫn đến con đường tín hiệu MAPK bị kích hoạt liên tục và không đáp ứng với sự kiểm soát thông thường.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng tiến hành xác định đột biến BRAF trên bệnh nhân ung thư da các thể ung thư tế bào đáy, ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào hắc tố bằng 2 phương pháp song song nhau, từ đó đánh giá ưu nhược điểm của từng phương pháp và độ tương đồng về kết quả của hai phương pháp. Để xác định đột biến gen *BRAF* (*V600E*) trong mô ung thư da chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen. Để xác định biểu lộ protein BRAF(*V600E*) đột biến trong mô ung thư da chúng tôi sử dụng kỹ thuật hóa mô miễn dịch.

4.3.1. Phân tích đột biến gen *BRAF* (*V600E*) ở bệnh nhân ung thư da

Các mẫu tách chiết DNA từ mô ung thư da của các bệnh nhân được sử dụng đồng thời xác định đột biến gen *TP53* và đột biến gen *BRAF*. Các mẫu sau khi chiết tách DNA đều được tiến hành kiểm tra số lượng và độ tinh sạch của DNA đảm bảo cho phản ứng PCR. Với gen *BRAF* chúng tôi đã tiến hành giải trình tự nucleotid của gen sau đó dùng phần mềm biodit xác định đột biến ở vị trí *V600E*, việc giải trình tự được tiến hành cả theo 2 chiều xuôi và ngược, kỹ thuật giải trình tự và máy móc trang thiết bị cũng được tiến hành với cùng gen *TP53*. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR với gen *BRAF* lên rõ ràng đảm bảo cho chất lượng phân tích trình tự gen *BRAF*. Sau khi thu được sản phẩm khuếch đại đoạn gen *BRAF*, chúng tôi tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự gen *BRAF*. Với trình tự gen *BRAF* thu được, bằng phần mềm Biodit, chúng tôi so sánh với trình tự của gen *BRAF* trên genebank để xác định đột biến *BRAF* (*V600E*).

Đột biến gen *BRAF* trong ung thư nói chung và ung thư da nói riêng thường xảy ra ở vị trí: A1023G (P341P); A1227G (S409S); T1799A

(V600E); A1383G (Q461Q); A1797C (T599T); A1929G (G643G); G2272A (G758R). Trong đó vị trí 1799 T→A làm thay thế acid amin valine bằng glutamate của chuỗi polypeptid (V600E), đột biến này chiếm tỷ lệ khá cao khoảng 80-90% [73].

Đột biến V600E của gen *BRAF* là đột biến ở codon thứ 600, trong đó bộ ba GTG mã hóa cho Valine (V) bị thay thế bởi bộ ba GAG mã hóa cho Glutamate (E), nucleotid Thymine bị thay thế bởi nucleotid Adenine. Đây là đột biến hay gặp nhất trong ung thư da theo kết quả của các tác giả nghiên cứu ở các nước. Về kỹ thuật phân tích chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen là một kỹ thuật đảm bảo chính xác nên việc không phát hiện thấy đột biến gen *BRAF* (V600E) của chúng tôi là tin cậy.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành giải trình tự gen *BRAF* (V600E) trên 63 bệnh nhân ung thư da gồm 3 thể hay gặp là ung thư tế bào đáy, ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào hắc tố. Kết quả chúng tôi phát hiện thấy đột biến V600E của gen *BRAF* ở 1/63 bệnh nhân ung thư da chiếm tỷ lệ 1,6%. Các thể ung thư tế bào đáy và ung thư tế bào vảy không phát hiện thấy có đột biến, 1 bệnh nhân có đột biến gen *BRAF* (V600E) là ở thể ung thư tế bào hắc tố. Các kết quả nghiên cứu về đột biến gen *BRAF* (V600E) cũng rất khác nhau. Các nghiên cứu ở người châu Âu tỷ lệ đột biến gen *BRAF* (V600E) khá cao như nghiên cứu của Paul T.C. và cs đã khám phá rằng biến đổi hoạt tính gen sinh ung thư *BRAF* xảy ra ở 2/3 các u hắc tố ác tính và ở tần suất cao trong các ung thư khác. 70% đột biến gen *BRAF* được tìm thấy ở những bệnh nhân ung thư da [45], trong khi đó nghiên cứu của Hugdah E. và CS cho thấy đột biến gen *BRAF*(V600E) là 35% [134], nghiên cứu của Mar V. J. và CS cho thấy tỷ lệ đột biến này là 39,2% [35]. Các nghiên cứu ở châu Á cho thấy tỷ lệ đột biến gen *BRAF*(V600E) thấp hơn, trong nghiên cứu của Si L. và CS thì tỷ lệ đột biến gen *BRAF* của người Trung Quốc là 25,5%, trong đó đột biến

tại vị trí V600E chiếm 89,1% [136]. Một nghiên cứu khác trên người Đài Loan của Sheen Y. S. và CS, tỷ lệ đột biến gen *BRAF* là 14,3% trong đó đột biến tại vị trí V600E chiếm 88,2% [137]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn các tác giả khác đã nghiên cứu về đột biến gen *BRAF(V600E)*. Đột biến gen *BRAF(V600E)* có tỷ lệ khác nhau có thể do vùng địa lý khác nhau, chủng tộc khác nhau, tập quán sinh hoạt khác nhau. Nghiên cứu của Thomas N. E. và CS cho thấy có mối liên quan giữa đột biến gen *BRAF* với tuổi và màu tóc, tuổi trẻ hơn, màu tóc nâu, vàng có tỷ lệ đột biến gen cao hơn [138]. Vì vậy có thể đây cũng là điểm khác biệt ở Việt Nam so với các nước khác, điều này góp phần giải thích tỷ lệ ung thư da ở Việt Nam không cao.

4.3.2. Xác định biểu lộ protein *BRAF* đột biến ở mô ung thư da

Trên các mẫu đúc parafin chúng tôi tiến hành kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch để xác định sự biểu lộ của protein *BRAF* đột biến V600E. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, với 63 bệnh nhân gồm 3 nhóm ung thư da chủ yếu là ung thư tế bào đáy, ung thư tế bào vảy và ung thư tế bào hắc tố, cũng chỉ có 1 trường hợp có biểu lộ protein *BRAF(V600E)* đột biến là mẫu ung thư tế bào hắc tố. Bệnh nhân dương tính này cũng chính là bệnh nhân có đột biến gen *BRAF (V600E)* ở phương pháp giải trình tự gen. Như vậy kết quả của hai phương pháp này tương đồng với nhau, với các mẫu phương pháp giải trình tự gen xác định là không có đột biến gen *BRAF (V600E)* thì ở phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch cũng cho kết quả âm tính. Vì vậy, để xác định đột biến protein *BRAF (V600E)* có thể dùng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch thay thế cho phương pháp giải trình tự gen. Ưu điểm của phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch là thời gian thực hiện xét nghiệm ít hơn và kinh phí để thực hiện cũng tiết kiệm hơn. Hơn nữa, phương pháp giải trình tự gen là phương pháp phức tạp hơn, đòi hỏi trang thiết bị cao cấp hơn, không thể thực hiện ở các cơ sở xét nghiệm với qui mô nhỏ.

Các nghiên cứu đã khẳng định sự biến đổi gen *BRAF* là dấu ấn quan trọng của kiểu hình lâm sàng và mô bệnh học của ung thư da, đặc biệt là ung thư tế bào hắc tố, nó trở thành một dấu ấn chẩn đoán và tiên lượng có giá trị. Dựa vào việc sử dụng các chất ức chế protein BRAF [139], các nghiên cứu này sẽ góp phần vào việc chẩn đoán sớm cũng như triển vọng điều trị cho bệnh nhân ung thư da từ đó cải thiện thời gian sống thêm của bệnh nhân [140].

Các nghiên cứu cũng phát hiện ra rằng khoảng 50% khối u ác tính có gen *BRAF* đã đột biến hoặc kích hoạt đã tạo ra một hướng mới quan trọng trong điều trị u ác tính. Có 2 loại thuốc ức chế protein BRAF đột biến là Dabrafenib (Tafinlar) và vemurafenib (Zelboraf) đã được FDA chấp thuận cho những người có cả giai đoạn IV và giai đoạn III melanoma mà không thể được phẫu thuật cắt bỏ. Những loại thuốc này, được sử dụng đặc biệt khi trên các bệnh nhân ung thư tế bào hắc tố có đột biến V600E hoặc V600K trong gen *BRAF*. Những loại thuốc này không nên được sử dụng cho những bệnh nhân không có đột biến vì nó không thực sự có hiệu quả [141].

Trong các thử nghiệm lâm sàng cho những người có u ác tính di căn mang gen *BRAF* bị biến đổi, cả hai loại thuốc trên đều có tác dụng làm giảm kích thước khối u ở phần lớn những bệnh nhân này. Vemurafenib cho thấy sự kéo dài sự sống còn của bệnh nhân trung bình gần một năm. Tác dụng của Dabrafenib đối với thời gian sống thêm toàn bộ đã được kiểm chứng chính thức. Dựa trên những thử nghiệm lâm sàng này, cả hai loại thuốc trên đều được chấp thuận sử dụng cho những bệnh nhân có u ác tính giai đoạn III mà không thể loại bỏ được bằng phẫu thuật và cho bệnh nhân khối u ác tính giai đoạn IV, nếu u ác tính có gen *BRAF* bị biến đổi.

Một nghiên cứu gần đây cũng cho thấy, sử dụng phối hợp các chất ức chế protein BRAF với các chất ức chế con đường tín hiệu MAPK, thụ thể

EGFR hay các con đường khác như PIK3 cho hiệu quả cao hơn có ý nghĩa so với chỉ dùng ức chế protein BRAF đơn thuần [142].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ đột biến gen *BRAF* (*V600E*) ở bệnh nhân ung thư da là khá thấp, kết quả này cũng góp phần định hướng cho các nhà lâm sàng cần hướng đến việc tìm các vị trí khác của gen hoặc các nguyên nhân khác, các gen khác góp phần vào cơ chế bệnh sinh trong ung thư da nói chung và ung thư tế bào hắc tố nói riêng. Từ đó tìm ra hướng điều trị hỗ trợ nhằm ức chế các yếu tố gây phát sinh ung thư da.

4.4. MỐI LIÊN QUAN GIỮA BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN VÀ UNG THƯ DA

Ngày nay, hầu hết các tác giả cho ung thư là bệnh di truyền. Các tế bào ung thư đều là những tế bào có đột biến (có thể là đột biến gen hoặc đột biến nhiễm sắc thể), các đột biến này tạo ra các protein bất thường, tác động gây tăng quá trình phân bào. Trong chu kỳ tế bào, trước khi phân bào, ở giai đoạn G1 có sự sửa chữa những sai sót trong di truyền trước khi DNA nhân đôi, sau khi nhân đôi DNA ở giai đoạn G2 cũng có sự sửa chữa các sai sót sau nhân đôi. Do tăng phân bào quá nhiều dẫn đến tế bào không còn khả năng sửa chữa các bất thường trước và sau mỗi quá trình phân bào nên gây ra các loại đột biến và gây hiện tượng quá sản. Do tăng quá nhanh quá trình phân bào, tế bào cũng sẽ không có đủ thời gian trưởng thành từ đó hình thành nên các tế bào bất thường đó chính là các tế bào ung thư.

Có 2 nhóm gen liên quan đến ung thư là nhóm gen gây ung thư (các proto-oncogen) và các gen chống ung thư. Proto-oncogen có 2 loại C-proto oncogen là gen ở trong tế bào và V-oncogen (có nguồn gốc từ virus). Nếu các proto-oncogen chuyển thành oncogen nó sẽ gây ung thư. Nhóm thứ 2 là các gen chống ung thư. Nếu các gen chống ung thư bị đột biến thì nó không còn khả năng khống chế ung thư cũng sẽ gây ung thư.

Với ung thư da gen gây ung thư thường gặp là *RAF* với 3 biến thể (*ARAF*, *BRAF* và *CRAF*), trong đó gen *BRAF* và gen *CRAF* liên quan nhiều hơn, liên quan nhiều nhất là gen *BRAF*. Các gen chống ung thư liên quan nhiều với ung thư da là *TP53*, gen *Hedgehog*, gen *Patched*... Đây cũng chính là lý do chúng tôi lựa chọn 2 gen điển hình là gen *BRAF* và gen *TP53* thuộc hai nhóm gen phát sinh ung thư và nhóm gen ức chế sinh ung thư vào nghiên cứu. Theo các tác giả, đột biến gen *TP53* gặp cao nhất ở 70% bệnh nhân ung thư da. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ đột biến gen *TP53* phát hiện được là 27% ung thư da nói chung. Nếu chỉ tính ung thư da loại tế bào đáy thì tỷ lệ này là 66,7%, trong đó các đột biến xảy ra 25,4% ở exon 3, 1,6% ở exon 4 và 12,7% ở exon 6, tỷ lệ này thấp hơn với các tác giả khác.

Vai trò của Human Papilloma virus (HPV) trong ung thư da: nhiều nghiên cứu cho thấy sự tương quan giữa HPV và ung thư da (Karagas). Vai trò của HPV type 5 và 8 trong bệnh dị sản thượng bì dạng hạt cơm (Epidermodisplasia veruciforme) đã được làm rõ (Pastel). Protein E6 của HPV ức chế hoạt động của một số protein trong đó có protein p53, từ đó làm giảm khả năng ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư.

Ngoài ánh sáng mặt trời và HPV, nhiễm độc một số kim loại nặng như arsenic cũng là nguyên nhân của ung thư da nhất là ung thư biểu mô tế bào vảy. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tỷ lệ ung thư tế bào vảy cao ở những vùng có nước sinh hoạt bị nhiễm arsenic [143]. Ở những người có nồng độ arsenic cao trong móng có nguy cơ mắc ung thư tế bào vảy cao gấp gần hai lần so với người bình thường [144]. Ngoài ra, rất nhiều nghiên cứu đề cập đến tác dụng của thuốc lá, các chất diệt cỏ, thuốc trừ sâu hại, chất diệt nấm cũng là những nguyên nhân gây ung thư tế bào vảy [145].

Các đột biến mới phát sinh có thể tác động vào gen chống đột biến *TP53* hoặc tác động vào các gen gây ung thư như *BRAF*. Các yếu tố môi

trường ở Việt Nam cũng cần được lưu tâm. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ đột biến V600E ở gen *BRAF* rất thấp có thể có các khả năng sau:

- Có thể ở Việt Nam đột biến V600E ở gen *BRAF* không phổ biến mà có thể lại có đột biến ở vị trí khác. Để khẳng định điều này cần có các nghiên cứu tiếp theo với cỡ mẫu lớn hơn và phân tích đầy đủ hơn ở các vùng khác của gen *BRAF*.

- Có thể đột biến *BRAF* ở Việt Nam là thấp hơn các nước khác. Có lẽ đây là lý do chính làm cho tỷ lệ ung thư da ở Việt Nam thấp hơn các nước như Australia, Mỹ và một số nước châu Âu. Nói cách khác, tỷ lệ người mang gen gây ung thư da loại *BRAF* (V600E) ở Việt Nam thấp, nhưng tỷ lệ đột biến gen chống ung thư như gen *TP53* thì lại tương tự như các nghiên cứu khác ở các nước khác.

4.5. BÀN LUẬN VỀ ƯU NHƯỢC ĐIỂM CỦA QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN *TP53* VÀ *BRAF* TRONG UNG THƯ DA

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, kỹ thuật xác định đột biến gen *TP53* và *BRAF* bằng giải trình tự gen và hóa mô miễn dịch đều cho kết quả tương đồng nhau. Đối với đột biến gen *BRAF* (V600E) các nhà lâm sàng có thể lựa chọn phương pháp hóa mô miễn dịch thay cho phương pháp giải trình tự gen. Vì cả hai phương pháp này đều xác định được đột biến xảy ra ở vị trí V600E, phương pháp giải trình tự gen cho phép phát hiện được nucleotid bị thay thế ở vị trí g.1799T>A làm biến đổi codon ở vị trí 600, bộ ba GTG mã hóa cho acid amin Valine được thay thế bằng bộ ba GAG mã hóa cho acid amin Glutamate. Phương pháp hóa mô miễn dịch, với việc sử dụng kháng thể đơn dòng của chuột (kháng thể 1) chống kháng nguyên là phân tử protein đột biến V600E cho phép phát hiện được các đột biến tại vị trí này. Với phương pháp giải trình tự gen thì ngoài việc xác định đột biến V600E, có thể xác định được đột biến khác như V600K hoặc các đột biến xảy ra ở các

acid amin khác nữa. Với kỹ thuật hóa mô miễn dịch xác định đột biến protein BRAF (V600E) thì chỉ xác định được đột biến V600E có hay không mà không xác định được các đột biến khác. Kỹ thuật Hóa mô miễn dịch sẽ thực hiện đơn giản hơn, thời gian thực hiện kỹ thuật nhanh hơn, thời gian trả kết quả cho bệnh nhân sẽ ngắn hơn và giá thành thực hiện sẽ thấp hơn kỹ thuật giải trình tự gen.

Với gen *TP53*, kỹ thuật hóa mô miễn dịch chỉ xác định được biểu lộ protein p53 đột biến chung, không xác định được xem đột biến ở vị trí acid amin nào. Phương pháp giải trình tự gen sẽ khắc phục được hạn chế đó, phương pháp này xác định được đột biến ở vị trí nào của gen *TP53* từ đó xác định được vị trí các acid amin bị biến đổi. Vì vậy khi bác sĩ lâm sàng cần xác định đột biến gen *TP53* chung thì nên sử dụng phương pháp hóa mô miễn dịch, khi cần xác định chính xác vị trí đột biến của gen *TP53* thì lựa chọn phương pháp giải trình tự gen. Từ đó lựa chọn phương pháp điều trị hỗ trợ khôi phục lại chức năng của gen *TP53* chung hay gắn các phân tử vào các vị trí đột biến để khôi phục chức năng của gen *TP53*.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu giải trình tự gen *TP53*, *BRAF(V600E)* và khảo sát biểu lộ protein p53 và protein BRAF(V600E) ở 63 bệnh nhân ung thư da gồm 21 bệnh nhân ung thư tế bào đáy, 21 bệnh nhân ung thư tế bào vảy và 21 bệnh nhân ung thư tế bào hắc tố chúng tôi thu được kết quả sau:

1. Xác định đột biến gen *TP53* và *BRAF* ở các thể ung thư da.

* Đột biến gen *TP53*:

- Tỷ lệ biến đổi gen *TP53*:

- + 100% các mẫu đều có biến đổi gen *TP53*.
- + Đột biến ở các đoạn exon chiếm tỷ lệ 27,0%.
- + Biến đổi ở các đoạn intron chiếm tỷ lệ 95,2%
- + Đột biến ở các exon và biến đổi ở intron chiếm tỷ lệ 22,2%

- Xác định được 52 vị trí biến đổi trên gen *TP53* trong đó có 10 đột biến ở các đoạn exon và 42 biến đổi ở các đoạn intron.

- 10 đột biến gặp ở các đoạn exon 3, exon 4 và exon 6 của gen *TP53* gồm:

- + Ở exon 3 có 5 đột biến c.187G>T (p.A63S), c.215C>A (p.P72H), c.218T>A (p.V73E), c.220G>T (p.A74S), c.314G>A (p.G105D).
- + Ở exon 4 có 2 đột biến: c.471C>T (p.V157V), c.472C>T (p.R158C).
- + Ở exon 6 có 3 đột biến: c.722C>T (p.S241F), c.733G>T (p.G245C), c.735C>A (p.G245G).

- Có 4 đột biến mới trên gen *TP53* chưa thấy công bố trong các nghiên cứu ở các bệnh nhân ung thư da trên thế giới là: c.187G>T (p.A63S), c.218T>A (p.V73E), c.220G>T (p.A74S), c.314G>A (p.G105D).

- 42 biến đổi ở các đoạn intron của gen *TP53* gồm: Ở IVS 6 có 35 biến đổi, vùng IVS 1 có 6 biến đổi và vùng IVS 5 có 1 biến đổi.

- **Các biến đổi phối hợp của gen TP53:** có tới 93,7% các mẫu ung thư da có từ 2 đột biến và biến đổi trở lên trên gen TP53, có 41,3% có từ 10 biến đổi trở lên và có 2 mẫu ung thư da tế bào vảy có tới 19 biến đổi trên gen TP53.

- **Tỷ lệ đột biến gen TP53 trong các thể ung thư da:**

+ Tỷ lệ đột biến gen TP53 trong mô ung thư tế bào đáy là cao nhất chiếm 66,7%.

+ Tỷ lệ đột biến gen TP53 trong mô ung thư tế bào vảy là 14,3%.

+ Không phát hiện được đột biến gen TP53 trong ung thư tế bào hắc tố.

* **Đột biến gen BRAF(V600E):**

Chỉ có 1 trường hợp đột biến gen BRAF (V600E) ở bệnh nhân ung thư tế bào hắc tố chiếm tỷ lệ 1,6%, không thấy có đột biến này trong ung thư tế bào đáy và ung thư tế bào vảy.

2. Xác định biểu lộ protein p53 và BRAF (V600E) đột biến trong mô ung thư da

- **Tỷ lệ biểu lộ protein p53 đột biến trong mô ung thư da là 27,0%.**

+ Tất cả các đột biến ở exon đều có biểu lộ protein p53 đột biến.

+ Không gặp trường hợp nào có biểu lộ protein p53 đột biến ở bệnh nhân chỉ có biến đổi ở intron.

- **Chỉ có 1 trường hợp có biểu lộ protein đột biến BRAF (V600E) chiếm tỷ lệ 1,6%.**

+ Chỉ gặp ở trường hợp có đột biến gen BRAF (V600E).

+ Không gặp ở các bệnh nhân không có đột biến gen BRAF (V600E).

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục nghiên cứu thêm đột biến gen *BRAF(V600E)* ở bệnh nhân ung thư da, đặc biệt là ung thư tế bào hắc tố, để có số liệu đủ lớn có kết luận vai trò của đột biến gen *BRAF(V600E)* trong ung thư da ở người Việt Nam.
2. Cần tiếp tục nghiên cứu ở các vùng khác ngoài vùng V600 của gen *BRAF* để tìm hiểu đặc điểm đột biến của gen này ở người Việt Nam bị ung thư da.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ

1. Hồ Quang Huy, Phạm Đăng Khoa, Phan Thị Hoan, Trần Đức Phần (2018). Xác định đột biến gen *BRAF* (*P. V600E*) trong mô ung thư da loại biểu mô tế bào đáy. *Tạp chí Y học thực hành*, 10 (1083), 252-254.
2. Hồ Quang Huy, Phạm Đăng Khoa, Phan Thị Hoan, Trần Đức Phần (2018). Xác định đột biến gen *BRAF*, *P53* trong mô ung thư da loại biểu mô tế bào đáy. *Tạp chí Y học thực hành*, 10 (1083), 262-264.
3. Hồ Quang Huy, Phạm Đăng Khoa, Phan Thị Hoan (2018). Xác định đột biến gen *BRAF* (*V600E*) trong mô ung thư da bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch. *Tạp chí Y học thực hành*, 11 (1085), 65-68.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bulliard J.L, Panizzon R.G, Levi F. (2009). Epidemiology of epithelial skin cancers. *Rev Med Suisse*, 22, 5(200), 882-888.
2. Nguyễn Bá Đức (2006). *Phòng và phát hiện sớm bệnh ung thư*. NXB Hà Nội.
3. Busca R., Abbe P., Mantoux F. et al (2000). RAS mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal - regulated kinase (ERKs) in melanocytes. *EMBO J*, 19, 608-613.
4. Campbell S.L, Khosravi F.R, Rossman K.L et al (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Dev Cell Oncogene Sep*, 17, 1395-413.
5. Avruch J., Khokhlatchev A., Kyriakis J.M et al (2001). RAS activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm.Res*, 56, 127-155.
6. Weller R., Hunter J., Savin J. et al (2008). The function and structure of the skin. *Clinical Dermatology*. 4th edition, Blackwell Publishing, 2, 10-33.
7. Stern R.S (2010). Prevalence of a history of skin cancer in 2007: results of an incidence-based model. *Arch Dermatol*, 146(3), 279-82.
8. Miller D.L, Weinstock M.A (1994), Non- melanoma skin cancer in the United States. Incidence. *J Am Acad Dermatol*, 30, 774-8.
9. Marks R. (2010). Epidemiology of non-melanoma skin cancer and solar keratoses in Australia: a tale of self-immolation in Elysian fields. *Australas J Dermatol*, 38 (1 1), 26-9.
10. Gillison M.L, Koch W.M, Capone R.B et al (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J. Natl. Cancer Inst*, 3, 92(9), 709-20.
11. Bulliard J.L, Panizzon R.G, Levi F. (2009). Epidemiology of epithelial skin cancers. *Rev Med Suisse*, 22,5(200), 882-888.

12. Muller H., Fairley L., Coupland V. et al (2007). The future burden of cancer in England: incidence and numbers of new patients in 2020. *Br. J. Cancer*, 96(9), 1484-8.
13. Sung J., Koh D., Siong W.C et al (2009), Skin cancer trends among Asians living in Singapore from 1968 to 2006. *J Am Acad Dermatol*, 61(3), 426-32.
14. Scrivener Y., Groosshans E., Cribier B. (2002). Variations of dermatology servuces. *Br. J. Dermatol*, 156, 1301-1307.
15. Stone R.P, Hill G.B, Bajdik C.D et al (1995), Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol*, 131 (2), 164-9.
16. Lê Đức Minh, Trần Hậu Khang, Trịnh Minh Trang và cộng sự (2014). Đặc điểm lâm sàng và mô bệnh học của ung thư tế bào đáy tại Bệnh viện Da liễu Trung ương (2007-2011). *Tạp chí y dược học quân sự*, 39 (20), 104-107.
17. Crowson A.N (2006). Basal cell carcinoma: Biology, morphology and clinical implications. *Mod. Pathol*, 19(20), 127-131.
18. Yu H.S, Liao W.T, Chai C.Y (2006). Arsenic carcinogeneses in the skin. *J. biomed. Sci*, 13, 657-666.
19. Galagher R.P, Bajdik C.D, Fincham S. et al (1996). Chemical exposures, medical history, and rick of squamous and basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 5, 419-424.
20. Athas W.F, Hunt W.C, Key C.R (2003). Changes in nonmelanoma skin cancer incidence between 1997-1998 and 1998-1999 in north central New Mexico. *Cancer Epidemiol. Biomarkers prev*, 12, 1105-1108.
21. Harris R.B, Griffith K., Moon T.E (2001). Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancer in southeastern Arizona, 1995-1996. *J. Am. Acad. Dermatol*, 45, 528-536.

22. Leshner J.L, Aubermon P.C, Brown V. (1998). Morpheaform basal cell carcinoma in a young black woman. *J. Dermatol. Surg. Oncol*, 14, 200-203.
23. Zanetti R., Rosso S., martinex C. et al (1996). The multicentre south European study Helios. I. Skin characteristics and sunburns in basal cell and squamous cell carcinoma of the skin. *Br. J. cancer*, 73(11), 1440-1446.
24. Garner K.L, Rodney W.M (2000). Basal and squamous cell carcinoma. *Prim. Care*, 27(2), 447-458.
25. Berg D., Otley C.C (2002). Skin cancer in organ trasplant recipients: epidemiology, pathogenesis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol*, 47(1), 1-17.
26. Zak P.M, Narbutt J., Sysa J.A (2004). Environmental risk factors predisposing to the develoment of basal cell carcinoma. *Dermatol. Surg*, 30(2), 248-252.
27. Robinson M.J, Cobb M.H. (1997), Mitogen activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.
28. Tạ Thành Văn (2010). *Con đường tín hiệu tế bào và dấu ấn sinh học trong chẩn đoán*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 96-107.
29. Macdonal F., Ford C.R.J, Casson A.G (2005). The cell cycle. *Molecular Biology of cancer*, Bios scientific publishers, London and Newyork, second edition, 2-4.
30. Davies H., Bignell G.R, Cox C. et al (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature*. 417, 949-954.
31. Morrison D.K, Cutler R.E.J (1997). The complexity of Raf-1 Regulation. *Curr. Opin. Cell Biol*, 9, 174-179.
32. Rommel C., Clarke B.A, Zimmermann S. (1999). Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*, 286,

1738-1741.

33. Campbell S.L, Khosravi F.R, Rossman K.L et al (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Der CJ Oncogene, Sep*, 17, 1395-413.
34. Singer G., Oldt R., Cohen Y. et al (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low - grade ovarian serous carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst*, 95, 484-486.
35. Mar V.J, Liu W., Devitt B. et al (2015). The role of BRAF mutations in primary melanoma growth rate and survival. *Br J Dermatol*, 173(1). 76-82.
36. Paul T.C, Mathew W., Garnett J. et al (2004). Mechanism of Activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116, 855-867.
37. Lee E.Y, Muller W.J (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(10).
38. Isobe M., Emanuel B.S, Givol D. et al (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, 320, 84-85.
39. Benjamin C.L, Ananthaswamy H.N (2007). p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 224, 241 - 48.
40. Jiang W., Ananthaswamy H.N, Muller H.K et al (1999). p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*, 18, 4247-4253.
41. Soehnge H., Ouhtit A., Ananthaswamy H.N (1997). Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front. Biosci*, 2, 538–551.
42. Thierry S. (2007). Handbook of p53 mutation in cell lines Version 1.0 07/2007. <http://p53/free.fr> p53@free.fr.
43. Vabres P., Lacombe D., Rabinowitz L.G et al (1995). The gene for Bazex-Dupre-Christol syndrome maps to chromosome Xq. *J. Invest. Dermatol*, 105, 87–91.

44. Ziegler A., Jonason A.S, Leffell D.J et al (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, 372, 773-776.
45. Brouxhon S.M, Kyrkanides S., Raja V. et al (2014). Ectodomain-specific E-cadherin antibody suppresses skin SCC growth and reduces tumor grade: a multitargeted therapy modulating RTKs and the PTEN-p53-MDM2 axis. *Mol. Cancer Ther*, 13(7), 1791 - 1802.
46. Malumbres M., Barbacid M., Fujjita Y. et al (2009). Role of p53 mutation in the effect of boron neutron capture therrapy on oral squamous cell caecinoma. *Radiat Oncol*, 11, 54-63.
47. Tạ văn Tờ (2004). Nghiên cứu hình thái học, hóa mô miễn dịch và giá trị tiên lượng của chúng trong ung thư biểu mô tuyến vú. *Luận án tiến sĩ Y học*, Trường Đại học Y Hà Nội.
48. Jiang W., Ananthaswamy H.N, Muller H.K et al (1999). p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*,18, 4247–4253.
49. The TP53 web site. <https://p53.fr/curation-of-the-tp53-database>, 220-8.
50. Venza M., Catalano T., Visalli M. et al (2009). Association of the DSS1 c.143G>A polymorphism with skin squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*, 36(2), 220-8.
51. Bukhari M.H, Niazi S., Khaleel M.E et al (2011), Elevated frequency of p53 genetic mutations and AgNOR values in squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 32(3):327-30.
52. Almquist L.M, Karagas M.R, Christensen B.C et al (2010). The role of TP53 and MDM2 polymorphisms in TP53 mutagenesis and risk of non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol*, 130(6), 1719-25.
53. NCBI (2013). http://genome.ucsc.edu/trash/hgtIdeo/hgtIdeo_genome_1653_d1f3c0.png.
54. Eychene A. J. V, Barnier F. et al (1992). Chromosomal assignment of

two human B-raf (Rmil) proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p94Braf/Rmil and B-raf-2, a processed pseudogene. *Oncogene*, 8, 7, 1657-60.

55. Wan P.T, Garnett M.J, Roe S.M et al (2004). Mechanism of activation of the RAF - ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116, 855-867.
56. Wolfgang A.S (2005). Cancer pathways. *Molecular Biology of Human Cancer. Dordrecht*, 113-144.
57. Peyssonnaud C., Eychene A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell*, 93, 53-62.
58. Pouyssegur J., Lenormand P. (2003). Fidelity and spatio - temporal control in MAP kinase (ERKs) signaling. *Eur. J. Biochem.* 270, 3291-3299.
59. Robinson M.J, Cobb M.H (1997). Mitogen activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol*, 9, 180-186.
60. Campbell S.L, Khosravi F.R, Rossman K.L et al (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Der CJ Oncogene, Sep*, 17, 1395-413.
61. Malumbres M., Pellicer A. (1998). RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front. Biosci*, 3, 887-912.
62. Avruch J., Khokhlatchev A., Kyriakis J.M et al (2001). RAS activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm.Res*, 56, 127-155.
63. Busca R., Abbe P., Mantoux F. et al (2000). RAS mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal - regulated kinase (ERKs) in melanocytes. *EMBO J*, 19, 608-613.
64. Rapp U.R, Goldsborough M.D, Mark G.E et al (1983). Structure and bio-logical activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 80, 4218-4222.

65. Malumbres M., Barbacid M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 459-465.
66. Kolch W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/ Raf/ MEK/ ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J*, 351, 289-305.
67. Morrison D.K (2001). KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway. *J. Cell Sci*, 114, 1609-1612.
68. Zhang B.H, Guan K.L (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr589 and Ser601. *EMBOJ*, 19, 5429-5439.
69. Macdonal F., Ford C.R.J, Casson A.G (2005). Cyclins and cyclin - dependent kinases. *Molecular Biology of cancer*, Bios scientific publishers, London and Newyork, second edition, 64-68.
70. Davies H., Bignell G.R, Cox C. et al (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417, 949-954.
71. Cohen Y., Goldenberg C.N, Parrella P. et al (2003). Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, 44, 2876-2878.
72. Singer G., Oldt R., Cohen Y. et al (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low - grade ovarian serous carcinoma. *J. Natl, Cancer Inst.* 95, 484-486.
73. Brose M.S, Volpe P., Feldman M. et al (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*, 62, 6997-7000.
74. Morrison D.K, Cutler R.E.J (1997). The complexity of Raf-1 Regulation. *Curr. Opin. Cell Biol*, 9, 174-179.
75. Rommel C., Clarke B.A, Zimmermann S. (1999). Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*, 286,

1738-1741.

76. Campbell S.L, Khosravi F.R, Rossman K.L et al (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Der CJ Oncogene*, Sep, 17, 1395-413.
77. Tsygankova O.M, Kupperman E., Wen W. et al (2000). Cyclic AMP activates Ras. *Oncogene*, 19, 3609-3615.
78. Chandra S.P, Rafal S. et al (1011). Sequencing technologies and genome sequencing. *J. Appl Genet*, 52(4), 413-435.
79. Rick K., Marinus J. B et al (2017). Next - Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci*, 18(2): 308-312.
80. John S., Editor (2018). Development of ultra-short PCR assay to reveal BRAF V600 mutation status in Thai colorectal cancer tissues. *PLoS One*, 13(6): 200-208.
81. Lê Đình Roanh (2003). Nghiên cứu ứng dụng Hóa mô miễn dịch trong chẩn đoán một số bệnh ung thư. *Đề tài cấp Bộ*, Trường Đại học Y Hà Nội.
82. Daum G., Eisenmann T.I, Fries H.W et al (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci*, 19, 474-480.
83. Scrivener Y., Grosshans E., Cribier B. (2002). Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br. J. Dermatol*, 147, 41-47.
84. Chang J.M, Gao X.M (2013). Clinical and histopathological characteristics of basal cell carcinoma in Chinese patients. *Chin. Med. J (Engl)*, 126(2), 211-214.
85. Raasch B.A, Buettner P.G, Garbe C. (2006). Basal cell carcinoma: histological classification and body - site distribution. *Br. J. Dermatol*, 155, 401-407.
86. Buettner P.G, Raasch B.A (1998). Incidence rates of skin cancer in

- Townsville, Australia. *Int. J. Cancer*, 78, 587-593.
87. Demers A.A, Nugent Z., Mihalcioiu C. et al (2005). Trends of nonmelanoma skin cancer from 1960 through 2000 in a Canadian population. *J. Am. Dermatol*, 53, 320-328.
 88. Kikuchi A., Shimizu H., Nashikawa T. (1996). Basal cell carcinoma in Japanese patients. *Arch. Dermatol*, 132(3), 320-324.
 89. Hoey S.E, Devereux C.E, Murray L. et al (2007). Skin cancer trends in Northern Ireland and consequences for provision of dermatology services. *Br. J. Dermatol*, 156, 1301-1307.
 90. Jurciukonyte R., Vincerzevskiene I., Krilaviciute A. et al (2013). Epidemiology of basal cell carcinoma in Lithuania. 1996-2010. *Br. J. Dermatol*, 169, 1100-1105.
 91. Lomas A., Leonardi B.J, Bath H.F (2012). A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol*, 166, 1069-1080.
 92. Lear J.T, Tan B.B, Smith A.G et al (1997). Risk factors for basal cell carcinoma in the UK: case-control study in 806 patients. *J. R. Soc. Med*, 90(7), 371-374.
 93. Pelucchi C., Landro A.D, Naldi L. et al (2007). Risk factors for Histological Types and Anatomic Sites of Cutaneous Basal-Cell Carcinoma: An Italian Case-Control Study. *J. Invest. Dermatol*, 127, 935-944.
 94. Hoàng Anh Tuấn (2012). Nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học và hóa mô miễn dịch ung thư biểu mô tế bào đáy và tuyến bã ở mi mắt. *Luận án tiến sỹ y học*, Trường Đại học Y Hà Nội.
 95. Malhotra P., Singh A., Ramesh V. (2011). Basal cell carcinoma in the North Indian population: Clinicopathologic review and immunohistochemical analysis. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol*,

77 (3), 328-330.

96. Hao Z.F, Ao J.H, Zhang J., Su Y.M, Yang R.Y (2013). ATF3 activates Stat3 phosphorylation through inhibition of p53 expression in skin cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev*, 14(12), 7439-7444.
97. Benjamin C.L, Ananthaswamy H.N (2007). p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 224, 241 - 48.
98. Ling G., Ahmadian A., Persson A. et al (2001). PATCHED and p53 gene alterations in sporadic and hereditary basal cell cancer. *Oncogene*, 20, 7770- 78.
99. Seidler A.M, Pennie M.L, Veledar E. et al (2010). Economic burden of melanoma in the elderly population: population-based analysis of the Surveillance. Epidemiology. and End Results (SEER)--Medicare data. *Arch Dermatol*, 146(3), 249-256.
100. Zhang H., Ping X.L, Lee P.K et al (2001). Role of *PTCH* and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma. *Am. J. Pathol*, 158, 381–385.
101. Isobe M., Emanuel B.S, Givol D. et al (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, 320, 84-85.
102. Lane D.P (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15-26.
103. Ling G., Ahmadian A., Persson A. et al (2001). PATCHED and p53 gene alterations in sporadic and hereditary basal cell cancer. *Oncogene*, 20, 7770- 78.
104. Rady P., Scinicariello F., Wagner R.F et al (1992). P53 mutations in basal cell carcinomas. *Cancer Res*, 52, 3804 - 06.
105. Reifemberger J., Wolter M., Knobbe C.B et al (2005). Somatic mutations in the *PTCH*, *SMOH*, *SUFUH* and *TP53* genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br. J. Dermatol*, 152, 43–51.
106. Ziegler A., Jonason A.S, Leffell D.J et al (1994). Sunburn and p53 in the

- onset of skin cancer. *Nature*, 372, 773-776.
107. Forbes S., Clements J., Dawson E. et al (2006). COSMIC 2005, *Br J Cancer*, 94, 318-322.
 108. Telmer C.A, An J., Malehorn D.E et al (2003). Detection and assignment of *TP53* mutations in tumor DNA using peptide mass signature genotyping, *Hum Mutat*, 22, 158-165.
 109. Viros A., Sanchez L.B, Pedersen M. et al (2014). Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature*, 511(7510), 478-482.
 110. Thierry S. (2007). Handbook of p53 mutation in cell lines Version 1.0 07/2007. [http://p53/free.fr](http://p53.free.fr) p53@free.fr.
 111. Rodrigues N.R, Rowan A., Smith M.E.F et al (1990). P53 mutations in colorectal cancer *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 7555-59.
 112. Weiss J., Schwechheimer K., Cavenee W.K et al (1993). Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines. *Int J Cancer*, 54, 693-699.
 113. Kastrinakis W.V, Ramchurren N., Rieger K.M et al (1995). Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene*, 11, 647-652.
 114. Rieger K.M, Little A.R, Swart J.M et al (1995). Human bladder carcinoma cell lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression. *Br J Cancer* ,72, 683-690.
 115. Van G.M, Kaghad M., Leonard J.H et al (2000). Mutation analysis of P73 and *TP53* in Merkel cell carcinoma. *Br J Cancer*, 82, 823-826.
 116. Mitsudomi T., Steinberg S.M, Nau M.M et al (1992). p53 Gene Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines and Their Correlation with the Presence of ras Mutations and Clinical Features. *Oncogene* ,7, 171-180.
 117. Guiseppina G.M, Alanin S. (2003). *TP53* mutation in Human skin

- cancers. *Human mutation* 21, 217 - 228.
118. Hahn H., Wicking C., Zaphiropoulos P.G et al (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85, 841 - 851.
 119. Zafeirious D.J, Fabrizio T., Alexander A. et al (2001). Xeroderma Pigmentosum group G with severe neurological involvement and features of cockayne syndrome in infancy. *Pediatric research*, 49, 407 - 412.
 120. Dong Z., Zheng L., Liu W. (2015). Association of mRNA expression of TP53 and the TP53 codon 72 Arg/Pro gene polymorphism with colorectal cancer risk in Asian population: a bioinformatics analysis and meta-analysis. *Cell*, 85, 841 - 851.
 121. Mastellaro M.J, Seidinge A.L, Kang G. et al (2015). Contribution of the TP53 R337H mutation to the cancer burden in southern Brazil: insights from the study of 55 families of children with adrenocortical tumors. *Br J Cancer*, 76, 84 - 89.
 122. Zampiga V., Danesi R., Tedadi G. et al (2016). Multiple primary tumors in a family with Li-Fraumeni syndrome with a TP53 germline mutation identified by next-generation sequencing. *Cell*, 15, 641 - 698.
 123. Burns J.E, Baird M.C, Clark L.J et al (1993). Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. *Br J Cancer*, 67, 1274-1284.
 124. Ye X.H et al (2014). Association between the TP53 polymorphisms and lung cancer risk a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 41(1), 373-85
 125. Venza M., Catalano T., Visalli M. et al (2009). Association of the DSS1 c.143G>A polymorphism with skin squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*, 36(2), 220-8.
 126. Bukhari M.H, Niazi S., Khaleel M.E et al (2011), Elevated frequency of p53 genetic mutations and AgNOR values in squamous cell carcinoma.

Carcinogenesis, 32(3),327-30.

127. Almquist L.M, Karagas M.R, Christensen B.C et al (2010). The role of TP53 and MDM2 polymorphisms in TP53 mutagenesis and risk of non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol*, 130(6), 1719-25.
128. Aggarwal M., Saxena R., Sinclair E. et al (2016). Reactivation of mutant p53 by dietary-related compound phenethyl isothiocyanate inhibits tumor growth. *Cell Death Differ*, 23, 10, 1615-27.
129. Zhang M., Heldin A., Paloma S.M et al (2018) Synergistic rescue of nonsense mutant tumor suppressor p53 by combination treatment with aminoglycosides and Mdm2. *Front Oncol*, 4, 323-327.
130. Fujita Y., Kato I., Iwai S. et al (2009). Role of p53 mutation in the effect of boron neutron capture therapy on oral squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol*, 11, 54-63.
131. Zhao D., Tahaney W.M, Mazumdar A. et al (2017). Molecularly targeted therapies for p53-mutant cancers. *Cell Mol Life Sci*, 74(22):4171-4187.
132. Tang X., Zhu Y., Han L. et al (2007). CP-31398 restores mutant p53 tumor suppressor function and inhibits UVB-induced skin carcinogenesis in mice. *J Clin Invest*, 117(12), 3753-64.
133. He X., Kong X., Yan J. (2015). CP-31398 prevents the growth of p53-mutated colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Tumour Biol*. 36(3), 437-441.
134. Hugdahl E., Kalvenes M .B, Puntervoll H.E et al (2016). BRAF –V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival. *Br J Cancer*. 114(7): 801-8.
135. Brose M.S, Volpe P., Feldman M. et al (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*, 62, 6997-7000
136. Si L., Kong Y., Xu X. et al (2012). Prevalence of BRAF V600E

- mutation in Chinese melanoma in a patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutation in a 432 case cohort. *Eur J cancer*, 48(1): 94-100.
137. Sheen Y.S, Liao Y.H, Liao J.Y et al (2016). Prevalence of BRAF and NRAS mutation in cutaneous melanoma patients in Taiwan. *J Formos Med Assoc*, 115 (2): 121-127.
 138. Thomas N.E, Edmiston S.N, Kanetsky P.A et al (2017). Association of MC1R genotype and patient phenotypes with BRAF and NRAS mutations in Melonoma. *J Invest Dermatol*, 137 (12): 2588-98.
 139. Cohen Y., Goldenberg C.N, Parrella P. et al (2003), Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, 44: 2876-2878.
 140. Bhavana P., April K. (2016). Updates in therapy for advanced melanoma. *Cancers Review*, 8(17):103390.
 141. Tarhini A. (2013). Immune-mediated adverse events associated with ipilimumab ctla-4 blockade therapy: the underlying mechanisms and clinical management. *Scientifica*, 2013:857519.
 142. Robert C. et al (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England journal of medicine*, 372(26):2521-32.
 143. Guo X., Fujino Y., Ye X. et al (2006). Association between multi-level inorganic arsenic exposure from drinking water and skin lesions in China. *Int J Environ Res Public Health*, 3 (3): 262-267.
 144. Karagas M.R, Nelson H.H, Sehr P. et al (2006). Human papilloma virus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinoma of the skin. *J. Nalt. Cancer Inst*, 98 (6):389-395.
 145. Gallagher R.P, Bajdik C.D, Fincham S. et al (1996). Chemical exposures, medical history, and risk of squamous and basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5 (6): 419-424.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1: DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT CÁC ACID AMIN

STT	Tên acid amin	Tên viết tắt	Ký hiệu
1.	Alanine	Ala	A
2.	Arginine	Arg	R
3.	Asparagine	Asn	B
4.	Aspartate	Asp	D
5.	Cysteine	Cys	C
6.	Glutaminte	Glu	E
7.	Glutamine	Gln	Q
8.	Glycine	Gly	G
9.	Histidine	His	H
10.	Isolcucine	Ile	I
11.	Leucine	Leu	L
12.	Lysine	Lys	K
13.	Methionine	Met	M
14.	Phenylalanin	Phe	F
15.	Proline	Pro	P
16.	Serine	Ser	S
17.	Threonine	Thr	T
18.	Tryptophan	Trp	W
19.	Tyrosine	Tyr	Y
20.	Valine	Val	V