

TÍNH ĐA HÌNH T6235C CỦA GEN CYP1A1 VÀ NGUY CƠ VỚI BỆNH UNG THƯ PHỔI

Lê Hồng Công, Trần Văn Khánh, Lê Hoàng Bích Nga,
Nguyễn Trọng Tuệ, Nguyễn Đức Hình, Tạ Thành Văn, Trần Huy Thịnh
Trường Đại học Y Hà Nội

Tính đa hình T6235C gen CYP1A1 là yếu tố nguy cơ cao gây ung thư phổi trên các đối tượng người Châu Á. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xác định tính đa hình T6235C của gen CYP1A1 ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm đối chứng. 139 mẫu bệnh nhân ung thư phổi và 100 người không mắc bệnh ung thư được lựa chọn vào nghiên cứu. Kỹ thuật PCR - RFLP (PCR - Restriction fragment length polymorphism) được lựa chọn để xác định tính đa hình T6235C. Kết quả cho thấy, tần số alen T và C ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi là 75% và 25%, có sự khác biệt so với tần số alen T và C của nhóm đối chứng là 84% và 16%, với $p < 0,05$; tần số genotype T/T và T/C - C/C ở nhóm ung thư phổi là 0,288 và 0,712, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng là 0,36 và 0,64, với $p < 0,05$. Kết luận cho thấy bước đầu thấy được sự tương quan giữa đa hình thái T6235C của gen CYP1A1 với nguy cơ ung thư phổi ở người Việt Nam.

Từ khóa: Ung thư phổi, đa hình T6235C, gen CYP1A1

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là loại ung thư thường gặp nhất và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở nhiều nước trên Thế giới [1]. Hút thuốc lá được cho là nguyên nhân chính gây ung thư phổi, 85- 90% bệnh nhân ung thư phổi là do hút thuốc lá. Tuy nhiên, dưới 20% số người hút thuốc lá bị ung thư phổi, điều này cho thấy các yếu tố khác bao gồm các biến thể di truyền đóng một vai trò quan trọng trong cơ chế gây bệnh ung thư phổi [2]. Sự phát sinh, phát triển bệnh ung thư phổi diễn ra qua nhiều giai đoạn dưới tác động của các yếu tố nguy cơ, sự mất cân bằng của gen và quá trình tích lũy đột biến xảy ra trên các gen gây ung thư. Các yếu tố nguy cơ bao gồm hút thuốc lá, nhiễm virus human papillomavirus (HPV), môi

trường, nghề nghiệp và các đột biến gen di truyền qua những thế hệ khác nhau.

Cytochrome P450 (CYPs) là một liên họ lớn chứa các hemoprotein xúc tác rất nhiều phản ứng enzym khác nhau để chuyển hóa các chất nội sinh và ngoại sinh. Trong hệ thống cytochrome P450, cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) là enzym chính hoạt hóa các chất và là chìa khóa để kích hoạt quá trình trao đổi chất giữa các Hydrocarbons có nhân thơm, các amin dị vòng dẫn đến hình thành các phân tử DNA bất thường từ đó khởi đầu cho quá trình ung thư [3]. Kết quả của các nghiên cứu mới được công bố gần đây cho thấy có mối liên quan chặt chẽ giữa ung thư phổi với đa hình gen CYP1A1, trong đó, đa hình T6235C của gen CYP1A1 được chỉ ra là yếu tố nguy cơ cao gây bệnh ung thư phổi trên các đối tượng người Châu Á [4, 5].

Để góp phần hiểu rõ hơn về mối liên quan giữa đa hình T6235C của gen CYP1A1 với nguy cơ ung thư phổi, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu.

Địa chỉ liên hệ: Trần Huy Thịnh, Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội

Email: huythinhda@yahoo.com

Ngày nhận: 25/3/2015

Ngày được chấp thuận: 31/5/2015

1. Xác định tính đa hình T6235C của gen CYP1A1 ở bệnh nhân ung thư phổi và người bình thường.

2. Đánh giá mối tương quan giữa tính đa hình T6235C của gen CYP1A1 ở bệnh nhân ung thư phổi và người bình thường

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Nhóm bệnh gồm 139 bệnh nhân ung thư phổi được điều trị ở bệnh viện Bạch Mai trong đó có 88 nam và 51 nữ với tuổi trung bình $59,1 \pm 9,6$. Bệnh nhân ung thư phổi được thăm khám lâm sàng, làm các xét nghiệm cận lâm sàng và giải phẫu bệnh để chẩn đoán xác định ung thư phổi.

Nhóm chứng 100 người trong chương trình quản lý tăng huyết áp và đái tháo đường, gồm 61 nam và 39 nữ, tuổi trung bình $55,6 \pm 8,9$. Được kiểm tra định kỳ bằng X - quang để loại trừ ung thư phổi.

Bệnh nhân và nhóm chứng được lấy 2 ml máu chống đông trong EDTA.

2. Phương pháp

- **Tách chiết DNA:** DNA tổng số được tách chiết từ các mẫu máu theo phương pháp sử dụng enzym protein K và phenol chloroform: isoamyl alcohol

- **Kỹ thuật PCR-RFLP (PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism):**

PCR được sử dụng để khuếch đại vùng gen đa hình T6235C của gen CYP1A1 với cặp mồi:

Mỗi xuôi: 5'- TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT -3'.

Mỗi ngược: 5'- CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT -3'.

+ Thành phần phản ứng PCR (thể tích 10.2μl) gồm: 4.7 μl Taq polymerase, 0.3μl mỗi xuôi, 0.3μl mỗi ngược, 1.2μl DNA và 3.7μl H₂O.

+ Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/5 phút, 35 chu kỳ [94°C/40 giây, 54°C/30 giây, 72°C/45 giây], 72°C/7 phút. Bảo quản mẫu ở 15°C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%, với điện thế 95 V, trong 25 phút

Xác định đa hình T6235C của gen CYP1A1 bằng kỹ thuật cắt enzym giới hạn:

+ Thành phần phản ứng: 5μl H₂O, 1.5μl Buffer 10x, 0.5μl enzym *MspI*, 8μl sản phẩm PCR. Phản ứng cắt được ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm, sau đó điện di trên gel agarose 2,5% với điện thế 80V, trong 90 phút và chụp ảnh bằng hệ thống máy EC3 Imaging system. Khi enzym *MspI* cắt đoạn gen sẽ tạo ra các đoạn DNA có kích thước 340 bp (kiểu gen T/T); 200 bp và 140 bp (kiểu gen C/C); 340bp, 200 bp và 140 bp (kiểu gen T/C).

- **Kỹ thuật giải trình tự gen:** Sản phẩm PCR khuếch đại vùng T6235C của gen CYP1A1 được kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự gen theo quy trình thường quy của Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein.

3. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài đã được thông qua hội đồng đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội, bản chấp thuận số 161/HĐĐĐ-ĐHYHN ngày 15/10/2014. Bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không đồng ý tiếp tục tham gia vào nghiên cứu. Các thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo bí mật.

III. KẾT QUẢ

1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

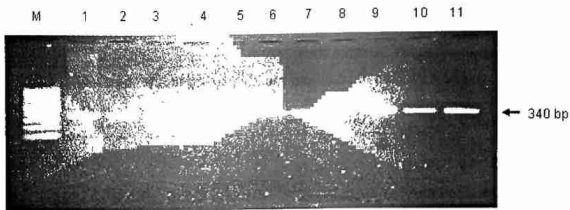
Các đặc điểm	Ung thư phổi n (%)	Nhóm chứng n (%)	p
Giới			
Nam	88 (63%)	61 (61%)	> 0,05
Nữ	51 (37%)	39 (39%)	
Tuổi			
Trung bình (M)	59,1	55,6	> 0,05
Độ lệch (SD)	9,6	8,9	
Hút thuốc lá			
Không	81(58%)		
Có	58(42%)		
< 20 bao/năm	21 (36%)		
> 20 bao/năm	37 (64%)		
Giải phẫu bệnh			
K biểu mô tuyến	65 (47%)		
K không tế bào nhỏ	6 (4%)		
K tế bào nhỏ	12 (7%)		
Chưa xác định	56 (42%)		

Bảng 1 cho thấy tỷ lệ nam cao hơn nữ ở cả 2 nhóm nghiên cứu và độ tuổi trung bình là 59,1 ở nhóm ung thư phổi và 55,6 ở nhóm đối chứng. Ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi, tỷ lệ bệnh nhân không hút thuốc cao hơn nhóm bệnh nhân có hút thuốc và hút > 20 năm chiếm tỷ lệ cao hơn hút < 20 năm. Ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi đã được xác định giải phẫu bệnh, ung thư biểu mô tuyến chiếm tỷ lệ cao nhất (47%).

2. Xác định tính đa hình T6235C của gen CYP1A1 ở bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng

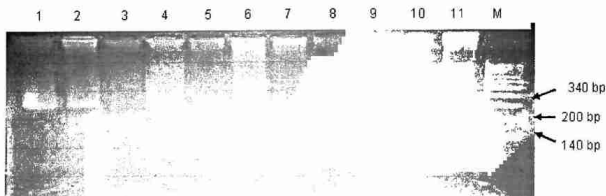
Kết quả khuếch đại vùng T6235C của gen CYP1A1

Sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt, gồm một băng đặc hiệu có kích thước đúng như tính toán là 340 bp (hình 1)



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại đoạn gen chứa T6235C của gen CYP1A1 Bệnh nhân ung thư phổi (1 - 6) và đối chứng (7 - 11); M thang chuẩn 100bp.

Kết quả xác định đa hình T6235C của gen CYP1A1 bằng PCR – RFLP



Hình 2. Sản phẩm cắt enzyme vùng T6235C của gen CYP1A1 bằng enzyme *MspI*

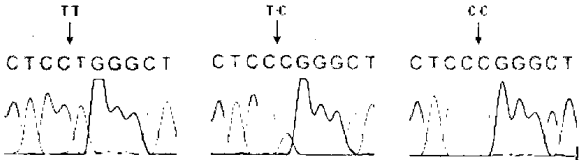
Bệnh nhân ung thư phổi (1 - 6) và đối chứng (7 - 11); M thang chuẩn 100 bp, 1, 8, 10 kiểu gen đồng hợp tử T/T; 3, 4, 5, 7, 9 kiểu gen đồng hợp tử C/C; 2, 6, 11 kiểu gen dị hợp tử T/C.

Sản phẩm cắt đoạn vùng T6235C trên gen CYP1A1 bằng enzyme *MspI* trên các mẫu bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng có kích thước khác nhau phù hợp với tính toán lý thuyết. Mẫu mang kiểu gen T/T gồm một băng DNA có kích thước 340 bp (giếng 1, 8, 10). Mẫu mang kiểu gen T/C gồm 3 băng DNA có kích thước 340 bp, 200 bp, 140 bp (giếng 3, 4, 5, 7, 9). Mẫu mang kiểu gen CC gồm 2 băng DNA có kích thước 200 bp và 140 bp (giếng 2, 6, 11).

Kết quả giải trình tự kiểm tra độ đặc hiệu của sản phẩm PCR

Kết quả cắt enzyme giới hạn được kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự gen

Kết quả giải trình tự DNA của bệnh nhân cho thấy hoàn toàn phù hợp với kết quả cắt enzyme giới hạn (hình 3).



Hình 3. Hình ảnh giải trình tự sản phẩm PCR mang đoạn gen T6235C của gen CYP1A1 tương ứng với kiểu gen T/T; T/C; C/C

3. Mối tương quan giữa tình đa hình T6235C của gen CYP1A1 ở bệnh nhân ung thư phổi và người bình thường

Bảng 2. Tỷ lệ kiểu gen và alen của T6235C trên gen CYP1A1

Kiểu gen và alen	Ung thư phổi n (%)	Nhóm chứng n (%)	p
T/T	40 (28,8%)	36 (36%)	< 0,05
T/C – C/C	99 (71,2%)	64 (64%)	
T	105 (75%)	84 (84%)	< 0,05
C	34 (25%)	16 (16%)	
Tổng	139	100	

Bảng 2 cho thấy sự phân bố kiểu gen, alen và sự khác biệt giữa các kiểu gen, alen ở hai nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng. Ở nhóm chứng, sự phân bố kiểu alen T, C là 84/100 (84%) và 16/100 (16%) so với nhóm bệnh nhân ung thư phổi lần lượt là 105/139 (75%) và 34/139 (25%) với $p < 0,05$. Ở nhóm chứng, sự phân bố kiểu gen T/T, T/C – C/C là 36 (36%) và 64 (64%) so với nhóm ung thư phổi lần lượt là 40 (28,8%) và 99 (71,2%) với $p < 0,05$.

Bảng 3. Phân bố kiểu gen theo phân loại giải phẫu bệnh của ung thư phổi

Giải phẫu bệnh	Kiểu gen	T/T n (%)	T/C – C/C n (%)	p
Ung thư biểu mô tuyến		15 (23%)	50 (77%)	< 0,005
K không tế bào nhỏ		2	4	
K tế bào nhỏ		3	9	< 0,05
Không xác định		38 (67%)	18 (33%)	< 0,005

Bảng 3 chỉ ra sự phân bố kiểu gen theo phân loại giải phẫu bệnh và sự khác nhau giữa các

kiểu gen này ở nhóm ung thư phổi. Ở nhóm bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến sự phân bố kiểu gen T/T là 15 (23%) so với kiểu gen T/C-C/C là 50 (77%) và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,005$.

IV. BÀN LUẬN

Trong cộng đồng người Châu Á, các đa hình thái của gen CYP1A1 đã được xác định làm tăng nguy cơ mắc ung thư phổi so với cộng đồng người Châu Âu và Châu Mỹ [6; 7]. Một nghiên cứu đối với người dân Nhật Bản của tác giả Nakachi và cộng sự 1993; Hayashi và cộng sự 1992 cũng chỉ ra mối liên quan giữa kiểu gen CYP1A1 và nguy cơ ung thư phổi, đặc biệt ở ung thư phổi tế bào nhỏ [4, 5]. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về mối liên quan giữa đa hình gen CYP1A1 và nguy cơ mắc ung thư phổi còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện để hiểu rõ hơn về mối liên quan giữa các kiểu gen của đa hình T6235C trên gen CYP1A1 với ung thư phổi.

Năm 1990, Kawajiri và cộng sự lần đầu tiên công bố mối liên quan giữa kiểu gen CYP1A1 với ung thư phổi trong một quần thể người Châu Âu [8]. Năm 1993, nghiên cứu của Cosma và cộng sự cho thấy kiểu gen T6235C của gen CYP1A1 ở cộng đồng người Châu Á có tương quan với nguy cơ mắc ung thư phổi cao hơn so với cộng đồng người da trắng và Châu Mỹ [6]. Năm 2011, nghiên cứu mới nhất của Chen và cộng sự cũng cho thấy có mối liên quan chặt chẽ giữa nguy cơ ung thư phổi với kiểu gen CYP1A1 T6235C và CYP1A1 A4889G [9].

Kết quả nghiên cứu ở bảng 2 cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với sự phân bố alen của đa hình T6235C trên gen CYP1A1 giữa nhóm bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng với $p < 0,05$ điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu về đa hình T6235C trên gen CYP1A1 của C. M. Wright cùng cộng sự năm

2010 [2] và Sheikh M Shaffi cùng cộng sự năm 2009 [10].

Với kết quả nghiên cứu tại bảng 2 cho thấy, tỷ lệ các kiểu gen của đa hình T6235C ở hai nhóm ung thư phổi và nhóm chứng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu của C. M. Wright năm 2010 [2], nghiên cứu của Nan Song năm 2001 [11]. Theo kết quả nghiên cứu tại bảng 3, sự phân bố theo giải phẫu bệnh học của kiểu gen T/T và các kiểu gen T/C, C/C có sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ và đặc biệt ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi đang biểu mô tuyến. Điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả đối với quần thể người Châu Á [2, 4, 11, 12]. Tuy nhiên, kết quả này khác biệt với kết quả nghiên cứu của Paula Mota và cộng sự năm 2010 trên quần thể người Châu Âu và da trắng [13].

V. KẾT LUẬN

Đã xác định được đa hình T6235C trên gen CYP1A1 ở nhóm ung thư phổi và nhóm chứng.

Tỷ lệ alen T và C của đa hình T6235C trên gen CYP1A1 ở nhóm ung thư phổi và nhóm chứng là khác biệt có ý nghĩa thống kê. Sự phân bố giữa các kiểu gen T/T với kiểu gen T/C và C/C của đa hình T6235C gen CYP1A1 ở hai nhóm ung thư phổi và nhóm chứng là khác biệt có ý nghĩa, đặc biệt ở nhóm ung thư phổi biểu mô tuyến.

Lời cảm ơn

Đề tài được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nhánh cấp nhà nước "Đánh giá

sự phân bố kiểu gen của một số gen liên quan đến ung thư phổi và ung thư gan" thuộc đề tài nhiệm vụ Quỹ gen "Đánh giá đặc điểm di truyền người Việt Nam" Nhóm nghiên cứu trần trọng cảm ơn Trung tâm Hồ hấp, Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu - bệnh viện Bạch Mai đã tạo điều kiện giúp đỡ trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Walser T, Cui X, Yanagawa J et al (2008). Smoking and lung cancer, *Proc. Am Thorac*, 5, 811 - 815.
- Wright C M, Larsen J E, Colosimo M L et al (2010). Genetic association study of CYP1A1 polymorphisms identifies risk haplotypes in nonsmall cell lung cancer *Thoracic oncology*, 7, 152 - 159.
- Vineis P, Alavanja M, Buffler P et al (2004). Tobacco an cancer: recent epidemiological evidence. *J. Natl. Cancer. Inst*, 96, 99 - 106.
- Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Kawajiri K (1993). Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cicagelte dose in a Japanes population. *Cancer Res*, 53, 2994 - 2999.
- Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. (1992). Hight susceptibility to lung cancer analysed in term of combined genotypes of CYP1A1 and Mu class glutathione S - transferase genes *Jpn J cancer Res*, 83, 866 - 870.
- Cosma G, Crofts F, Currie D et al (1993). The relationship between genotype and function of the human CYP1A1 gene *J Toxicol Environ Health*, 40, 309 - 316.
- Garte S (1998). The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*, 19, 1329 - 1332
- Kawajiri K, Nakachi K, Imai K et al (1990). Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of cytochrome P4501A1 gene. *FEBS let*, 263, 131 - 133.
- Chen Z (2011). The effect of CYP1A1 polymorphisms on the risk of lung cancer a global meta-analysis based on 71 casecontrol studies. *Mutagenesis*, 26, 437 - 446
- Sheikh M Shaffi, Mohd Amin Shah, Imtiyaz Ahmad Bhat et al (2009). CYP1A1 polymorphisms and risk of lung cancer in Ethnic Kashmiri Population. *Research communication*, 5, 651 - 656.
- Nan Song, Wen Tan, Deyin Xing, Dongxin Lin (2001). CYP1A1 polymorphisms and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case control study in China *Carcinogenesis*, 22, 11 - 16
- Tsunehiro Oyama, Norio Kagawa, Yong-Dea Kim et al (2003). Lung cancer and CYP1A1 or GSTM1 polymorphisms. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 7, 230 - 234.
- Paula Mota, David Silva Moura, Maria Graca Vale et al (2010). CYP1A1 m1, m2 polymorphisms: genetic susceptibility to lung cancer. *Artigo Original*, 9, 89 - 98.

Summary

T6235 CYP1A1 POLYMORPHISM AND RISK OF LUNG CANCER

The polymorphism T6235C of CYP1A1 gene has been shown to cause high risk factor for lung cancer in Asian subjects. In this study, the polymorphism T6235C of CYP1A1 gene in 139 lung

cancer patients is compared with 100 control samples by PCR - RFLP method (PCR - Restriction fragment length polymorphism). Results show that the frequency of T and C allele in lung cancer patients (75%, 25%) are different from that of the control group (84%, 16%) with $p < 0.05$; the difference between the frequencies of T/T genotype; T/C - C/C in the lung cancer group (0.288, 0.712) and the frequencies of T/T genotype, T/C - C/C in the control group (0.36; 0.64) with $p < 0.05$ level is statistically significant. In conclusion, we observed the correlation between polymorphism T6235C of CYP1A1 gene with lung cancer risk in Vietnam

Keywords: lung cancer, polymorphism T6235C, CYP1A1 gene