

ĐA HÌNH ĐƠN NUCLEOTIDE RS1799796 CỦA GEN XRCC3 TRONG UNG THƯ VÚ

Bùi Thị Hương Giang, Nguyễn Quý Linh, Trần Huy Thịnh,
Phạm Văn Thái, Nguyễn Thanh Bình, Tạ Thành Văn,
Nguyễn Viết Tiến, Trần Văn Khánh.

Trường Đại học Y Hà Nội

Gen XRCC3 mã hóa protein liên quan đến RAD51, tham gia vào việc tái tổ hợp tương đồng (HRR) cho DNA và đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì sự ổn định của nhiễm sắc thể và sửa chữa hư hỏng DNA. Các đa hình gen XRCC3 có thể làm thay đổi thành phần của protein được mã hóa, và có thể ảnh hưởng tới chức năng sửa chữa DNA, từ đó liên quan đến sự tăng hoặc giảm nguy cơ ung thư trong đó có ung thư vú. Nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu xác định tính đa hình đơn rs1799796 tại intron 5 của gen XRCC3 ở nhóm bệnh nhân mắc ung thư vú so với nhóm đối chứng. 150 bệnh nhân mắc ung thư vú và 150 người phụ nữ khỏe mạnh đã được lựa chọn vào nghiên cứu. Sử dụng kỹ thuật enzym cắt giới hạn (RCR-RFLP) để phân tích kiểu gen của XRCC3, sau đó xác định tỉ lệ phân bố và khả năng mắc bệnh của các kiểu gen. Kết quả cho thấy tỉ lệ alen A là 0,553 và alen G là 0,447. Tỉ lệ phân bố của các kiểu gen AA, AG, GG lần lượt ở nhóm bệnh là 31,3%, 48,0%, 20,7% và ở nhóm chứng là 36,7%, 41,3%, 22,0%. Các alen và kiểu gen của SNP rs1799796 không có sự khác biệt ở nhóm bệnh và nhóm chứng.

Từ khóa: Ung thư vú, đa hình đơn A17893G, rs1799796, gen XRCC3

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư vú (UTV) là bệnh lý ác tính phổ biến hàng đầu ở phụ nữ trong cả hai khu vực các nước phát triển và đang phát triển, phổ biến thứ 2 trên thế giới sau ung thư phổi với 2,08 triệu ca UTV mới được chẩn đoán (chiếm 25 % tổng số ung thư) tính tới năm 2018. Ở Việt Nam, tính tới năm 2018, số ca mắc ung thư vú trên cả nước là 15229 với 6103 ca tử vong [1].

Cơ chế chính xác của ung thư vú vẫn chưa được hiểu rõ nhưng một số nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh có mối liên hệ chặt chẽ giữa mức độ tổn thương DNA cao hơn và khả

năng sửa chữa DNA thấp hơn ở bệnh nhân ung thư vú [2][3]. Sự tái tổ hợp tương đồng (Homologous recombination - HR) được coi như là cơ chế chính cho việc sửa chữa sự đứt gãy sợi đôi DNA – DSB (double-strand break). Hoạt động trung tâm của HR được tạo ra bởi protein RAD51 [4]. Gen XRCC3 (X-Ray Repair Cross-Complementing group 3) của người có vị trí 14q32.3 (cánh dài NST 14, vùng 3, băng 2, băng phụ 3), gồm 17.876 cặp base và có 10 exon mã hóa protein XRCC3 là một thành viên của họ protein RAD51 [5]. Một số đa hình đơn nucleotid (SNP) đã được xác định ở gen này, trong đó, SNP rs1799796 tại vị trí intron 5 đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới phân tích về vai trò với bệnh lý ung thư vú. Kết quả của những báo cáo này còn tồn tại mâu thuẫn. Một

Tác giả liên hệ: Trần Văn Khánh,

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 16/07/2019

Ngày được chấp nhận: 12/08/2019

số nghiên cứu cho thấy sự liên quan giữa SNP rs1799796 có ý nghĩa thống kê. Mặt khác, một số nghiên cứu lại cho biết không có mối liên quan nào giữa SNP rs1799796 và nguy cơ mắc bệnh.

Hiện nay tại Việt Nam, đa hình đơn nucleotide của gen *XRCC3* trên bệnh nhân ung thư vú vẫn đang là vấn đề bỏ ngỏ, do đó đề tài được thực hiện với mục tiêu: Xác định tỷ lệ đa hình đơn nucleotid rs1799796 của gen *XRCC3* trên bệnh nhân ung thư vú và nhóm người bình thường tại Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

- Nhóm bệnh: 150 bệnh nhân mắc ung thư vú điều trị tại Bệnh viện K Trung Ương cơ sở Tân Triều. Các bệnh nhân đã được thăm khám lâm sàng, làm các xét nghiệm cận lâm sàng và giải phẫu bệnh để chẩn đoán xác định ung thư vú.

- Nhóm chứng: 150 phụ nữ không mắc ung thư vú hoặc ung thư nào khác đến khám sức khỏe định kì hoặc vì bệnh lành tính tại bệnh viện Phụ Sản Trung Ương.

Các đối tượng thuộc nhóm bệnh và nhóm chứng được lấy 2ml máu chống đông bằng EDTA.

2. Phương pháp

- Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu theo kit PROMEGA

- Kỹ thuật PCR-RFLP (PCR-Restrict Fragment Length Polymorphism)

Vùng gen chứa SNP rs1799796 của gen *XRCC3* được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp mồi:

Mồi xuôi:

5'-GACACCTCTACAGAGGACG-3'

Mồi ngược:

3'-CTGTGCCTAACCATCGAGAA-5'

Thành phần phản ứng PCR (thể tích 10 µl) gồm: 1,4 µl H₂O, 5,0 µl Tag polymerase, 0,3 µl mồi xuôi, 0,3 µl mồi ngược và 3,0 µl DNA.

Chu trình nhiệt của phản ứng: [94°C/30 giây, 56°C/30 giây, 72°C/30 giây] 35 chu kỳ.

Xác định SNP rs1799796 của gen *XRCC3* bằng kỹ thuật enzym cắt giới hạn:

Thành phần của phản ứng: 0,3 µl enzym Pvu II, 1 µl buffer NE 3.1, 1,7 µl H₂O và 7 µl sản phẩm PCR. Phản ứng cắt được ủ ở 37°C trong khoảng 12 giờ, sau đó điện di trên gel agarose 1,5% với điện thế 80V trong 60 phút và chụp ảnh bằng hệ thống máy EC3 Imaging System. Khi enzym cắt đoạn gen sẽ tạo ra các đoạn DNA có kích thước 650 bp (kiểu gen GG); 283 bp và 367 bp (kiểu gen AA); 280 bp, 367 bp và 650 bp (kiểu gen AG).

3. Phân tích số liệu

Sử dụng phần mềm SPSS 16.0 để phân tích số liệu. Kiểm định X^2 để so sánh tỉ lệ kiểu gen của nhóm bệnh và nhóm chứng. Để ước tính mối liên quan giữa các kiểu gen và khả năng mắc ung thư vú dùng tỉ suất OR với khoảng tin cậy 95%. Các kiểm định ý nghĩa khi $p < 0,05$.

4. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài đã được Hội đồng Đạo đức của trường Đại Học Y Hà Nội chấp thuận theo quyết định số 107/HĐĐĐĐHYHN. 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 được bảo mật.

III. KẾT QUẢ

1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu

Đặc điểm	Nhóm bệnh (n = 150)		Nhóm chứng (n = 150)		p
	n	%	n	%	
Tuổi	≤ 39	22	14,7	29	0,656
	40 – 49	49	32,7	50	
	50- 59	46	30,7	44	
	≥ 60	33	22,0	27	
Tuổi trung bình	49,53 ± 0,83		49,9 ± 11,6		0,48
Tình trạng kinh nguyệt	Mãn kinh	86	57,3	90	0,639
	Còn kinh	64	42,7	60	
Tuổi sinh con lần đầu	≤ 19	1	0,67	3	0,369
	20 – 29	121	80,7	115	
	≥ 30	26	17,3	26	
	Chưa có con	2	1,3	6	

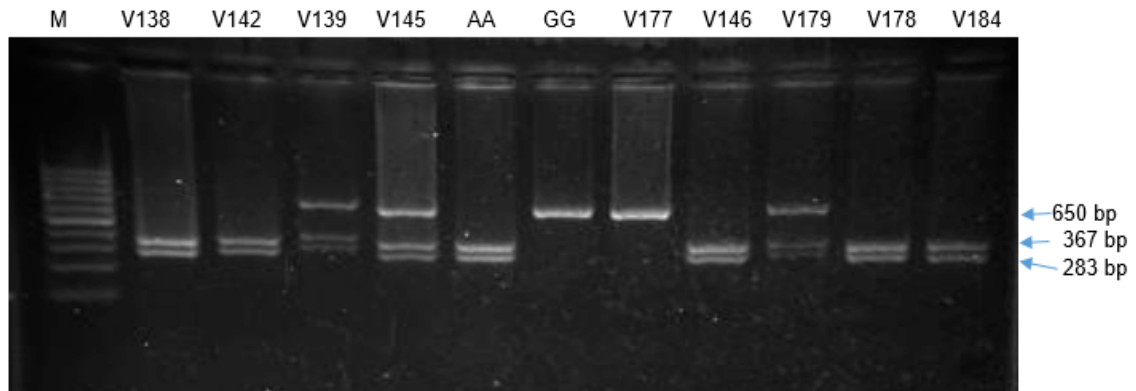
Khi so sánh các tiêu chí về tuổi và tình trạng kinh nguyệt cho thấy nhóm bệnh và nhóm chứng tương đồng nhau với $p > 0,05$. Ở những bệnh nhân ung thư vú, nhóm tuổi mắc bệnh nhiều nhất là nhóm tuổi từ 40 đến 49 tuổi chiếm 32,7% và ít nhất là nhóm tuổi ≤ 39 tuổi chiếm 14,7%. Tuổi trung bình mắc bệnh là 49,53 tuổi. Tuổi sinh con lần đầu trong nhóm bệnh chiếm tỉ lệ nhiều nhất là từ 20 - 29 tuổi (80,7%), hiếm thấy bệnh nhân ung thư vú sinh con lần đầu dưới 19 tuổi (chiếm 1%).

Tỉ lệ bệnh nhân mắc bệnh đã mãn kinh chiếm 57,3%, nhiều hơn so với những bệnh nhân còn kinh (chiếm 42,7%).

2. Mối liên quan giữa SNP rs1799796 với một số yếu tố trong bệnh ung thư vú

Đoạn gen *XRCC3* chứa SNP rs1799796 ở nhóm bệnh nhân ung thư vú sau khi PCR, sản phẩm đã được điện di và soi bản gel dưới tia UV kiểm tra cho hình ảnh rõ ràng, sắc nét, không xuất hiện vạch phụ. Băng điện di có kích thước phù hợp với kích thước của đoạn gen đã PCR là 650 bp.

Các đoạn gen này sau khi khuếch đại (PCR) được cắt bằng enzym PvuII.



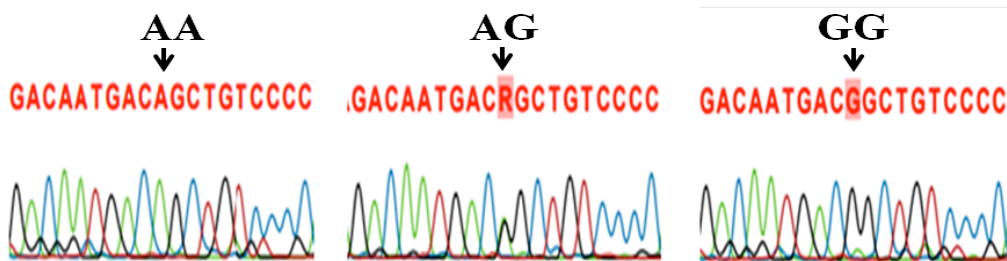
Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt đoạn gen XRCC3 bằng enzym PvuII mẫu bệnh nhân ung thư vú

M: Marker 100 bp; AA: mẫu chứng mang kiểu gen AA; GG: mẫu chứng mang kiểu gen GG; kiểu gen AA (V138, V142, 146, 178, 184); kiểu gen AG (V139, V145, V179); kiểu gen GG (V177).

Sản phẩm của đoạn gen XRCC3 sau khi cắt bằng enzym cho thấy các băng rõ nét, phân tách rõ ràng, kích thước của băng điện di phù hợp với đoạn gen bị cắt với các độ dài là 283 bp, 367 bp, 650 bp.

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

Chúng tôi lựa chọn ngẫu nhiên sản phẩm PCR đại diện của các kiểu gen AA, AG, GG khi phân tích bằng kỹ thuật PCR-RFLP để kiểm tra lại bằng phương pháp giải trình tự. Kết quả kiểm tra được chỉ ra ở hình 2.



Hình 2. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR đoạn gen XRCC3 chứa SNP rs1799796 của các bệnh nhân mang kiểu gen AA, AG, GG

Kết quả giải trình tự thu được trùng khớp với kết quả xác định kiểu gen bằng phương pháp PCR-RFLP.

Bảng 2. Tỷ lệ kiểu gen và kiểu alen của SNP rs1799796 trong nhóm bệnh và nhóm chứng

Kiểu alen và kiểu gen	Nhóm bệnh		Nhóm chứng		p
	n	%	n	%	
Kiểu alen	A	166	55,3	172	p = 0,34
	G	134	44,7	128	

Kiểu alen và kiểu gen	Nhóm bệnh		Nhóm chứng		p	
	n	%	n	%		
Kiểu gen	AA	47	31,3	55	36,7	p = 0,488
	AG	72	48	62	41,3	
	GG	31	20,7	33	22	

Tỷ lệ alen G thu được ở nhóm bệnh là 0,447 và ở nhóm chứng là 0,427.

Ở nhóm bệnh, tỉ lệ kiểu gen AG chiếm nhiều nhất là 48,0%. Tỉ lệ kiểu gen AA thấp hơn là 31,3%. Tỉ lệ kiểu gen GG thấp nhất chỉ chiếm 20,7%. Ở nhóm chứng, tỉ lệ kiểu gen cũng tương tự với tỉ lệ gen AG, AA và GG lần lượt là: 41,3, 36,7% và 22,0%. Không có sự khác biệt về sự phân bố kiểu alen và kiểu gen ở 2 nhóm bệnh và chứng.

Bảng 3. Nguy cơ mắc bệnh của các cặp kiểu gen SNP rs1799796 ở nhóm nghiên cứu

Các cặp kiểu gen	Nhóm bệnh		Nhóm chứng		OR (95%CI)	p	
	n	%	n	%			
GG với AA	GG	31	20,8	33	22,0	1,09 (0,59 - 2,06)	0,767
	AA	47	31,3	55	36,7		
AG với AA	AG	72	48,0	62	41,3	1,36 (0,81 - 2,28)	0,244
	AA	47	31,3	55	36,7		
GG + AG với AA	GG + AG	103	68,7	95	63,3	1,27 (0,78 - 2,05)	0,329
	AA	47	31,3	55	36,7		
GG với AG + AA	GG	31	20,8	33	22,0	0,92 (0,53 - 1,61)	0,778
	AG + AA	119	79,2	117	78,0		
AG với GG + AA	AG	72	48	62	41,3	1,31 (0,83 - 2,07)	0,246
	GG + AA	78	52	88	58,7		

Khi so sánh khả năng mắc bệnh của các kiểu gen chứa alen G với các kiểu gen còn lại cho thấy: không thấy có mối liên quan với khả năng mắc bệnh ung thư vú.

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, độ tuổi của các bệnh nhân thuộc nhóm bệnh dao động từ 23 đến 70 tuổi, hay gặp nhất là bệnh nhân thuộc nhóm khoảng 40 - 59 tuổi, ít gặp nhất là nhóm bệnh nhân ≤ 39 tuổi. Sự phân bố về nhóm tuổi này

cũng tương đồng với một số nghiên cứu của các tác giả khác tại Việt Nam như: Theo tác giả Nguyễn H.Lan thì tỉ lệ mắc bệnh ung thư vú cao nhất cũng ở nhóm 40 - 59 tuổi (chiếm tổng số 69,3%) [6]. Nghiên cứu này cũng phù hợp với

tác giả Nguyễn Tuấn Hưng(2008) [7] .

Về tình trạng kinh nguyệt của nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu, kết quả thu được cho thấy tỉ lệ gặp bệnh nhân ung thư vú trong nhóm mãn kinh cao hơn nhóm còn kinh. Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của các tác giả tại Việt Nam như Nguyễn Bá Đức (2003) [8].

Sau khi xác định được kiểu gen của SNP rs1799796 bằng phương pháp PCR-RFLP và kiểm tra lại bằng kỹ thuật giải trình tự, các số liệu sẽ được phân tích với phép kiểm định X^2 và đo OR với độ tin cậy 95%. Tỉ lệ alen G theo nghiên cứu này trên nhóm chứng là 0,427 và nhóm bệnh là 0,447. Ở Việt Nam, nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Hải Phương về tỉ lệ alen G trên nhóm bệnh nhân ung thư buồng trứng với tỉ lệ alen G trên nhóm chứng là 0,42 và nhóm bệnh là 0,39 [9]. Cùng nghiên cứu trên bệnh nhân ung thư vú, ở châu Á, tại Đài Loan tỉ lệ alen G của SNP rs1799796 ở nhóm chứng là 0,30 và nhóm bệnh là 0,29; còn trên chủng tộc người Ả rập Saudi, theo Alaa Mohammed Ali (2015) thì tỉ lệ này là 0.4 ở nhóm chứng và 0.39 ở nhóm bệnh [9; 10]. Như vậy ở các chủng tộc khác nhau, tỉ lệ SNP là không giống nhau.

Khi tiến hành kiểm định mối liên quan giữa 3 kiểu gen AA, AG và GG, kết quả thu được là 3 kiểu gen này không có sự khác biệt giữa 2 nhóm bệnh và nhóm chứng. Phân tích sâu hơn các dữ liệu để so sánh khả năng mắc bệnh của các kiểu gen chứa alen G và các kiểu gen còn lại, chúng tôi cũng không ghi nhận được mối liên quan có ý nghĩa thống kê với khoảng 95% CI chứa 1. Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với một số nghiên cứu của các tác giả trên thế giới [11; 12]. Tuy nhiên, một vài tác giả khác cũng nghiên cứu SNP rs1799796 trên bệnh nhân ung thư vú lại đưa ra dẫn chứng chứng minh SNP này có liên quan và SNP rs1799796

có vai trò làm giảm nguy cơ mắc bệnh.Theo Bettina Kuschel (2002) nghiên cứu trên 2205 ca bệnh và 1806 phụ nữ Anh khỏe mạnh, so sánh tỉ lệ AG/AA và GG/AA cho kết quả OR= 0,8 ; 95% CI lần lượt là 0,6 – 1,0 và 0,7 -0,9 ; p = 0,008, hoặc theo Shizhong Han 2006 phân tích gộp trên 12518 ca bệnh và 19 526 chứng từ 7 nghiên cứu (11 so sánh), kết quả cho thấy những người có kiểu gen biến thể (G / G + A / G) có nguy cơ ung thư giảm đáng kể so với những người có kiểu gen A / A theo mô hình di truyền trội (OR, 0,92; P = 0,0004; KTC 95%) , 0,87 – 0,96) [13; 14].

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được đa hình đơn nucleotid rs1799796 của gen XRCC3 ở 2 nhóm bệnh nhân ung thư vú và nhóm chứng. Các phân tích dữ liệu cho thấy không có sự khác biệt về sự phân bố kiểu alen và kiểu gen ở 2 nhóm bệnh và chứng, đồng thời không có mối liên quan giữa đa hình đơn nucleotid rs1799796 và nguy cơ mắc ung thư vú.

Lời cảm ơn

Đề tài được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Bộ Y tế “Nghiên cứu xây dựng quy trình xác định đột biến và đa hình thái đơn nucleotid trên một số gen liên quan đến ung thư vú và ung thư buồng trứng”. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Bệnh viện Phụ Sản Trung ương; Bệnh viện K- cơ sở Tân Triều, Bộ môn Hóa Sinh, Trung tâm Nghiên cứu Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **IARC (2012)**. Cancer Fact Sheets: Breast cancer.
2. **Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, Schild D, Tucker JD, Shen MR, et al. (1998)** XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and

protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell* 1, 783 – 7933

3. **Jyothish B, Ankathil R, Chandini R, et al (1998)** DNA repair proficiency: a potential marker for identification of high risk members in breast cancer families. *Cancer Letters*. **124(1)**:9-13. doi:10.1016/S0304-3835(97)00419-9.

4. **Mimitou E.P., Symington L.S. (2009)** Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences*. **34(5)**:264-272. doi:10.1016/j.tibs.2009.01.010.

5. **Tebbs R.S., Zhao Y., Tucker J.D., et al. (1995)** Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92(14)**:6354-6358. doi:10.1073/pnas.92.14.6354

6. **Lan N, Laohasiriwong W, Stewart J.** Survival probability and prognostic factors for breast cancer patients in Vietnam. *Global Health Action*. **2013;6(1)**:18860. doi:10.3402/gha.v6i0.18860.

7. **Nguyễn Tuấn Hưng (2012)**. Một số đặc điểm chung của bệnh nhân ung thư vú đến khám tại bệnh viện K từ năm 2005- 2008. *Tạp chí y học Thực Hành*, **817 (4)**, 44 – 46.

8. **Nguyễn Bá Đức**. Bệnh học ung thư vú, Nhà xuất bản Y học năm 2003. 76 - 88.

9. **Nguyễn Hải Phương, Trần Huy Thịnh, Trần Văn Khánh, Tạ Thành Văn, Nguyễn Việt Tiến (2018)**. Đa hình đơn nucleotide A17893G của gen XRCC3 trong ung thư buồng trứng. *Tạp chí nghiên cứu y học*, **115 (6)**, 53 - 59.

10. **Su C.H., Chang W.S., Hu P.S. et al (2015)**. Contribution of DNA Double-strand Break Repair Gene XRCC3 Genotypes to Triple-negative Breast Cancer Risk. *Cancer Genomics and Proteomics*, **12 (6)**, 359 - 367.

11. **Alaa M.A., Huda A.K., Mohammad A.A et al (2015)**. Polymorphisms in DNA Repair Gene XRCC3 and Susceptibility to Breast Cancer in Saudi Females. *BioMed Research International*, 2016 (2016).

12. **Han J., Hankinson S.E., Ranu H., DeVivo I., and Hunter D.J.**, Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the Nurses' Health study, *Carcinogenesis*, **25(2)**, 189–195, **2004**.

13. **Kuschel B., Auranen A., McBride S. et al. (2002)**, Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility, *Search Results Human Molecular Genetics*, **11(12)**, 1399 – 1407.

14. **Han S., Zhang H.-T., Wang Z. et al. (2006.)**, DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 48 case control studies, *European Journal of Human Genetics*, **14(10)**, 1136 – 1144,

Summary

RELATION BETWEEN XRCC3 GENE POLYMORPHISM RS1799796 AND BREAST CANCER RISK

The gene *XRCC3* that encodes proteins related to RAD51, is involved in homologous recombination (HRR) for DNA and therefore plays an important role in maintaining chromosomal stability and repairing DNA damage. *XRCC3* gene polymorphisms can alter the composition of encoded proteins, and may affect DNA repair function, thereby related to an increase or decrease in cancer risk including breast cancer. This study was conducted with the aim of determining the polymorphism of rs1799796 in intron 5 of the *XRCC3* gene in the group of patients with breast

cancer compared to the control group. 150 patients with breast cancer and 150 healthy women were selected for the study. Using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RCR-RFLP) to analyze genotypes of *XRCC3*, we determined the distribution rate and susceptibility of genotypes. The frequency of allele A is 0.553 and allele G is 0.447. In the study group, the distribution of genotype AA, AG, GG are AA, AG, GG genotypes were 31.3%, 48.0%, 20.7% and in the control group, the distribution of genotype AA, AG, GG are 36.7%, 41.3%, 22.0%. Data analysis showed no relation between single nucleotide polymorphism rs1799796 and risk of breast cancer.

Keywords: Breast cancer, SNP A17893G, rs1799796, *XRCC3* gene.