

NGHIÊN CỨU SƠ BỘ BIẾN THỂ SỐ LƯỢNG BẢN SAO DNA TY THỂ Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ VÚ VIỆT NAM

Nguyễn Hoàng Tuyết Minh¹, Ngô Quốc Đạt¹, Nguyễn Văn Thắng¹,
Phạm Quốc Thắng¹, Thái Anh Tú², Phạm Minh Tâm²,
Phạm Văn Hùng¹, Đào Thị Minh Nhã¹, Nguyễn Thị Lệ Hương¹

TÓM TẮT

Bối cảnh: Những thay đổi về số lượng bản sao DNA ty thể (mtDNA-CN) ở nhiều loại khối u khác nhau có liên quan đến nguy cơ ung thư tăng cao. Tuy nhiên, các nghiên cứu về mối liên hệ của chúng với ung thư vú ở bệnh nhân Việt Nam vẫn chưa được xác định. Trong nghiên cứu sơ bộ này, chúng tôi đã nghiên cứu biến thể mtDNA-CN ở các mô vú lành và ung thư và so sánh sự khác biệt của chúng. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 12 mẫu mô lành và mô u liên kế từ cùng một bệnh nhân ung thư vú đã được sử dụng cho nghiên cứu. Tổng số DNA bộ gen đã được phân lập và những thay đổi trong mtDNA-CN đã được đo bằng phương pháp định lượng tương đối sử dụng phương pháp Real-time PCR SYBR Green. **Kết quả:** Hệ số tương quan R² cho mỗi đường cong chuẩn là $\geq 0,98$. 12 bệnh nhân, trung bình 45,83 tuổi ($\pm 9,73$), được xác định là ung thư vú xâm lấn giai đoạn đầu hoặc tiến triển tại chỗ, một số không di căn đến hạch bạch huyết (N0) hay có di căn (N1). Các khối u được phân loại là cấp độ 2 trở lên, với kích thước từ 3 đến 45 mm. Kết quả của chúng tôi cho thấy sự giảm đáng kể mtDNA-CN trong các mô vú ung thư so với các mô vú lành ($p = 0,0226$). **Kết luận:** Nhìn chung, nghiên cứu của chúng tôi báo cáo sự so sánh mtDNA-CN trong các mô vú lành và ung thư, cho thấy rằng hàm lượng mtDNA giảm trong ung thư vú có thể có giá trị chẩn đoán bệnh. **Từ khóa:** mtDNA, số bản sao, ung thư vú, bệnh nhân Việt Nam

SUMMARY

PILOT STUDY ON MITOCHONDRIAL DNA COPY NUMBER VARIATIONS IN VIETNAMESE BREAST CANCER PATIENTS

Background: Changes in mitochondrial DNA copy number (mtDNA-CN) in various tumor types have been linked to an increased risk of cancers. However, studies on their association with breast cancer in Vietnamese patients remain to be determined. In this pilot study, we investigated mtDNA-CN variation in paired normal and cancerous breast tissues and compared their differences. **Methods:** 12 paired tissues from adjacent normal and tumor sites from the same breast cancer patients were utilized for the study. Total genomic DNA was isolated and changes in

mtDNA-CN were measured by relative quantification using the SYBR green based quantitative Real-time PCR method. **Results:** The R² correlation for each standard curve was $\geq 0,98$. The 12 individuals, averaging 45.83 years old (± 9.73), were identified with early-stage invasive or locally advanced breast cancer, some with no lymph node involvement (N0) and others with (N1). Tumors, classified as grade 2 or higher, with sizes ranging from 3 to 45 mm. Our results revealed a significant reduction in mtDNA-CN in cancerous breast tissues compared with the normal ones ($p=0.0226$). **Conclusions:** Overall, our study reports a comparison of mtDNA-CN in paired normal and cancerous breast tissues and suggests that decreased mtDNA content in breast cancer may have diagnostic value for the disease. **Keywords:** mtDNA, copy number, breast cancer, Vietnamese patients

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên toàn cầu, ung thư vú ở phụ nữ là loại ung thư được chẩn đoán thường xuyên nhất và là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư, chiếm gần 12% số ca tử vong trong số tất cả các loại ung thư. Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc ung thư vú ở phụ nữ đã tăng đều đặn trong hai thập kỷ qua, vượt gấp đôi so với loại ung thư phổ biến thứ hai là ung thư đại trực tràng. Phát hiện sớm rất quan trọng trong bối cảnh này, do đó, cần xác định các nguy cơ tiềm ẩn hoặc nguyên nhân gây bệnh để cải thiện chẩn đoán và chiến lược điều trị.[1]

Trong những năm 1920, Otto Warburg là người đầu tiên đưa ra giả thuyết rằng các tế bào khối u, trái ngược với các tế bào bình thường, biểu hiện hoạt động đường phân cao hơn và hô hấp ty thể giảm, ngay cả khi có oxy. Hiện tượng chuyển hóa này được công nhận là "hiệu ứng Warburg". Nhiều cơ chế cơ bản của quá trình điều hòa năng lượng tế bào bị gián đoạn có liên quan đến rối loạn chức năng ty thể. Trong những năm gần đây, ngày càng có nhiều bằng chứng chỉ ra vai trò gây bệnh do rối loạn chức năng ty thể trong nhiều loại ung thư khác nhau. Đặc biệt, các biến thể mtDNA-CN đã được đề xuất là dấu ấn sinh học sớm của khối u.[2]

Ty thể là trung tâm sinh năng lượng và tổng hợp sinh học quan trọng cho các chức năng của tế bào và sức khỏe con người. Bên cạnh nhân, ty thể là bào quan duy nhất có DNA riêng. Bộ gen ty thể của con người bao gồm một phân tử vòng

¹Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

²Bệnh viện Ung Bướu Thành phố Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hoàng Tuyết Minh

Email: nhtminh@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 12.6.2024

Ngày phản biện khoa học: 7.8.2024

Ngày duyệt bài: 27.8.2024

sợi kép dài 16,6 kb và chứa 37 gen mã hóa 13 protein ty thể, 2 rRNA và 22 tRNA. So với DNA nhân (nuDNA), mtDNA dễ bị tổn thương hơn do thiếu histon bảo vệ, khả năng sửa chữa mtDNA hạn chế và tiếp xúc liên tục với các loài oxy phản ứng (ROS). mtDNA-CN có từ hàng trăm đến hàng nghìn bản sao trong mỗi tế bào, với sự thay đổi đáng kể giữa các loại tế bào và mô. Có khả năng mtDNA-CN là kết quả của sự tương tác giữa các yếu tố di truyền và môi trường như hormone, chế độ ăn uống, lão hóa và stress oxy hóa, tất cả đều được biết là có liên quan đến sự phát triển của ung thư. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng những thay đổi trong mtDNA-CN có thể liên quan đến nhiều loại ung thư khác nhau. mtDNA-CN giảm đã được phát hiện ở ung thư dạ dày, phổi và vú. Ngược lại, mtDNA-CN tăng đã được xác định trong ung thư buồng trứng, u hắc tố và đầu và cổ. Những thay đổi trong mtDNA-CN có thể liên quan chặt chẽ đến nguy cơ ung thư vú vì stress oxy hóa đã được chỉ ra là một yếu tố quan trọng trong nguyên nhân gây ung thư vú.[3]

Nghiên cứu về mtDNA-CN trong các mô ung thư vú và các mô lành ở phụ nữ Việt Nam vẫn còn hạn chế. Do đó, nghiên cứu sơ bộ này nhằm mục đích sử dụng Real-time PCR SYBR Green để phát hiện những thay đổi trong mtDNA-CN trong các mô ung thư vú so với các mô lành liền kề trong một nhóm gồm 12 phụ nữ Việt Nam tham gia, có khả năng chỉ ra tính hữu ích của nó như một dấu ấn sinh học cho nguy cơ ung thư vú.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập mẫu mô từ bệnh nhân ung thư vú. Nghiên cứu này đã được Hội đồng Y Đức Bệnh viện Ung bướu Thành phố Hồ Chí Minh và Hội đồng Y Đức tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh chấp thuận.

Chúng tôi đã thu thập hồi cứu các mẫu mô cố định bằng formalin đúc parafin (FFPE) từ 12 bệnh nhân ung thư vú đã cắt bỏ vú tại Bệnh viện Ung bướu TP.HCM, Việt Nam. Trước khi phẫu thuật, không có bệnh nhân nào trong số những bệnh nhân này đã được hóa trị hoặc xạ trị. Các nhà giải phẫu bệnh đã đánh giá các vùng chỉ định từ cả mô ung thư và mô lành trên các tiêu bản mô bệnh học. Hồ sơ chi tiết về tình trạng bệnh lý của khối u - hạch - di căn (TNM) dựa trên hệ thống phân giai đoạn của Ủy ban Ung thư Hoa Kỳ, ấn bản lần thứ 8. Đối với mỗi mẫu, 15 lát cắt, mỗi lát dày 10 μ m, được lấy từ các khối mô FFPE tương ứng để tách chiết DNA.

2.2. Tách chiết DNA. Việc tách chiết DNA từ các khối mô vú FFPE được thực hiện bằng Bộ tách chiết QIAamp (Qiagen, Frederick, MD, Hoa

Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trước khi tách chiết DNA, các lát cắt parafin được khử trong xylene ở nhiệt độ phòng, sau đó rửa bằng cồn 100%, theo các quy trình tiêu chuẩn. Sau đó, các mẫu được sấy khô trong không khí và DNA được tách bằng bộ Qiamp DNA mini. Độ tinh sạch của các mẫu DNA được đánh giá bằng Nanodrop trước khi phân tích mtDNA-CN. Các mẫu có lượng DNA không đủ đã bị loại khỏi phân tích mtDNA-CN.

2.3. Định lượng số bản sao DNA ty thể.

Số bản sao của DNA ty thể được xác định bằng cách định lượng lượng mtDNA so với nuDNA bằng Real-time PCR. Các đoạn mã đặc hiệu gen mtDNA là mt-tRNA^{Leu}(UUR) (Mũi xuôi: 5'-CACCAAGAACAGGGTTT GT-3' và Mũi ngược: 5'-TGGCCATGGGTATGTTGTAA-3') và các đoạn mã gen nuDNA là gen B2M (Mũi xuôi: 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3' và Mũi ngược: 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3') đã được sử dụng để định lượng mtDNA-CN như đã mô tả trong các tài liệu trước đây.[4]

10 mẫu mô lành đã được pha loãng liên tiếp 1:2 để tạo ra hai đường cong chuẩn từ 0,3125 ng đến 10 ng DNA. Đối với mỗi phản ứng qPCR, 5 ng DNA được khuếch đại trong hỗn hợp phản ứng 10 μ l chứa 1 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, Hoa Kỳ) và 400 nM mũi xuôi và ngược. Tất cả các mẫu được đo lặp lại 2 lần và giá trị Ct trung bình cho các mục tiêu mtDNA và nuDNA được tính bằng cách tính trung bình các kết quả thu được từ các cặp đôi. Định lượng theo thời gian thực được thực hiện như sau: 10 phút ở 95 °C, tiếp theo là 40 chu kỳ 15 giây ở 95 °C và 1 phút ở 60 °C bằng thiết bị Quant 5. Những thay đổi tương đối về số lần được xác định bằng phương pháp $2\Delta Ct$ ($\Delta Ct = Ct \text{ nuDNA} - Ct \text{ mtDNA}$). Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism (Phiên bản 9.0, San Diego, CA, Hoa Kỳ). So sánh giá trị trung bình giữa hai nhóm được thực hiện bằng kiểm định t của Student. Sự khác biệt giữa hai nhóm có mức ý nghĩa $P < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu này nhằm mục đích kiểm tra các biến thể trong mtDNA-CN giữa các mô lành và mô khối u được lấy từ cùng một bệnh nhân ung thư vú đã trải qua các phẫu thuật. Bảng 1 phác thảo các đặc điểm của bệnh nhân tham gia nghiên cứu. Độ tuổi trung bình của 12 bệnh nhân là 45,83 tuổi ($\pm 9,73$). Những bệnh nhân này được chẩn đoán mắc ung thư vú xâm lấn giai đoạn đầu hoặc ung thư vú tiến triển tại chỗ,

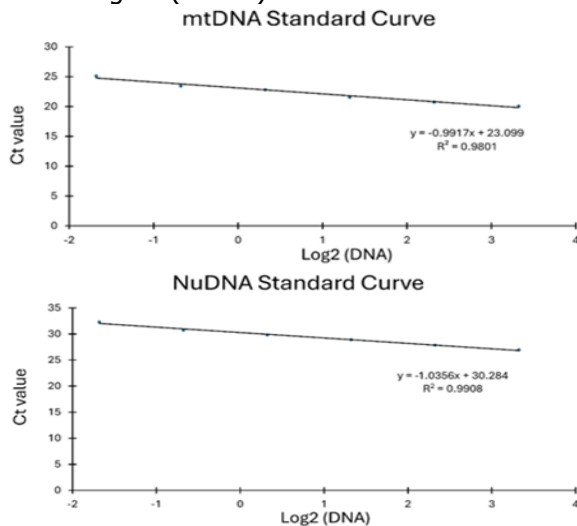
không di căn (N0) hoặc di căn đến 1 đến 3 hạch bạch huyết (N1). Các khối u biểu hiện cấp độ 2 trở lên, biểu thị các tế bào phát triển nhanh có khả năng di căn. Ngoài ra, kích thước khối u tổng thể dao động từ 3 đến 45 mm (Bảng 1).

Bảng 1: Thông tin lâm sàng - bệnh lý của bệnh nhân ung thư vú.

Số mẫu	Tuổi	Giai đoạn	Hạch bạch huyết	Độ mô học	Kích thước khối u (mm)
1	65	IIB	N1	3	30
2	61	IIB	N1	3	23
3	43	IIB	N1	2	21
4	35	IA	N0	2	3
5	40	IIA	N0	2	23
6	46	IA	N0	3	17
7	38	IIA	N1	2	11
8	50	IIB	N1	2	45
9	51	IA	N0	3	15
10	48	IA	N0	3	13
11	37	IIB	N1	2	40
12	36	IA	N0	2	18

Tuổi trung bình: 45.83±9.73

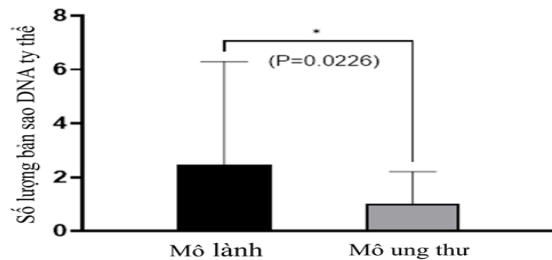
NuDNA và mtDNA được tách chiết đồng thời từ các mô FFPE. Đường cong chuẩn cho xét nghiệm định lượng gen mt-tRNA^{Leu}(UUR) và B2M được thể hiện trong Hình 1. Các đường hồi quy, dựa trên sáu điểm dữ liệu dao động từ 0,3125 ng đến 10 ng DNA, thể hiện tính tuyến tính tốt. Hệ số tương quan (R2) cho các đường cong chuẩn của mt-tRNA^{Leu}(UUR) và B2M lần lượt là 0,98 và 0,99, cho thấy mức độ chính xác chấp nhận được đối với phương pháp định lượng của chúng tôi (Hình 1).



Hình 1: Đường chuẩn của mt-tRNA^{Leu}(UUR) và B2M

Chúng tôi đã tính toán hàm lượng mtDNA trong các mô bằng công thức $2^{\Delta Ct}$ (trong đó ΔCt

= Ct nuDNA - Ct mtDNA). mtDNA-CN ở các mô ung thư thấp hơn đáng kể 2,5 lần so với mô lành (kiểm định t của Student, $p < 0,05$) (Hình 2). Những kết quả này cho thấy hàm lượng mtDNA trong các mô khối u giảm đáng kể so với mô lành.



Hình 2: Số lượng bản sao ty thể của mô lành và mô ung thư

IV. BÀN LUẬN

Ty thể là bào quan tế bào được đặc trưng bởi hai màng riêng biệt và chứa khoảng một phần mười protein tế bào. DNA của chúng tự sao chép độc lập và được di truyền theo dòng mẹ, khác với DNA nhân. Mỗi tế bào người có hàng trăm đến hàng nghìn ty thể, với mỗi ty thể chứa tới mười bản sao mtDNA. Bên cạnh vai trò trong sản xuất năng lượng, ty thể còn là một phần không thể thiếu trong nhiều chức năng của tế bào, bao gồm chuyển hóa trung gian, cân bằng ion, tổng hợp các phân tử thiết yếu như lipid, axit amin và nucleotide, vận chuyển tích cực và điều hòa apoptosis.[5]

Những thay đổi trong mtDNA-CN đã được quan sát thấy ở nhiều loại ung thư khác nhau, cho thấy sự liên quan của chúng trong quá trình sinh bệnh ung thư. Các nghiên cứu về ung thư phổi, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư dạ dày và ung thư vú đã báo cáo rằng mtDNA-CN giảm, trong khi một số loại ung thư như ung thư biểu mô tế bào vảy thực quản, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tuyến tụy và ung thư buồng trứng đã cho thấy hàm lượng mtDNA tăng. Sự khác biệt giữa các phát hiện này có thể bắt nguồn từ các yếu tố như quy mô mẫu, loại mô, đặc điểm nhân khẩu học của bệnh nhân, đặc điểm lâm sàng hoặc khuynh hướng di truyền.[6]

Nghiên cứu của chúng tôi, sử dụng Real-time PCR SYBR Green, đã phát hiện ra rằng hàm lượng mtDNA giảm 2,5 lần trong các mô khối u so với các mô lành liền kề ở 12 phụ nữ Việt Nam, phù hợp với các báo cáo trước đây về ung thư vú. Những khám phá ban đầu vào năm 2006 đã làm nổi bật mức mtDNA giảm trong các mẫu ung thư vú so với các mô không phải khối u, được hỗ trợ bởi các nghiên cứu tiếp theo chỉ ra rằng đột biến soma góp phần vào sự giảm này. Hơn nữa,

phần lớn các mô ung thư vú xâm lấn biểu hiện mtDNA-CN giảm so với các mô lành.[7] Các nghiên cứu năm 2010 đã liên kết hàm lượng mtDNA cao hơn với tỷ lệ sống sót không mắc bệnh giảm khi đáp ứng với phương pháp điều trị bằng anthracycline, với các phân tích gần đây xác nhận sự giảm đáng kể mtDNA-CN trong các trường hợp u vú. MtDNA-CN thấp được quan sát thấy ở các khối u có thể mang lại khả năng chịu đựng tình trạng thiếu oxy cao hơn, giảm sự phụ thuộc vào quá trình phosphoryl hóa oxy hóa ty thể để sản xuất năng lượng và thúc đẩy các con đường phân giải kỵ khí. Sự thay đổi chuyển hóa này tạo điều kiện cho khối u xâm lấn và sống sót trong điều kiện thiếu oxy.[8]

V. KẾT LUẬN

Những phát hiện của chúng tôi chứng minh tính khả thi của việc định lượng mtDNA-CN trong các mô vú bằng cách sử dụng PCR thời gian thực SYBR Green, cho thấy sự giảm đáng kể trong các mô ung thư vú. Do quy mô nghiên cứu nhỏ nên cần phải thực hiện trong một nhóm lớn hơn. Tuy nhiên, những phát hiện của chúng tôi cho thấy số lượng bản sao mtDNA có thể đóng vai trò là một công cụ chẩn đoán đầy hứa hẹn cho bệnh ung thư vú.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này đã được tài trợ kinh phí thực hiện bởi Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 11/2021/HĐ-ĐHYD, ngày

15/03/2021.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Sedeta ET, Jobre B, Avezbakiyev B.** Breast cancer: Global patterns of incidence, mortality, and trends. JCO. 2023 Jun 1;41(16_suppl):10528–10528.
- Verschoor ML, Ungard R, Harbottle A, Jakupciak JP, Parr RL, Singh G.** Mitochondria and Cancer: Past, Present, and Future. BioMed Research International. 2013;2013:1–10.
- Hsu CC, Tseng LM, Lee HC.** Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. Exp Biol Med (Maywood). 2016 Jun;241(12):1281–95.
- Bai RK, Chang J, Yeh KT, Lou MA, Lu JF, Tan DJ, et al.** Mitochondrial DNA Content Varies with Pathological Characteristics of Breast Cancer. Journal of Oncology. 2011;2011:1–10.
- Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR.** Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2012 Dec;26(6):711–23.
- Abd Radzak SM, Mohd Khair SZ, Ahmad F, Patar A, Idris Z, Mohamed Yusoff A.** Insights regarding mitochondrial DNA copy number alterations in human cancer (Review). Int J Mol Med. 2022 Jun 16;50(2):104.
- Xia P, An HX, Dang CX, Radpour R, Kohler C, Fokas E, et al.** Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. BMC Cancer. 2009 Dec;9(1):454.
- Cui H, Huang P, Wang Z, Zhang Y, Zhang Z, Xu W, et al.** Association of decreased mitochondrial DNA content with the progression of colorectal cancer. BMC Cancer. 2013 Dec;13(1):110.

GIÁ TRỊ CHẨN ĐOÁN CỦA THỜI GIAN CẢM GIÁC RUNG Ở NGƯỜI BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG CÓ BIẾN CHỨNG BỆNH ĐA DÂY THẦN KINH ĐỐI XỨNG NGỌN CHI

Tô Thu Hương¹, Hồ Công Dũng², Nguyễn Văn Hương^{1,3}, Đinh Thị Thanh³

TÓM TẮT

Mục đích: Khảo sát giá trị chẩn đoán của thời gian cảm giác rung (TGCGR) bằng âm thoa 128 Hz ở các người bệnh có biến chứng đa dây thần kinh đối xứng ngọn chi (Distal symmetric polyneuropathy -

DSPN) mắc đái tháo đường. **Đôi tượng và phương pháp nghiên cứu:** 80 người bệnh đái tháo đường có DSPN và 80 người bệnh không có DSPN không có DSPN tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội được đánh giá TGCGR và phân tích mối liên quan với các đặc điểm lâm sàng. **Kết quả:** Tuổi trung bình của nhóm DSPN và không DSPN lần lượt là 61,10 và 57,59 ($p < 0,05$). Với người bệnh dưới 60 tuổi TGCGR < 8 giây có độ nhạy và độ đặc hiệu với DSPN lần lượt là 68,4% và 97,9% trong khi với người bệnh từ 60 tuổi trở lên TGCGR < 5 giây có độ nhạy và độ đặc hiệu với DSPN lần lượt là 66,7% và 75,0%. **Kết luận:** Khám định lượng TGCGR là kỹ thuật nhanh, tiện lợi và có độ nhạy cao hơn phương pháp định tính trong chẩn đoán bệnh DSPN. Do đó cần áp dụng vào thực hành khám lâm sàng để phát hiện sớm, góp phần nâng cao chất lượng

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An

³Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Tô Thi Thu Hương

Email: dr.tohuong@gmail.com

Ngày nhận bài: 12.6.2024

Ngày phản biện khoa học: 8.8.2024

Ngày duyệt bài: 28.8.2024