

nhóm thuốc Omeprazole và Lansoprazole.

Kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi còn hạn chế khi so sánh với các nghiên cứu khác trên thế giới và Việt Nam, nguyên nhân có thể do chưa có nhiều nghiên cứu về tỉ lệ nguy cơ gãy xương cao theo mô hình FRAX ở người cao tuổi sử dụng thuốc ức chế bơm proton đơn lẻ trên thế giới và riêng ở Việt Nam.

V. KẾT LUẬN

Tỉ lệ loãng xương ở người cao tuổi có sử dụng thuốc ức chế bơm proton là 52,7%, trong đó nữ và nam giới lần lượt là 55,7% và 30,8% ($p = 0,017$).

Tỉ lệ nguy cơ gãy xương cao ở người cao tuổi có sử dụng thuốc ức chế bơm proton là 53,2%, trong đó nữ giới và nam có tỉ lệ là 52,1% và 61,5% ($p = 0,363$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **E. Lespessailles, H. Toumi.** Proton Pump Inhibitors and Bone Health: An Update Narrative Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23.
2. **J. W. Kim, S. Park, J. Y. Jung, et al.** Prevalence and Factors of Osteoporosis and High

- Risk of Osteoporotic Fracture in Patients with Ankylosing Spondylitis: A Multicenter Comparative Study of Bone Mineral Density and the Fracture Risk Assessment Tool. *J Clin Med.* 2022;11.
3. **L. Wang, M. Li, Y. Cao, et al.** Proton Pump Inhibitors and the Risk for Fracture at Specific Sites: Data Mining of the FDA Adverse Event Reporting System. *Sci Rep.* 2017;7:5527.
4. **M. H. Chung, Y. C. Chen, W. T. Wu, et al.** Clinical Use of Lansoprazole and the Risk of Osteoporosis: A Nationwide Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19.
5. **M. R. Fattahi, R. Niknam, M. Shams, et al.** The Association Between Prolonged Proton Pump Inhibitors Use and Bone Mineral Density. *Risk Manag Healthc Policy.* 2019;12:349-355.
6. **Trần Thị Thanh Tú.** Khảo sát chất lượng cuộc sống và các yếu tố liên quan trên bệnh nhân cao tuổi loãng xương và thiếu xương. Luận văn Thạc sĩ Y học Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. 2020.
7. **Y. H. Shin, H. S. Gong, G. H. Baek.** Lower Trabecular Bone Score is Associated With the Use of Proton Pump Inhibitors. *J Clin Densitom.* 2019;22:236-242.
8. **Y. S. Chou, H. J. Jiang, C. H. Chen, et al.** Proton pump inhibitor use and risk of hip fracture in patients with type 2 diabetes. *Sci Rep.* 2020;10:14081.

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG BẢN SAO TY THỂ TỪ MẪU MÔ FFPE

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

Ty thể là bào quan của tế bào nhân thực, chịu trách nhiệm cho việc tạo ra năng lượng. Bộ gen ty thể có cấu trúc phân tử DNA dạng vòng, dài 16569 cặp base chứa 37 gen mã hóa cho 13 protein, 22 tRNA, và 2 rRNA. Mỗi ty thể có thể chứa hàng trăm đến hàng ngàn bản sao, tùy thuộc vào loại tế bào. Tuy nhiên, sự thay đổi số lượng bản sao của DNA ty thể (mtDNA-CN) đã được chứng minh có liên quan với các trạng thái bệnh lý khác nhau bao gồm cả ung thư. Các mô cố định bằng formalin, đúc paraffin (FFPE) là nguồn vật liệu quý để chẩn đoán, nghiên cứu quá trình sinh bệnh của ung thư. Tuy nhiên, DNA được tách chiết từ các mô FFPE bị phân hủy mạnh do liên kết chéo giữa các sợi axit nucleic. Real-time PCR (Real-time PCR) là phương pháp tiêu chuẩn vàng để đo lường mtDNA-

CN. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết lập một phương pháp Real-time PCR sử dụng SYBR Green đơn giản để xác định mtDNA-CN từ những mẫu FFPE.

Từ khóa: ty thể, mẫu FFPE, Real-time PCR

SUMMARY

APPLICATION OF REAL-TIME PCR TECHNIQUE TO DETERMINE MITOCHONDRIAL COPY NUMBER FROM FFPE SAMPLES

Mitochondria are organelles of eukaryotic cells responsible for energy production. The mitochondrial genome has a circular DNA structure, 16,569 base pairs long, containing 37 genes encoding 13 proteins, 22 tRNAs, and 2 rRNAs. Each mitochondrion can contain hundreds to thousands of copies, depending on the cell type. However, changes in the number of mitochondrial DNA copies (mtDNA-CN) have been shown to be associated with various pathological conditions, including cancer. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues are valuable materials for diagnosing and studying cancer pathogenesis. However, DNA extracted from FFPE tissues is heavily degraded due to cross-linking between nucleic acid strands. Real-time PCR is the gold standard method for measuring mtDNA-CN. In this study, we

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: 8.8.2024

Ngày duyệt bài: 26.8.2024

established a simple SYBR Green Real-time PCR method to determine mtDNA-CN from FFPE samples.

Keywords: Mitochondria, FFPE, Real-time PCR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ty thể là bào quan chịu trách nhiệm sản xuất ATP trong tế bào. mtDNA là một cấu trúc vòng với 16569 cặp base (bp), mã hóa 13 chuỗi polypeptide cần thiết cho quá trình lắp ráp các phức hợp enzyme hô hấp I, III, IV và V. Phần lớn các polypeptide khác cấu thành nên các phức hợp enzyme hô hấp được mã hóa trong DNA hạt nhân (nDNA). Bốn tiểu đơn vị của phức hợp enzyme hô hấp II được mã hóa hoàn toàn trong nDNA. Vùng không mã hóa (D-loop), là vùng điều hòa cho quá trình sao chép và phiên mã mtDNA. Mỗi tế bào người chứa từ vài trăm đến hàng nghìn ty thể và mỗi ty thể chứa 2-10 bản sao DNA ty thể (mtDNA) để tạo thành mạng lưới ty thể. Lượng ATP sản xuất chịu ảnh hưởng bởi số lượng bản sao mtDNA và sự phong phú của ty thể trong các loại tế bào khác nhau và các điều kiện sinh lý khác nhau. Do đó, mtDNA-CN là một dấu ấn sinh học sớm, hữu ích để giám sát những thay đổi trong các rối loạn chuyển hóa hoặc các bệnh khác nhau bao gồm cả ung thư. [1]

Các mô FFPE là nguồn vật liệu lưu trữ sinh học và xác định bệnh học qua hình thái tế bào. Ngoài ra, chúng thường được sử dụng cho cả nghiên cứu và phân tích phân tử lâm sàng dựa trên khuếch đại DNA bằng xét nghiệm PCR và Real-time PCR. DNA tách chiết từ các mô FFPE cũng được sử dụng để chẩn đoán nhiều bệnh ung thư. Formalin là chất cố định được sử dụng rộng rãi nhất trong mô bệnh học do một số ưu điểm, nhưng nó làm hỏng axit nucleic mô bằng cách liên kết chéo với protein mô, sau đó dẫn đến sự phân mảnh DNA và RNA. [2]

Real-time PCR là một lựa chọn thuận lợi cho phân tích định lượng các dấu hiệu ung thư. Real-time PCR có thể được thực hiện trên các gen mục tiêu có ít bản sao và trên DNA bị phân hủy, do độ nhạy tăng và phù hợp nhất với DNA được tách chiết từ các mô nhúng paraffin. Máy Real-time PCR kết hợp chu kỳ nhiệt với thu nhận huỳnh quang. Huỳnh quang của thuốc nhuộm DNA hoặc đầu dò được theo dõi ở mỗi chu kỳ trong PCR. Ct (chu kỳ ngưỡng) là số chu kỳ phân số mà huỳnh quang vượt qua ngưỡng cố định. SYBR Green là thuốc nhuộm huỳnh quang được sử dụng rộng rãi do giá thành thấp và dễ sử dụng. [3]

Real-time PCR là phương pháp tiêu chuẩn vàng để định lượng mtDNA-CN. Mục đích của nghiên cứu của chúng tôi là tách chiết DNA từ

các mô FFPE và thiết lập phản ứng Real-time PCR SYBR Green để xác định số lượng mtDNA-CN trong mẫu FFPE của bệnh nhân ung thư.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mười khối mô ung thư vú FFPE lưu trữ trong vòng một năm đã được sử dụng để tách chiết DNA. Chúng tôi cắt mỗi mẫu 5 lát mỏng với độ dày 10 μ m. 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.

Tách chiết DNA bằng cột Qiagen. Bộ QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Frederick, MD, Hoa Kỳ) đã được sử dụng theo quy trình của nhà sản xuất. Các mô được khử paraffin bằng xylene, sau đó rửa hai lần bằng ethanol 100% hai lần để loại bỏ xylene còn sót lại. Sau khi tách paraffin, các mô được ủ qua đêm ở 56°C với 180 μ l dung dịch đệm ATL và 20 μ l proteinase K. Sau đó, 200 μ l dung dịch đệm AL được thêm vào và ủ ở 70°C trong 10 phút, và kết tủa bằng ethanol. Dung dịch được chuyển vào cột ly tâm và rửa. DNA được rửa giải bằng 50 μ l dung dịch đệm AE.

Đánh giá độ tinh sạch và nồng độ DNA sau tách chiết. Độ tinh sạch (OD260/OD280) và nồng độ của DNA thu được được đo bằng phương pháp quang phổ Nanodrop (Sambrook, 1989).

Phản ứng Real-time PCR. Real-time PCR được thực hiện trên DNA mô ung thư vú được tách chiết theo quy trình Qiagen. Gen mt-tDNA_{Leu}(UUR) và Gen B2M được khuếch đại bằng SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, Hoa Kỳ), trên QuantStudio™ 5 Real-Time PCR. Đối với mỗi phản ứng qPCR, 5 ng DNA được khuếch đại trong hỗn hợp phản ứng 10 μ l chứa 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, Hoa Kỳ) và 400 nM mỗi xuôi và mỗi ngược.

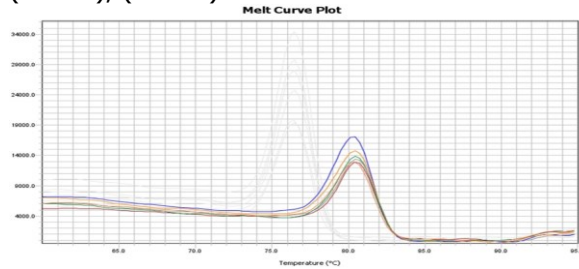
mt-tRNA_{Leu}(UUR) gene (mỗi xuôi: 5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3' và mỗi ngược: 5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTAA-3') và B2M gene (mỗi xuôi: 5'-TGCTGTCTCCATGTTTATGATATCT-3' và mỗi ngược 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3') [4].

Tất cả các mẫu được đo độc lập với độ lặp 2 lần và giá trị Ct trung bình cho các mục tiêu mtDNA và nuDNA được tính bằng cách lấy trung bình các kết quả thu được từ 2 lần lặp. Real-time PCR 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 Quantstudio 5 Real-time PCR.

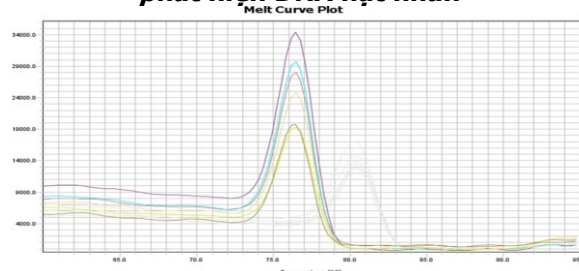
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Quy trình tách chiết DNA đã được thực hiện để đánh giá chất lượng và nồng độ của các mẫu mô FFPE. Nồng độ tối đa trong khoảng 59 - 163 ng/ul. Chất lượng DNA thu được có độ tinh sạch tối đa với A260/280 là 1,86 – 2,06.

Đường cong nóng chảy của các sản phẩm Real-time PCR cho thấy một đỉnh duy nhất, thể hiện độ đặc hiệu cao của quá trình khuếch đại (Hình 1), (Hình 2).

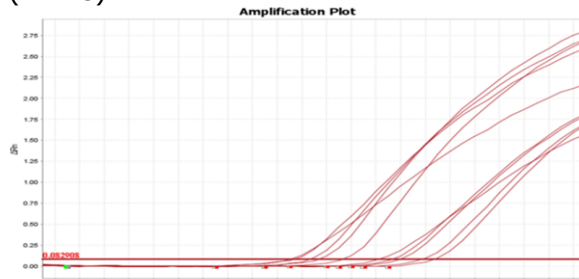


Hình 1: Đường cong nóng chảy của B2M để phát hiện DNA hạt nhân



Hình 2: Đường cong nóng chảy của mt-tDNA Leu(UUR) để phát hiện DNA ty thể

Tất cả các mẫu riêng lẻ đều cho giá trị Ct dưới 33. Giá trị Ct đối với B2M, biểu thị tổng DNA hạt nhân, dao động từ 25,18 đến 30,80 ở mô ung thư. Tương tự như vậy, các giá trị Ct đối với mt-tDNA Leu(UUR), đại diện cho tổng DNA ty thể, dao động từ 19,61 đến 24,08 trong các mô ung thư. Trong mọi trường hợp, các giá trị Ct của mtDNA luôn thấp hơn giá trị của nuDNA, cho thấy lượng mtDNA cao hơn trong các mô vú (Hình 3).



Hình 3: Biểu đồ khuếch đại SYBER Green của gen mt-tDNA Leu(UUR) và B2M để phát hiện DNA hạt nhân và mtDNA

IV. BÀN LUẬN

Ty thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa năng lượng, stress oxy hóa và quá trình chết tế bào theo chương trình. mtDNA dễ bị tổn thương do các chất gây ung thư trong môi trường. Sự thay đổi số lượng bản sao mtDNA và các đột biến mtDNA có liên quan đến nhiều căn bệnh. [5] Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng số lượng bản sao mtDNA thay đổi có mối tương quan với sự biệt hóa tế bào khối u. Sự thay đổi trong số lượng bản sao mtDNA có thể là một sự kiện sớm trong quá trình gây ung thư. [6]

Việc đánh giá một loạt các dấu hiệu khối u trong các mẫu FFPE trong các nghiên cứu phân tử đang ngày càng tăng nhanh. Phân tích DNA thường được thực hiện trong các mô tươi hoặc đông lạnh nhanh. Các mẫu sinh thiết được thường quy cố định trong formalin và đúc paraffin để kiểm tra bệnh lý. [7] Mặc dù các phương pháp bảo quản này đã được tối ưu hóa để phân tích mô học và miễn dịch học của các mẫu FFPE nhưng không được coi là phù hợp để tách chiết DNA do hiệu suất DNA thấp, kích thước nhỏ của các đoạn được tách chiết và mức DNA có thể phát hiện được trong các tách chiết thấp. Do đó, việc tối ưu hóa tách chiết DNA từ các mô FFPE là cần thiết để áp dụng trong các nghiên cứu phân tử. [8]

Trong nghiên cứu này, DNA có thể được tách chiết từ các mô FFPE bằng bộ QIAamp DNA Mini kit. DNA được tách chiết từ các mô FFPE phù hợp để khuếch đại bằng Real-time PCR SYBR Green và có thể chứng minh thành công số lượng bản sao ty thể trong các mô này của các trường hợp ung thư vú. Do đó, kết quả cho thấy rằng kho lưu trữ các mô FFPE có giá trị trong các nghiên cứu hồi cứu, phân tử và di truyền ty thể.

V. KẾT LUẬN

Ty thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa năng lượng, stress oxy hóa và quá trình chết tế bào theo chương trình. Thay đổi số lượng bản sao mtDNA và các đột biến liên quan có thể là dấu hiệu sớm của ung thư và nhiều bệnh lý khác. Mặc dù DNA từ mô FFPE thường bị suy giảm chất lượng, nghiên cứu này đã chứng minh rằng việc tách chiết và khuếch đại mtDNA từ mô FFPE bằng phương pháp Real-time PCR SYBR Green là khả thi và hiệu quả.

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

1. Casanova A, Wevers A, Navarro-Ledesma S, Pruimboom L. Mitochondria: It is all about energy. *Front Physiol.* 2023 Apr 25;14:1114231.
2. Dedhia P, Tarale S, Dhongde G, Khadapkar R, et al. Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pac J Cancer.* 2007;8(1):55–59.
3. Christopher B. Jackson, Sabina Gallati, André Schaller. qPCR-based mitochondrial DNA quantification: Influence of template DNA fragmentation on accuracy. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Volume 423, Issue 3, 2012, 441-447.
4. 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.
5. Alejandro Alegria Torres J. The mitochondrial DNA copy number used as biomarker. *Int J Mol Biol Open Access.* 2018;3(3):117–119
6. Birch-Machin MA. Using mitochondrial DNA as a biosensor of early cancer development. *Br J Cancer.* 2005 Aug;93(3):271–2.
7. Font A, Tort F, Navarro-Sastre A, Cusí V, Garcia-Villoria J, Briones P, Ribes A. Quantitative Analysis of mtDNA Content in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Muscle Tissue. *JIMD Rep.* 2011;1:125-9.
8. S. Cardoso, Z.S. Quintero-Niño, X. Elcoroaristizabal, I. Guerra-Merino, M.M. de Pancorbo, Mitochondrial DNA analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples: Effect of formalin on DNA stability and its implications in genetic studies. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* Volume 3, Issue 1, 2011, e518-e519.

KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM CÁC HÌNH THÁI ĐẶC KHÍ KHI NHĨ CHÂM HUYỆT GỐI TRÊN NGƯỜI TÌNH NGUYỆN KHỎE MẠNH

Nguyễn Thị Hương Dương¹, Phạm Trương Thiên Phúc¹,
Tăng Khánh Huy¹, Lâm Cẩm Tiên*, Lê Bảo Lưu¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát các hình thái đặc khí khi nhĩ châm huyết Gối trên người tình nguyện khỏe mạnh. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm bắt chéo có đối chứng trên 80 tình nguyện viên khỏe mạnh được phân bố ngẫu nhiên vào 2 nhóm: Nhóm nghiên cứu nhĩ châm huyết Gối (nhóm A) và nhóm chứng giả nhĩ châm huyết Gối (nhóm B). Sau khi thực hiện rồi kích thích huyết mỗi 5 phút trong vòng 30 phút, khảo sát các hình thái đặc khí sau khi nhĩ châm 30 phút với thời điểm trước khi nhĩ châm. **Kết quả:** Khi nhĩ châm huyết Gối ở cả hai bên, cảm giác nhức, đau, nặng, căng đầy và ấm là hình thái đặc khí phổ biến sau khi nhĩ châm chiếm > 50%. **Kết luận:** Khi nhĩ châm huyết Gối ở cả hai bên, cảm giác nhức, đau, nặng, căng đầy và ấm là các hình thái đặc khí phổ biến sau khi nhĩ châm so với các cảm giác còn lại. **Từ khóa:** nhĩ châm, huyết Gối, vùng gối, các hình thái Đặc khí.

SUMMARY

CHARACTERISTICS OF DEQI SENSATIONS WHEN USING AURICULAR ACUPUNCTURE AT THE KNEE ACUPOINT

Objectives: Investigating characteristics of deqi sensations while using auricular acupuncture (AA) at

Knee point in healthy volunteers. **Methods:** An experimental crossover study with a control group was conducted on 80 healthy volunteers randomly assigned into two groups: Group A used AA on Knee acupoint, and Group B used sham AA on Knee acupoint. After performing and stimulating the acupuncture every 5 minutes for 30 minutes, deqi sensations are recorded after the 30-minute acupuncture process. **Results:** When using AA at the Knee acupoint on both sides of the ears, aching, soreness, heaviness, fullness/distension and warmth are the most common deqi sensations after using AA, which accounted more than >50%. **Conclusion:** When using AA at the Knee acupoint on both ear, aching, soreness, heaviness, fullness/distension and warmth are the most common deqi sensations after using AA. **Keywords:** auricular acupuncture, Knee acupoint, Knee area, deqi sensations.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nội kinh Tố vấn có đề cập đến vai trò của nhĩ châm, trong đó nhắc đến tai không phải bộ phận cô lập mà có liên quan mật thiết với toàn bộ cơ thể con người, với lục phủ ngũ tạng. Từ đó, nhĩ châm đã được các thầy thuốc lưu truyền và sử dụng để điều trị bệnh cho đến ngày nay. Theo Nogier, loa tai đại biểu cho hình thái của bào thai lộn ngược, đầu chúc xuống, chân ở trên. Trong số 39 vị trí huyết nhĩ châm được WHO thông qua, huyết Gối là huyết nhĩ châm đang được ứng dụng nhiều bởi vai trò và hiệu quả trên lâm sàng với nhiều công trình nghiên cứu được công bố ở các lĩnh vực chuyên khoa

¹Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Lê Bảo Lưu

Email: lebaoluu@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 11.6.2024

Ngày phản biện khoa học: 8.8.2024

Ngày duyệt bài: 27.8.2024