

Tần suất thấp đột biến arg249ser và cys266ser của gen p53 trên bệnh nhân phơi nhiễm chất độc hóa học/Dioxin

Nguyễn Linh Toàn*; Nguyễn Hoàng Thanh**; Nguyễn Bá Vượng**

TÓM TẮT

Bằng phương pháp giải trình tự gen trực tiếp 100 mẫu ADN đã được khảo sát vùng nóng có thể xảy ra đột biến trên gen p53 của bệnh nhân (BN) phơi nhiễm với chất độc hóa học/Dioxin. Kết quả cho thấy: có 2 đột biến điểm ở vị trí 1473^{G/T} và 1522^{T/A} trên gen p53 làm thay đổi axit amin tương ứng Arg249Ser và Cys266Ser. Tần suất thấp xuất hiện đột biến điểm Arg249Ser là 0,04 và hiếm gặp Cys266Ser là 0,01.

* Từ khóa: Gen p53; Dioxin; Arg249Ser; Cys266Ser.

Low frequency mutated arg249ser and cys266ser of gene p53 on patients exposed to chemical toxic agents/dioxin

SUMMARY

p53 plays an important role in cell cycle control and apoptosis. Defective p53 could allow abnormal cells to proliferate, resulting in cancer. The 100 DNA samples isolated from patients exposed to chemical toxic agents/Dioxin were analysed by direct sequencing on hotspot region which may occur mutations on p53 gene. Results indicated that point mutations at position 1473G/T and 1522T/A of p53 gene led to change of amino acid Arg249Ser and Cys266Ser, respectively. The low frequency of the point mutations were Arg249Ser of 0.04 and rarely mutated Cys266Ser of 0.01.

* Key words: Gene p53; Dioxin; Arg249Ser; Cys266Ser.

ĐẶT VẤN ĐỀ

p53 có vai trò quan trọng trong điều hòa chu trình tế bào và gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis). p53 khu trú ở nhiễm sắc thể số 17, mã hoá protein p53 có kích thước 393 axit amin (aa) và trọng lượng

phân tử 53 kilo dalton (kD). Protein p53 có chức năng điều hoà kiểm soát sự phát triển tế bào và ức chế sự hình thành u bằng con đường thúc đẩy tế bào chết theo chương trình và làm dừng sự phân chia của tế bào ở bất kỳ điểm nào trong nhiều điểm kiểm soát của tế bào. Khi có tổn thương ở ADN,

* Học viện Quân y

** Bệnh viện 103

Phân biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

p53 làm ngừng chu trình tế bào cho đến khi ADN bị tổn thương được sửa chữa hoặc làm chết tế bào theo chương trình nếu không còn khả năng sửa chữa ADN [1, 3].

Đột biến gen p53 có thể làm thay đổi cấu trúc protein p53, gây thay đổi chức năng kiểm soát điều hòa của nó. Người ta thấy rằng, những đột biến mất chức năng p53

làm tăng tính bất ổn định di truyền và giảm chết tế bào theo chương trình [4, 5]. Trên 50% BN mắc bệnh ung thư như ung thư vú, ung thư đại tràng, ung thư phổi, ung thư gan, thực quản, não và nhiều cơ quan khác đều có điểm khác biệt hoặc đột biến trên gen mã hoá p53 so với người bình thường [7]. Một số nghiên cứu gần đây chứng minh mối quan hệ giữa đột biến gen p53 và phát triển ung thư. Do vùng nóng của đột biến này có chuỗi trình tự nucleotid AGGCC, là vị trí bám dính của độc tố aflatoxin β 1 (AFB1), từ trước tới nay nhiều nghiên cứu chủ yếu tập trung trên đối tượng BN ung thư có liên quan chất độc này. Tuy nhiên, đối với nạn nhân tiếp xúc lâu dài với chất độc hóa học/Dioxin, hiện có rất ít thông tin đề cập tới đột biến vùng nóng này của p53 [3,10]. Vì vậy, nghiên cứu xác định đột biến xảy ra trên gen mã hoá p53 ở nạn nhân tiếp xúc lâu dài với chất độc hóa học/Dioxin có thể liên quan tổn thương ở mức phân tử, cũng là một yếu tố dự báo và tiên lượng bệnh có ý nghĩa quan trọng trong áp dụng các biện pháp chẩn đoán và hỗ trợ nạn nhân.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

- 100 BN gồm 96 nam và 4 nữ, chủ yếu ở lứa tuổi 50 - 60, cao nhất: 61 - 70 (34% và 49%), còn lại ở các lứa tuổi khác, được thu dung điều trị tại Khoa AM7, Bệnh viện 103, là nạn nhân chất độc hóa học (CĐHH)/Dioxin. Phần lớn BN là cựu chiến binh đã tham gia chiến đấu tại chiến trường miền Nam trước 1975, bị phơi nhiễm trực tiếp hoặc gián tiếp.

- Tất cả BN được thăm khám lâm sàng, xét nghiệm, thu thập hồ sơ theo mẫu thống

nhất, theo dõi đăng ký đầy đủ trong quá trình điều trị tại AM7, Bệnh viện 103.

2. Phương pháp nghiên cứu.

- Nghiên cứu cắt ngang, tiến cứu và phân tích gen.

* *Thu thập mẫu bệnh phẩm*: lấy máu BN 1 lần (tại thời điểm khi đưa vào nghiên cứu), tách khối tế bào máu giàu bạch cầu và huyết tương riêng, bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng.

* *Phương pháp tách ADN*: tách từ khối tế bào máu ngoại vi, sử dụng bộ kit của hãng QIAgen. Quy trình tách, tinh sạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kiểm tra nồng độ ADN tổng số và độ tinh sạch trên hệ thống Nano Drop, đảm bảo sử dụng được cho phản ứng PCR.

* *Trình tự môi (primer)*: bộ môi p53-F1 và p53-R1 dùng làm bộ môi chính nhân đoạn gen p53 từ vị trí 13.970 đến vị trí 14.176 (206bp) để giải trình tự vùng nóng có đột biến liên quan trong ung thư. Trình tự môi: p53 F1: 5'-CTTGCCACAGGTCTCCCAA-3' và p53 R1: 5'-AGGGGTCAGCGCAA-GCAGA-3'

* *Thành phần phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen p53*: đệm 10X 2,5 μl , môi p53-F1 (15 pM) 0,5 μl , môi p53-R1 (15 pM) 0,5 μl , dNTPs (2 mM) 2,5 μl , Mg^{2+} (25 mM) 3 μl , Taq DNA polymerase 0,2 μl , dH₂O 10,8 μl , ADN khuôn 5 μl . Chu trình nhiệt: 1 vòng 95°C x 5 phút; 40 vòng (94°C x 30 giây, 55°C x 30 giây, 72°C x 45 giây), kết thúc 72°C x 7 phút.

* *Giải trình tự gen trực tiếp (direct DNA-sequencing)*. Sau khi nhân sản phẩm PCR thành công bằng cặp môi p53-F1 và p53-R1, giải trình tự trực tiếp bằng các bước sau: tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ kit PCR purification của Bioneer (các bước tiến hành

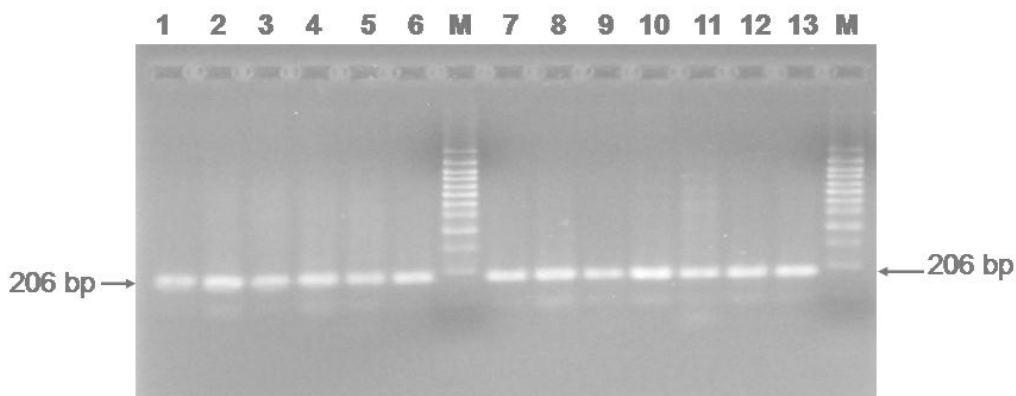
theo chỉ dẫn của nhà sản xuất). Để kiểm tra độ tinh sạch cũng như định lượng một cách tương đối hàm lượng ADN của sản phẩm PCR đã qua tinh sạch, chúng tôi tiến hành điện di lại trên agarose và đo trên máy quang phổ ở 2 bước sóng 260 nm và 280 nm. Sản phẩm PCR sau khi đã qua tinh sạch sẽ làm khuôn cho phản ứng PCR giải trình tự. Các trình tự sau đó được xuất ra và phân tích bằng

phần mềm BioEdit. Sau khi giải trình tự gen, so sánh kết quả với trình tự chuẩn trên ngân hàng dữ liệu theo địa chỉ trang Web:http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome. Sau đó trình tự gen được phân tích trên phần mềm Bioedit 7.05.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả nhân đoạn gen p53.

Gen p53 có kích thước lớn, do vậy chúng tôi chỉ khảo sát đoạn gen có đột biến được xác định trong những nghiên cứu trước đây. Cụ thể, khảo sát đoạn gen có vị trí từ 13.970 đến vị trí 14.176. Phản ứng PCR với cặp mồi p53 F1 và p53 R1, cho kết quả 100/100 (100%) mẫu có sản phẩm PCR điển hình, không có băng phụ trên gel agarose với kích thước đặc hiệu 206 bp.



Hình 1: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen p53.

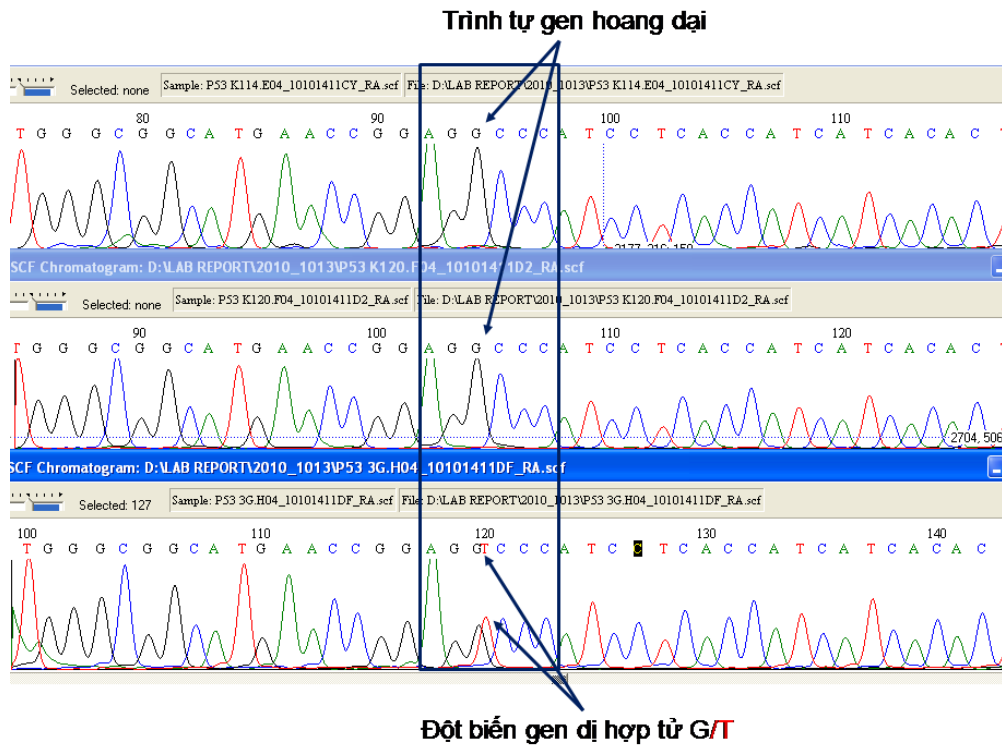
1-13: sản phẩm PCR nhân đoạn gen p53 của BN tương ứng. M: thang chuẩn ADN.

2. Hình ảnh các đột biến điểm gen p53 điển hình.

Giải trình tự gen sản phẩm PCR này cho thấy 80/100 (80%) mẫu có trình tự gen điển hình mang kiểu gen hoang dại (wildtype) không khác biệt hay thay đổi nào về trình tự các nucleotide. Bằng chương trình Bioedit, phân tích so sánh với trình tự gen chuẩn NT_010718.16,

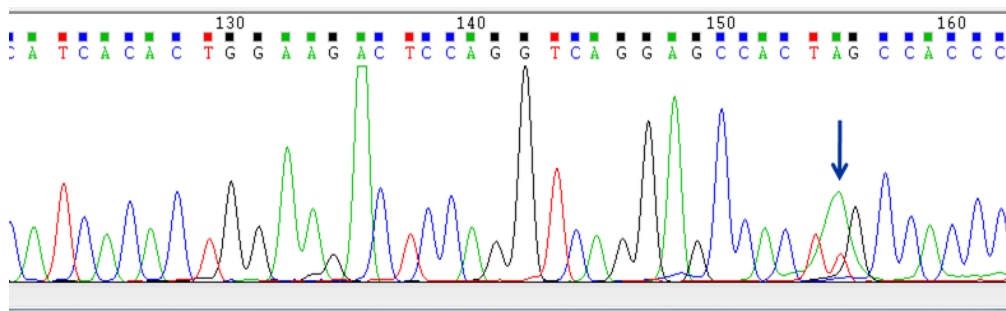
NW_001838403, NW_926584.1 cho thấy: 100% tương đồng về trình tự nucleotide của đoạn gen p53 người. Phân tích trình tự ADN trên đoạn gen p53 tại vị trí 14.073 thấy 4/100 mẫu thay đổi nucleotide là guanosine chuyển thành thymine (G→G/T). Chính sự thay đổi này của nucleotide đã làm thay đổi axit amin tại vị trí 249 (arginine → serine, 249

ser) (hình 2, bảng 1, 2). Ngoài ra, tại vị trí 14522 thấy 1/100 mẫu thay đổi nucleotide adenine chuyển thành thymine (A→A/T). Chính sự thay đổi này của nucleotide làm thay đổi axit amin tại vị trí 266 (Cysteine → Serine, 266 ser) (hình 3, bảng 1, 2).



Hình 2: Hình đột biến gen p53 guanosine (G) chuyển thành thymine (T).

(Biểu đồ trên cùng và ở giữa: gen p53 không đột biến (hoang dại); biểu đồ dưới cùng: gen p53 vị trí 14073 đột biến dạng dị hợp tử G/T).



Hình 3: Biểu đồ trình tự đoạn gen p53 xuất hiện đột biến điểm tại vị trí 14522 T/A.

3. Đặc điểm và tỷ lệ đột biến điểm ở vị trí 1.473 và 1.572 của gen p53.

Bảng 1: Đặc điểm và vị trí đột biến điểm vị trí 1.473 và 1.522 của gen p53.

VỊ TRÍ TRÊN GEN p53	THAY ĐỔI VỀ NUCLEOTID	THAY ĐỔI VỀ AXIT AMIN
1473	G/T	Arg249Ser
1522	T/A	Cys266Ser

Ở BN phơi nhiễm chất độc hóa học/Dioxin xuất hiện đột biến điểm vị trí 1.473 và 1.522 của gen p53, dẫn đến thay đổi axit amin theo thứ tự là Arg249Ser và Cys266Ser trong cấu trúc phân tử p53.

Bảng 2: Tần suất xuất hiện đột biến điểm vị trí 1.473 và 1.522 của gen p53.

THAY ĐỔI VỀ NUCLEOTIDE	THAY ĐỔI VỀ AXIT AMIN	SỐ MẪU (n = 100, f)
1473G/T	Arg249Ser	4/100 (0,04)
1522T/A	Cys266Ser	1/100 (0,01)

Tần suất xuất hiện đột biến điểm vị trí 1473 và 1522 của gen p53 ở BN tiếp xúc chất độc hóa học theo thứ tự Arg249Ser là 0,04 và Cys266Ser là 0,01.

BÀN LUẬN

Cơ chế phân tử liên quan bệnh sinh của chất độc hóa học/Dioxin được nhiều nhà khoa học thừa nhận là do tác động trực tiếp của Dioxin lên tế bào, chủ yếu thông qua protein thụ cảm thể có tên là aryl hydrocarbon receptor (AhR) [4]. Nhiều nghiên cứu cho thấy: khi tiếp xúc với Dioxin, tế bào tăng cường biểu lộ gen mã hóa AhR kèm theo rối loạn quá trình phiên mã (transcription) của nhiều gen tham gia vào quá trình điều hòa tăng sinh và chu kỳ phân bào như: TGF, cyclin A và oncogen như c-myc, c-Fos... Thông qua AhR, Dioxin hoạt hóa biểu hiện các gen như: cytochrome P4501A1 (Cyp1A1), plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2)... Trong khi đó, nó lại làm suy giảm (ức chế) biểu hiện gen mã hóa yếu tố sinh trưởng chuyển hóa TGF-beta2 (transforming growth factor-beta 2)... Kết quả: quá trình phân bào bị rối loạn, gây hậu quả tiếp theo rất đa dạng. Dioxin làm thay đổi (ức chế, giảm biểu hiện) gen mã hóa glucose transporter-4 (GLUT-4, protein vận chuyển đường glucose) [4, 10]. Đặc biệt, Dioxin tác động lên các gen của tế bào sinh sản, bám vào chất thụ cảm thể hormon tế bào, làm thay đổi chức năng và cơ chế di truyền của tế bào. Hậu quả gây ra hàng loạt biến đổi như: Dioxin làm thay đổi bộc lộ gen mã hóa 17-20 lyase (CYP17A1)... Kết quả, lượng hormon của tế bào trứng như progesteron và estradiol giảm, dẫn đến hậu quả nghiêm trọng. Dioxin tác động lên sự phát triển của tinh hoàn (gây teo). Liên quan đến tác động của Dioxin, gen mã hóa cho protein 25-Dx (thuộc siêu họ protein: cytokine/yếu tố sinh trưởng/chất thụ cảm prolactin) có thể gắn với progesteron, là chất thụ cảm của hormon này. Tác động của Dioxin lên các gen nhất định đôi khi còn phụ thuộc vào giới tính: chẳng hạn dioxin làm tăng hoạt tính

tyrosine kinase (TK) ở con đực, trong khi lại làm giảm hoạt tính này ở con cái. Dioxin có thể liên quan đến sự phát sinh và phát triển của nhiều bệnh ung thư thông qua thay đổi ở gen quan trọng như p53, p27Kip1, p21/waf1, cdc2p34 kinase và cdk4 [4, 10]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện tần suất thấp đột biến điểm ở vị trí 1473G/T và 1522T/A, tương ứng với thay đổi trên trình tự axit amin của phân tử p53 là Arg249Ser và Cys266Ser với tần suất 0,04 và 0,01. Tuy nhiên, chức năng của những thay đổi này liên quan đến bệnh lý do con người phơi nhiễm chất độc hóa học/Dioxin như thế nào cần được nghiên cứu tiếp. Như vậy, kết quả nghiên cứu này cùng những nghiên cứu trước đây đều thống nhất bên cạnh các nguyên nhân khác, đột biến gen p53 đóng vai trò hết sức quan trọng trong sinh bệnh học nhiễm chất độc hóa học/Dioxin [1, 4].

KẾT LUẬN

Từ kết quả giải trình tự gen trực tiếp 100 mẫu ADN của BN phơi nhiễm chất độc hóa học/Dioxin vùng nóng của gen p53, chúng tôi rút ra một số kết luận: đột biến điểm ở vị trí 1473G/T và 1522T/A của gen p53 tương ứng với thay đổi trên trình tự axit amin Arg249Ser và Cys266Ser. Tần suất xuất hiện những đột biến này theo thứ tự Arg249Ser là 0,04 và hiếm gặp là Cys266Ser là 0,01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al. P53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990, 50, pp.7717-7722.
2. Blagosklonny MV. Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of the order. *Semin Cancer Biol.* 2003, 13 (2), pp.97-105. [PubMed].
3. Lim SO, Kim H, Jung G. p53 inhibits tumor cell invasion via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett.* 2010, Jun 3, 584 (11), pp.2231-2236.
4. Lindén J, Lensu S, Tuomisto J, Pohjanvirta R. Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol.* 2010 Oct, 31 (4), pp.452-78
5. Geusau A, Abraham K, Geissler K, Sator MO, Stingl G, Tschachler E. Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environ Health Perspect.* 2001, 109 (8), pp.865-869.
6. Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 2007 Feb 8, 445 (7128), pp.656-660.
7. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 Mutations in human cancers. *Science* 1991, 253, pp.49-53
8. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989, 342, pp.705-708.
9. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991, 351, pp.453-456.
10. Soussi T, Caron de Fromental C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 1990, 5, pp.945-952.