

**ĐỘT BIẾN GEN p53 LIÊN QUAN ĐẾN UNG THƯ GAN TRÊN BỆNH NHÂN
NHIỄM VIRUT VIÊM GAN B**

Nguyễn Thị Kim Chinh*; Nguyễn Trọng Chính; Lê Hữu Song****

TÓM TẮT

Đột biến gen p53 được chứng minh là có liên quan đến tiến triển ung thư gan (UTG). Tuy nhiên, mối liên quan giữa đột biến gen p53 với UTG trên bệnh nhân (BN) nhiễm virus viêm gan B (HBV) vẫn chưa hoàn toàn sáng tỏ. Nghiên cứu tiến hành trên 94 BN UTG và 100 người khỏe mạnh. Xác định đột biến gen p53 bằng PCR-RFLP. Kết quả cho thấy tỷ lệ đột biến gen p53 tại vị trí 249 (Arginine → Serine) ở nhóm BN cao hơn so với nhóm chứng (12,7% so với 3%, $p < 0,05$) và có liên quan đến sự tiến triển thành UTG [OR (95% CI) = 4,6 (1,2 - 26,1)]. Nghiên cứu chứng minh đột biến gen p53 có liên quan đến sự tiến triển thành UTG trên BN nhiễm HBV.

* Từ khóa: Gen p53; Ung thư gan; Virus viêm gan B.

**p53 GENE MUTATION IS ASSOCIATED WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA
IN PATIENTS INFECTED WITH HEPATITIS B VIRUS**

SUMMARY

It has been demonstrated that p53 gene mutation is associated with the progression of hepatocellular carcinoma (HCC). However, the relationship between p53 gene mutation with HCC in patients infected with hepatitis B virus (HBV) is still unclear. 94 HCC patients infected with HBV and 100 healthy control were enrolled in this study. The p53 gene mutation was identified by PCR-RFLP. Results showed that p53 gene mutation at codon 249 (Arginine → Serine) was found more frequent in HCC patient than in healthy control (12.7% vs 3%, $p < 0.05$) and associated with the progression of HCC [OR (95% CI) = 4.6 (1.2 - 26.1)]. The results indicated that p53 gene mutation was associated with the progression of HCC in patients infected with HBV.

* Key words: Gene p53; Hepatocellular carcinoma (HCC); Hepatitis B virus.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư gan là một trong những bệnh ác tính thường gặp trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Nguyên nhân gây UTG đã được

xác định là do nhiễm virus viêm gan B (HBV), viêm gan C (HCV), nghiện rượu, hay nhiễm một số hóa chất độc hại qua đường ăn uống như aflatoxin B1 (AFB1) [1]. Những nguyên nhân này đều có liên quan đến biến đổi của

* Đại học Y Hà Nội

** Bệnh viện TWQĐ 108

Phản biện khoa học: PGS. TS. Trần Văn Khoa

nhiều gen, trong đó có cả gen của virut và gen của bản thân cơ thể chủ [2]. Một gen có tác dụng ức chế u đã được nghiên cứu nhiều là gen p53. Gen này khu trú trên nhiễm sắc thể số 17, mã hoá protein p53 có kích thước 393 axit amin (aa) và trọng lượng phân tử 53 kD. Protein p53 có chức năng điều hoà kiểm soát sự phát triển tế bào và ức chế hình thành u bằng con đường thúc đẩy tế bào chết theo chương trình và khả năng làm dừng phân chia của tế bào. Khi có đột biến gen này, chức năng của protein p53 bị thay đổi, quy trình chết theo chương trình của tế bào bị đảo lộn, khả năng ức chế phát triển của khối u không còn, dẫn đến hình thành các khối ung thư. Nghiên cứu về mối liên quan giữa nhiễm HBV và UTG người ta thấy rằng HBx, một kháng nguyên của HBV có khả năng làm cản trở quá trình sửa chữa chậm của đột biến này, đồng thời gen HBx cũng có một đoạn trình tự tương tự như gen p53, do đó chúng có khả năng gắn kết với nhau [3]. Nghiên cứu gần đây cho thấy đột biến gen p53 tại vị trí đặc hiệu 249 đã kết hợp với đột biến gen HBx để gây tăng sinh tế bào, một nguyên lý liên quan đến UTG [4]. Thực tế, nhiều nghiên cứu gần đây của Kirk DG và CS (2005) cho thấy: đột biến điểm 249^{ser} trên gen p53 gặp ở 24,6% BN UTG có HBsAg (+), trong khi đó đột biến này chỉ gặp 0,3% trên nhóm người khoẻ mạnh; đồng thời nguy cơ tiến triển UTG trên BN nhiễm HBV có đột biến gen p53 cao hơn nhóm người khoẻ mạnh 399 lần [5].

Ở Việt Nam, do tỷ lệ nhiễm HBV cao, nhưng từ trước tới nay chủ yếu tập trung nghiên cứu vai trò của HBV trong bệnh nguyên gây UTG, nghiên cứu liên quan đến

gen p53 chưa nhiều. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: *Khảo sát tỷ lệ đột biến gen p53 trên BN UTG nhiễm HBV.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

94 BN UTG nhiễm HBV được điều trị tại Bệnh viện TWQĐ 108. Tiêu chuẩn chẩn đoán dựa vào khám lâm sàng, có thể sờ thấy khối u, xét nghiệm Alpha Foeto Protein (AFP) huyết thanh tăng, siêu âm gan có khối khu trú hoặc tổn thương lan toả, hoặc CT-scanner có khối u nghi ngờ UTG. Tất cả BN được chọc hút tế bào gan dưới hướng dẫn của siêu âm để làm tế bào học xác định có tế bào ung thư, HBsAg (+).

- Nhóm chứng: 100 người khoẻ mạnh, không có bất kỳ các triệu chứng bệnh lý nào được ghi nhận, HBsAg (-), anti-HCV (-), anti-HIV (-).

2. Phương pháp nghiên cứu.

Nghiên cứu tiến cứu, mô tả, cắt ngang.

** Phương pháp phát hiện đột biến gen p53:*

Mỗi BN được lấy 2 ml máu toàn phần chống đông EDTA và phân tích tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TWQĐ 108. Tách máu toàn phần thành huyết tương và khối tế bào. Từ khối tế bào, tách chiết ADN tổng số bằng kit Qiagene theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đoạn gen p53 được nhân lên bằng phản ứng trùng hợp chuỗi polymerase (PCR) với mỗi đặc hiệu. Sau đó, kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên thạch agarose. Đoạn mồi sử dụng là p53 F1: 5'-CTTGCCACAGGTCTCCCCAA-3' và p53 R1: 5'-AGGGGTCAGCGCAAGCAGA-3'). Khi cần thiết, sẽ sử dụng đoạn mồi trong p53

F2: 5'-AGGCGCACTGGCCTCATCTT-3' và p53 R2: 5'-TGTGCAGGGTGGCAAGTG-GC-3'. Điều kiện phản ứng là: hoạt hoá HotStarTaq polymerase ở 95⁰C 15 phút, sau đó 50 chu kỳ (94⁰C, 30 giây, 60⁰C, 30 giây, và 72⁰C, 30 giây), tiếp theo là 72⁰C trong 5 phút. Kích thước của sản phẩm là 177 bp. Ủ sản phẩm PCR cắt bằng enzym HaeIII (Boehringer Mannheim, Germany), enzym này sẽ cắt phức bộ GG|CC tại vị trí 249 (AGG). Trong một số các trường hợp nghi ngờ, tiến hành giải trình tự gen trên hệ thống giải trình tự gen tự động CEQ 8800 của Beckman Coulter (Mỹ).

* Phương pháp định lượng nồng độ HBV ADN:

Định lượng HBV ADN trong huyết tương bằng phương pháp RT - PCR theo nguyên lý Taqman trên hệ thống ABI 7500 (Applied Biosystem, Mỹ).

* Phân tích thống kê:

Phân tích số liệu bằng thuật toán non-parametric Mann-Whitney U-test, chi bình phương (Chi(2) test), so sánh không đối xứng T-test, so sánh 2 tỷ lệ, 2 số trung bình bằng các phần mềm Statview, version 4.57 (www.statview.com) và chương trình STATA (www.stata.com).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

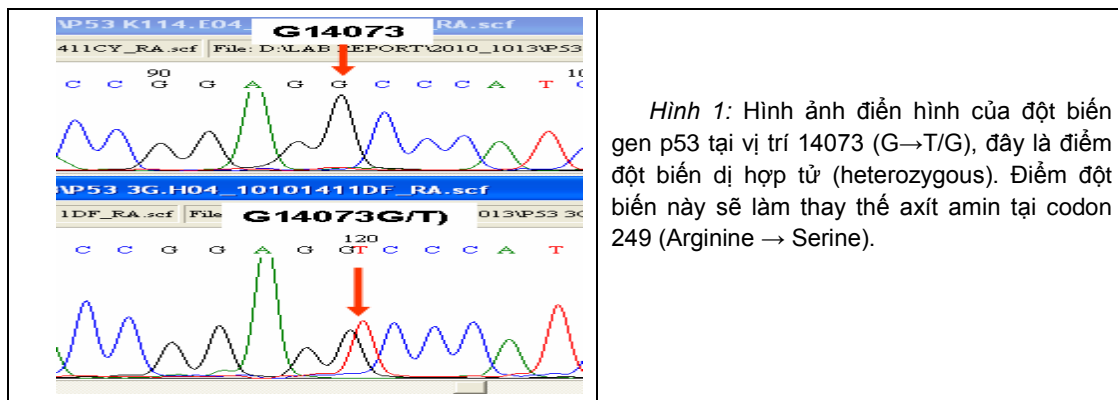
1. Đặc điểm chung của BN.

Bảng 1: Đặc điểm BN nghiên cứu.

CHỈ SỐ	NAM/NỮ	TUỔI	TIỂU CẦU (G/l)	(U/l)	(U/l)
Giá trị	78/16	56,1 ± 12,2	107 ± 34	110,8 ± 107,4	100,3 ± 91,9
Chỉ số	Bilirubin/(μmol/l)	Protein toàn phần (g/l)	Albumin (g/l)	Prothrombin (%)	HBeAg (+/-)
Giá trị	35,4 ± 15,1	72 ± 13	35 ± 3	72 ± 10	56/40

Tổng số có 94 BN, trong đó nam chiếm 82,97%. Các chỉ số như tiểu cầu, enzym AST, ALT, bilirubin đều có biến đổi. 56/94 BN (59,57%) có HBeAg (+). Tất cả BN UTG đều được chẩn đoán xác định bằng chọc hút tế bào để xét nghiệm tế bào học xác định UTG.

2. Đột biến gen p53 tại vị trí 249.



Hình 1: Hình ảnh điện hình của đột biến gen p53 tại vị trí 14073 (G→T/G), đây là điểm đột biến dị hợp tử (heterozygous). Điểm đột biến này sẽ làm thay thế axit amin tại codon 249 (Arginine → Serine).

```

>p53_2.scf                                249Arg
1      AGG TTG GCT CAT GAC TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC ATG TGT 45
1      Arg Leu Ala His Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys 15
46     AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC ACC 90
16     Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr 30
91     ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC AGG TCA GGA GCC ACT TGC CAC CCT 135
31     Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Arg Ser Gly Ala Thr Cys His Pro 45
136    GCA 138
46     Ala

>p53_3.scf                                249Ser
1      AGG TTG GCT CAT GAC TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC ATG TGT 45
1      Arg Leu Ala His Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys 15
46     AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGT GCC CAT CCT CAC 90
16     Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Ser Ala His Pro His 30
91     CAT CAT CAC ACT GGA AGA CTC CAG GTC AGG AGC CAC TTG CCA CCC 135
31     His His His Thr Gly Arg Leu Gln Val Arg Ser His Leu Pro Pro 45
136    TGC ACA 141
46     Cys Thr
    
```

Hình 2: Trình tự axit amin tại vị trí 249 thay đổi từ Arginine thành Serine, vị trí được đánh dấu.

3. So sánh tỷ lệ đột biến gen p53 trên các nhóm nghiên cứu.

Bảng 2:

ĐỘT BIẾN	AXÍT AMIN	CHỨNG (n = 100)	UTG (n = 94)	OR (95% CI)	p
p53, n (%)	Arg249Ser	3 (3)	12 (12,7)	4,6 (1,2 -26,1)	< 0,05

Nhóm chứng chỉ có 3 (3%) mẫu phát hiện có đột biến tại điểm 249, trong khi đó nhóm UTG là 12 BN (12,7%) mang đột biến gen này, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), OR (95% CI) = 4,6 (1,2 - 26,1).

4. Mối liên quan giữa đột biến p53 với mức độ biệt hóa tế bào gan.

Bảng 3:

GEN p53 \ MỨC ĐỘ BIỆT HOÁ	CAO (n = 20)	KÉM (n = 14)	VỪA (n = 60)	p
	Đột biến (n, %)	5 (25)	2 (14,3)	
Bình thường (n, %)	15 (75)	12 (85,7)	54 (90)	

Không có mối liên quan giữa đột biến gen p53 với mức độ biệt hóa tế bào gan.

5. Mối liên quan giữa đột biến p53 với đột biến gen HBx tại 2 vị trí 1762 và 1764.

Bảng 4:

p \ x				
	Đột biến (n = 78)	Bình thường (n = 16)	Đột biến (n = 77)	Bình thường (n = 17)
Đột biến (n, %)	13 (100)	0 (0)	13 (100)	0 (0)
Bình thường (n, %)	65 (80,2)	16 (19,8)	64 (79)	17 (21)
p	> 0,05		> 0,05	

100% BN có đột biến gen p53 đều có đột biến gen HBx. Tuy nhiên, không có mối liên quan nào được ghi nhận giữa đột biến gen p53 với đột biến gen HBx. Ngoài ra, không có mối liên quan nào được ghi nhận giữa đột biến gen p53 với các chỉ số khác như AST, ALT, bilirubin, albumin, prothrombin, tiểu cầu...

BÀN LUẬN

Do chúng tôi lựa chọn BN theo đúng tiêu chuẩn chẩn đoán UTG, nên đặc điểm BN rất điển hình của bệnh cảnh UTG. 100% BN được chẩn đoán xác định bằng tế bào học, đây là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán UTG hiện nay. Kết quả xét nghiệm tế bào học cho thấy: 20 (21,3%) BN UTG có mức độ biệt hóa cao, 14 (14,9%) BN biệt hóa kém và 60 (63,8%) BN có biệt hóa vừa. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Sumihito Tamura và CS (28,3% BN có biệt hóa kém) [7]. Một nghiên cứu khác trên 120 BN UTG thấy 35 BN (37,6%) có biệt hóa cao, 44 BN (47,3%) có biệt hóa vừa và chỉ có 14 BN (15,1%) có biệt hóa kém [8], phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Tuy nhiên, do số liệu còn ít, nhóm đối tượng phát hiện bệnh một cách ngẫu nhiên, không

phải nằm trong chương trình sàng lọc. Do đó, tính không đồng nhất giữa các nghiên cứu có thể xảy ra.

Gen p53 là một gen có kích thước lớn, do vậy chúng tôi chỉ khảo sát đoạn gen có đột biến đã được xác định trong những nghiên cứu trước đây. Cụ thể, chúng tôi khảo sát đoạn gen có từ 13970 đến 14176. Kết quả cho thấy: trên đoạn gen này, chỉ có một điểm đột biến điển hình tại vị trí 14073 (G → G/T). Chính đột biến này đã làm thay đổi axit amin tại vị trí 249 (Arginine → Serine). Đột biến gen p53 được tìm thấy với tỷ lệ khác nhau ở những khu vực khác nhau, có nghiên cứu gặp đột biến này lên tới hơn 50% ở BN UTG, trong đó, hơn một nửa là đột biến điểm tại vị trí 249 (AGG → AGT, = hotspot). Đột biến này ít gặp ở BN UTG ở Mỹ và châu Âu. Do vùng điểm nóng của đột biến này có chuỗi trình tự nucleotid AGGCC, là vị trí bám dính của aflatoxin β1

(AFB1), nên từ trước tới nay các nghiên cứu chủ yếu tập trung trên BN có liên quan chất độc này. Gần đây, người ta thấy rằng, quá trình sửa chữa chậm của đột biến này có thể do sự cản trở của HBx-protein, một thành phần của HBV [4]. Nghiên cứu gần đây của Kirk DG và CS (2005) cho thấy đột biến điểm 249ser trên gen p53 gặp ở 24,6% BN UTG có HBsAg (+) so với 0,3% trên nhóm chứng; nguy cơ tiến triển UTG trên BN nhiễm HBV là cao tương đương với nhiễm AFB1 (OR: 10,0, 95% CI: 5,16 - 19,6 và OR: 13,2, 95% CI: 4,99 - 35,0); tuy nhiên khi kết hợp cả 2 yếu tố, nguy cơ rất cao (OR: 399, 95% CI: 48,6 - 3270) [9].

Chúng tôi chỉ gặp 15/190 BN (7,73%) có đột biến gen này. Giữa nhóm UTG và nhóm chứng có sự khác biệt. Cụ thể, ở nhóm chứng, 3 (3%) mẫu phát hiện có đột biến tại điểm 249, trong khi đó nhóm UTG, 12 BN (12,7%) mang đột biến gen này, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Như vậy, so với kết quả của Kirk và CS, tần suất xuất hiện đột biến gen p53 trong quần thể nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn (7,73% so với 26%). Và tương tự như vậy, khi phân tích về nguy cơ xuất hiện UTG trên BN mang gen p53 đột biến, chúng tôi thấy nguy cơ xuất hiện UTG trên nhóm nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn (OR = 4,6 so với 399). Như vậy, qua kết quả nghiên cứu này cùng nghiên cứu trước đây đều thống nhất bên cạnh các nguyên nhân do virut viêm gan B và C, đột biến gen p53

đóng vai trò hết sức quan trọng trong sinh bệnh học của UTG [5].

Ngoài ra, do số lượng cũng như tỷ lệ BN có đột biến gen p53 ít, nên khi phân tích chúng tôi không thấy bất kỳ mối liên quan nào được ghi nhận giữa đột biến gen này với các chỉ số sinh hóa, huyết học, miễn dịch cũng như đột biến gen HBx, nồng độ HBV ADN. Kết quả này không có gì bất ngờ, vì cho đến nay cũng chưa có báo cáo nào cho thấy có các mối quan hệ đó.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên 94 BN UTG có nhiễm virut viêm gan B chúng tôi thấy: tỷ lệ đột biến tại vị trí 249 của gen p53 là 12/94 (chiếm 12,7%). Tỷ lệ này cao hơn so với nhóm chứng là 3/100 (3%); $p < 0,005$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Strosnider, H., et al. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. Environ Health Perspect. 2006, 114 (12), pp.1898-1903.
2. Thorgeirsson, S.S., J.W. Grisham. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. Nat Genet. 2002, 31 (4), pp. 339-346.
3. Qu, J, et al. HBV DNA can bind to p53 protein and influence p53 transactivation in hepatoma cells. Biochem Biophys Res Commun. 2009, 386 (3), pp.504-509.
4. Gouas, D.A, et al. Effects of the TP53

p.R249S mutant on proliferation and clonogenic properties in human hepatocellular carcinoma cell lines: interaction with hepatitis B virus X protein. *Carcinogenesis*. 31 (8), pp.1475-1482.

5. Kirk, G.D, et al. 249G TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2005, 24 (38), pp.5858-5867.

6. Nguyen, V.T, M.G. Law, G.J. Dore. An enormous hepatitis B virus-related liver disease burden projected in Vietnam by 2025. *Liver Int*. 2008, 28 (4), pp.525-531.

7. Tamura, S, et al. Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation. *Arch Surg*. 2001, 136 (1), pp.25-30; discussion 31.

8. Pawlik, T.M, et al. Preoperative assessment of hepatocellular carcinoma tumor grade using needle biopsy: implications for transplant eligibility. *Ann Surg*. 2007, 245 (3), pp.435-442.

9. Matsuda, Y, T. Ichida. Impact of hepatitis B virus X protein on the DNA damage response during hepatocarcinogenesis. *Med Mol Morphol*. 2009, 42 (3), pp.138-142.

