

Khảo sát sự hiện diện của đột biến trên miRNA-196a2 và miRNA-148a ở bệnh nhân ung thư vú

- **Nguyễn Thị Ngọc Thanh**
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
- **Hoàng Thanh Hải**
Trường Đại học Quốc tế
- **Nguyễn Thị Huệ**
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 24 tháng 09 năm 2014, nhận đăng ngày 28 tháng 01 năm 2015)

TÓM TẮT

Ung thư vú là loại ung thư phổ biến thứ hai trên thế giới và là ung thư thường gặp nhất ở phụ nữ. Trong ung thư, miRNA tham gia điều hòa nhiều con đường truyền tín hiệu ở nhiều giai đoạn khác nhau. Các SNPs trên miRNA có thể có ảnh hưởng rộng và theo nhiều cách trong ung thư. SNP rs11614913 C>T trên miR-196a2 đã được nhiều nghiên cứu tìm thấy có liên quan đến nguy cơ ung thư vú ở Châu Á. Bên cạnh đó, mối quan hệ giữa SNP rs6977848 T>G trên miR-148a và ung thư vú đã có những kết quả ban đầu trong một nghiên cứu trên người Úc. Phương pháp TAPMA (Tetra-Arms-PCR Melting Analysis) là một phương pháp tầm soát kiểu gen mới với sự kết hợp giữa T-Arms-PCR và đọc kết quả bằng phân tích Tm các sản phẩm. Nghiên cứu này thực hiện khảo sát sự

Từ khóa: Ung thư vú, miRNA, miR-196a2, miR-148a, SNP, rs11614913, rs6977848, TAPMA

MỞ ĐẦU

Ung thư vú là loại ung thư phổ biến thứ hai trên thế giới và là ung thư thường gặp nhất ở phụ nữ với ước tính khoảng 1,67 triệu trường hợp ung thư mới được chẩn đoán vào năm 2012 (chiếm 25 % của tất cả các loại ung thư)[8]. Ở Việt Nam, trong năm 2012, tổ chức IARC (International Agency for Research on Cancer) đã ước tính khoảng 2. 296 trường hợp ung thư vú và 991 ca

hiện diện của các alen của hai SNPrs11614913 và rs6977848 trên bệnh nhân ung thư vú Việt Nam bằng phương pháp TAPMA. Kết quả cho thấy tần số xuất hiện kiểu alen C, T của SNPrs11614913 lần lượt là 58,96 % và 41,04 %. Alen T, G của SNPrs6977848 lần lượt là 99 % và 1 %. Dựa vào tần số kiểu gen tham khảo trên HapMap, rs11614913 được dự đoán có liên quan với bệnh ung thư vú trong khi rs6977848 có lẽ không liên quan đến ung thư vú ở Việt Nam do chỉ có 1 kiểu alen phổ biến. Tuy nhiên, vẫn cần có nghiên cứu tiếp theo trên số lượng mẫu lớn hơn để khẳng định lại mối liên quan giữa hai SNPs này với ung thư vú ở Việt Nam để từ đó có thể chọn ra chỉ thị dùng trong chẩn đoán.

tử vong [8]. Năm 2014, theo thống kê mới nhất của WHO (World Health Organization), có khoảng 125.000 trường hợp ung thư mới và 94.000 trường hợp tử vong mỗi năm. Những con số này sẽ tăng gấp đôi vào năm 2035 [13].

Trong di truyền học ung thư vú, bên cạnh việc nghiên cứu các gen được xem là dấu ấn sinh học của ung thư vú như ER (Estrogen Receptor), HER2 (Human Epidermal Growth Factor

Receptor 2), BRCA1/2 (Breast Cancer1/2) [2]; các nghiên cứu gần đây cũng chỉ ra rằng các biến dị trên các miRNA (microRNA) cũng liên quan đến nguy cơ ung thư vú [16]. Hiện nay, miRNA đã được biết đến như một dấu ấn sinh học tiềm năng cho các loại ung thư nói chung và ung thư vú nói riêng [16]. Trong ung thư, miRNA tham gia điều hòa nhiều con đường truyền tín hiệu ở nhiều giai đoạn khác nhau [14, 20, 34]. Trong những con đường này, việc miRNA nhắm vào mục tiêu nào và với mức độ nào được quyết định bởi các vị trí SNPs (Single nucleotide polymorphisms) trên miRNA [1]. Do đó, các SNPs có thể có ảnh hưởng rất rộng theo nhiều cách và trên nhiều bệnh, bao gồm ung thư vú. Mặc dù mối liên quan giữa các SNP trên microRNA với nguy cơ ung thư vú đã được nghiên cứu ở nhiều nơi trên thế giới, nhưng ở Việt Nam vẫn chưa có thông tin nào về vấn đề này.

MicroRNA 196a2 là một phân tử RNA thuộc nhóm không được phiên mã [23]. Gen mã hóa cho miR-196a nằm trên NST 12. RNA thông tin mục tiêu của miR-196a2 là ANXA1. ANXA1 đã được biết đến là có liên quan đến ung thư thông qua quá trình chết theo chu trình tế bào, tăng sinh tế bào và ức chế sự tăng trưởng tế bào [4]. ANXA1 kích hoạt biểu hiện ERK1/2 từ đó ức chế tăng sinh tế bào. Khi miR-196a2 biểu hiện quá mức sẽ ức chế biểu hiện ANXA1 dẫn đến tăng sinh tế bào tự do và ức chế quá trình chết theo chu trình tế bào [10, 16, 19, 26]. Như vậy, miR-196a2 có vai trò như một miRNA sinh ung thư (oncogenic miRNA) [26].

SNP rs11614913 C>T trên miR-196a2 có 2 alen C và T với ba kiểu gen: đồng hợp bình thường CC hoặc GG, đồng hợp đột biến TT hoặc AA và dị hợp CT hoặc GA. Rs11614913 trên miR-196a2 đã được nhiều nghiên cứu tìm thấy có liên quan đến nguy cơ ung thư. Nhiều nghiên cứu trước đây đã tìm ra người mang kiểu gen TC/CC có liên quan với nguy cơ ung thư cao hơn so với

những người có kiểu gen TT [7]. Rs11614913 trên miR-196a2 đã được chứng minh là có liên quan đến nguy cơ ung thư vú ở Châu Á (Trung Quốc, Hàn Quốc, Ấn Độ, Nhật Bản) [3, 9, 12, 22, 28, 29]. Ở các khu vực khác như Connecticut và Brazil, các đa hình của rs11614913 cũng có ảnh hưởng làm tăng hoặc giảm nguy cơ ung thư vú [10, 18].

MicroRNA 148a là một phân tử RNA thuộc nhóm không được phiên mã [23]. Gen mã hóa cho miR-148a nằm trên NST 7. Mục tiêu của miR-148a là IGF-IR và IRS1 [27]. IGF-IR và IRS1 thường biểu hiện quá mức trong ung thư vú. Sự tăng biểu hiện của miR-148a ức chế đáng kể sự tăng sinh tế bào và khối u thông qua điều hòa giảm IGF-IR và IRS1, từ đó ức chế AKT và con đường tín hiệu MAPK/ERK trong ung thư vú. Một mục tiêu khác của miR-148a là ERBB3 [30]. Sự biểu hiện quá mức của miR-148a trong dòng tế bào ung thư vú MCF7 ức chế biểu hiện ERBB3, từ đó ngăn chặn con đường tín hiệu tiếp theo bao gồm ức chế AKT, ERK1/2, p70S6K1, và giảm biểu hiện của HIF-1 α . MiR-148a có vai trò trong ức chế hình thành mạch máu khối u [30].

SNP rs6977848 T>G trên miR-148a có 2 alen T và G với ba kiểu gen: Đồng hợp bình thường TT hoặc AA, đồng hợp đột biến GG hoặc CC và dị hợp TG hoặc AC. Mối quan hệ giữa rs6977848 và ung thư vú đã có những kết quả ban đầu ở người Úc [21]. Tần số alen đột biến ở bệnh nhân ung thư vú Úc khá cao, chiếm hơn 30 % [21].

Kiểu gen của SNP được xem là một “công cụ” giá trị để chẩn đoán các bệnh lý khác nhau. Bằng cách kết hợp phương pháp T-Arms-PCR với đọc kết quả bằng phân tích nhiệt độ chảy của sản phẩm PCR, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp xác định kiểu gen của SNP mới với tên gọi TAPMA (Tetra-Arms-PCR Melting Analysis) có các ưu điểm rõ tiền, linh hoạt, độ nhạy cao, độ chính xác cao và có thể thực hiện

trên số lượng mẫu lớn. TAPMA được thiết kế dựa trên Tetra-Arms-PCR với hai mỗi ngoài và hai mỗi trong đặc hiệu tại vị trí snp. Hai mỗi ngoài nhân bản sản phẩm ngoài, được xem là chứng nội. Một mỗi ngoài và một mỗi trong nhân bản một sản phẩm đặc hiệu cho một alen. Sau PCR sẽ có ba sản phẩm nếu đó là mẫu dị hợp tử và hai sản phẩm nếu đó là mẫu đồng hợp. Các sản phẩm này có Tm cách biệt nhau và được đọc bằng chương trình phân tích nhiệt độ nóng chảy. Kết quả TAPMA phân biệt ba kiểu gen dựa vào kiểu đường cong nóng chảy và Tm của mỗi đỉnh chảy tương ứng với mỗi sản phẩm PCR. Chúng tôi quyết định sử dụng phương pháp TAPMA để thực hiện khảo sát tần số kiểu gen của hai SNP rs11614913 và rs6977848 trên 100 mẫu DNA của bệnh nhân ung thư vú.

Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát tần số kiểu gen và alen của hai SNP rs11614913 trên miR-196a2 và rs6977848 trên miR-148a ở bệnh nhân ung thư vú Việt Nam bằng phương pháp TAPMA. Đây là một nghiên cứu ban đầu về SNP trên miRNA trong ung thư vú ở quần thể người Việt Nam nhằm đưa ra một hướng tiếp cận mới trong chẩn đoán và điều trị trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu nhận tế bào máu và tách chiết DNA bộ gen từ máu toàn phần

Trong đề tài này, chúng tôi thực hiện thí nghiệm trên mẫu DNA trích từ máu của bệnh nhân ung thư vú được cung cấp bởi Bệnh viện Ung Bướu từ năm 2009 đến 2014. Bệnh nhân có kết quả chẩn đoán lâm sàng dương tính với ung thư vú và đang được điều trị. Mẫu máu được lấy sau khi bệnh nhân được giải phẫu. Sau khi máu trong ống kháng đông được chuyển về phòng thí nghiệm sẽ được ly tâm, thu hồi tế bào máu và trữ lạnh ở -80 °C.

DNA bộ gen được ly trích từ tế bào máu bằng phương pháp muối với một số điều chỉnh: Lấy 500 µl máu cho vào tube eppendorf, thêm 1000 µL Dung dịch biến tính màng tế bào, tiếp

theo là ly tâm 10000 rpm ở nhiệt độ phòng trong 2 phút, sau đó loại bỏ dịch nổi. Các bước trên được thực hiện thêm hai lần rồi huyền phù phần kết tủa trong 300 µL Dung dịch biến tính màng nhân. Sau đó, 100 µL NaCl 3M và 600 µL chloroform được thêm vào, đảo tube nhẹ nhàng, ly tâm ở 6000 rpm trong 2 phút ở nhiệt độ phòng. Chuyển 300-500 µL dịch ở pha trên cùng qua tube mới và tủa trong 600 µL ethanol 100 % lạnh. Sau đó, mẫu được rửa sạch bằng ethanol 70 % lạnh, để khô. DNA được hòa tan trong 50 µL nước cất hoặc nước phân tử đã loại RNAase, sau đó được đo nồng độ và độ tinh sạch. DNA được bảo quản ở 4 °C hoặc -20 °C.

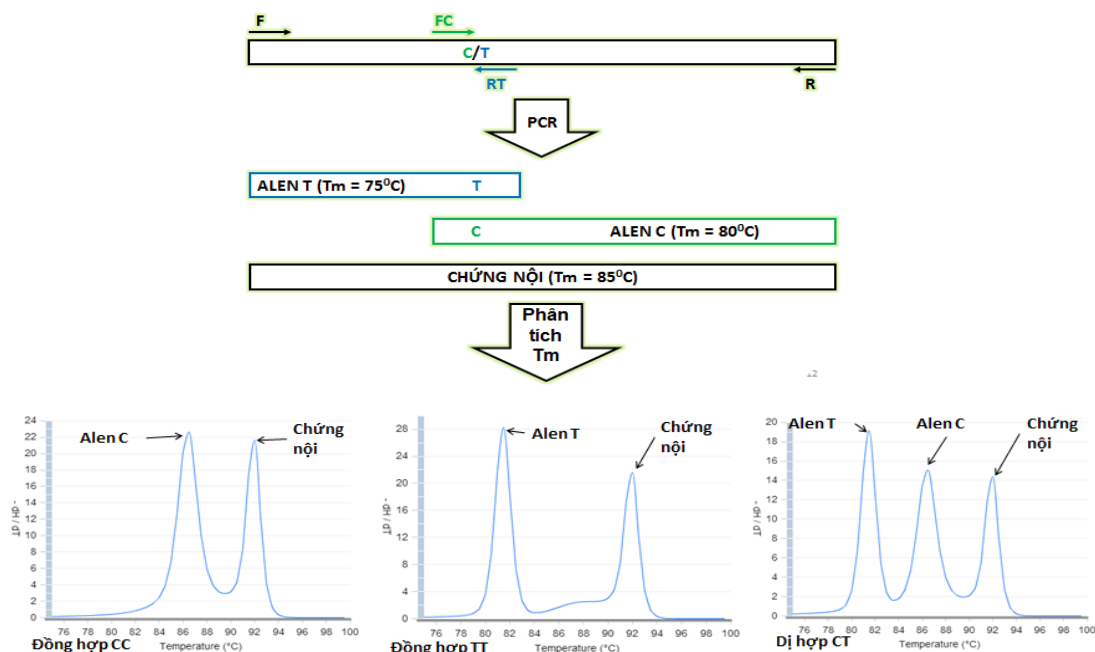
Phương pháp phát hiện kiểu gen của SNP

Nghiên cứu này sử dụng phương pháp TAPMA (Tetra-Arms-PCR Melting Analysis) để xác định kiểu gen của các SNP. Đây là phương pháp kết hợp giữa T-Arms-PCR và đọc kết quả bằng cách phân tích nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm (Hình 1). TAPMA có thể gọi là một phương pháp cải tiến từ T-Arms-PCR với ưu điểm vừa có chi phí thấp, vừa nhanh, chính xác và không độc hại. Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), mỗi (Sigma) và Betaine được sử dụng trong các phản ứng PCR, sau đó phân tích Tm sản phẩm bằng máy realtime PCR (Mastercycler® ep realplex - Eppendorf). Kết quả của phương pháp TAPMA sau khi phân tích được đọc như trong Hình 1. Đối với kiểu gen đồng hợp, kết quả phân tích nhiệt độ chảy có một đỉnh Tm tương ứng với sản phẩm chứng nội (sản phẩm ngoài) và một đỉnh Tm tương ứng với sản phẩm đặc hiệu cho một alen. Đối với kiểu gen dị hợp, kết quả phân tích nhiệt độ nóng chảy có một đỉnh Tm tương ứng với sản phẩm chứng nội và hai đỉnh Tm tương ứng với sản phẩm đặc hiệu cho hai alen.

Một bộ gồm bốn mỗi cho một SNP sử dụng TAPMA để tầm soát kiểu gen được thiết kế bằng phần mềm Primer3Plus

(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) và thử nghiệm bằng phần mềm Umelt (Utah University) (<https://www.dna.utah.edu/umelt/umb.php>) để

chọn lựa bộ mồi thích hợp trước khi đưa vào chuẩn hoá điều kiện PCR trên thực tế. Danh sách mồi dùng trong TAPMA để phát hiện kiểu gen của 2 SNP được mô tả trong Bảng 1 và Bảng 2.



Hình 1. Nguyên tắc hoạt động và ví dụ về đọc kết quả của phương pháp TAPMA.

Bảng 1. Mồi phát hiện kiểu gene của SNP rs11614913 bằng phương pháp TAPMA

Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Tm (°C)
196F (mồi xuôi ngoài)	GCGCGCGCGCTGTTGTTGGGATTGAGTTTTG	69,4
196RT (mồi ngược alen-T)	AACCGACTGATGTAACTCAGA	50,5
196FC (mồi ngược alen-C)	AACTCGGCAACAAGAACTGC	52,4
196R (mồi ngược ngoài)	GGAGGGTAGGAGTGGGAGAG	57,9

Bảng 2. Mồi phát hiện kiểu gen của rs6977848 bằng phương pháp TAPMA

Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Tm (°C)
148F (mồi xuôi ngoài)	AACCAAAACAGGGCAATGTCCA	57,3
148RT (mồi ngược alen-T)	TATAAGAGGCTGTGGTCGCCGA	59,3
148FG (mồi ngược alen-G)	TATACTGGAGCACTGGCGGCAG	60,5
148R (mồi ngược ngoài)	TGGGGACTGTGTGCAAGGTT	58,2

Đây là nghiên cứu ban đầu về các SNP này ở Việt Nam nên mẫu chứng cho các kiểu gene cần phải được tìm kiếm trong quá trình thực hiện và tiếp tục sử dụng các mẫu chuẩn để chuẩn hoá lại phương pháp cho chính xác hơn. Các phát hiện về kiểu gene ban đầu bằng phương pháp TAPMA này sẽ được giải trình tự khẳng định kiểu gene. Chúng tôi sử dụng giải trình tự động bằng hệ thống ABI 3130 và các mồi được thiết kế để nhân bản đoạn trình tự có chứa vị trí SNP (Bảng 3).

Đối với phản ứng nhân bản trình tự 500 bp chứa SNP rs11614913, nồng độ các thành phần phản ứng trong tổng số 20 μ L mix gồm 1X Master mix Toptaq; 0,2 μ M mỗi Seq196F/Seq196R; 20 ng DNA và nước. Chương trình luân nhiệt cho phản ứng PCR này gồm các bước 94 °C trong 5 phút; 40 chu kỳ gồm ba nhiệt

độ 94 °C trong 30 giây, 65 °C trong 30 giây, 72 °C trong 1 phút; và cuối cùng là 72 °C trong 10 phút. Đối với phản ứng nhân bản trình tự 576 bp chứa SNP rs6977848, nồng độ các thành phần phản ứng trong tổng số 20 μ L mix gồm 1X Master mix Toptaq; 0,2 μ M mỗi Seq148F/Seq148R; 20 ng DNA và nước. Chương trình luân nhiệt cho phản ứng PCR này gồm các bước 94 °C trong 5 phút; 40 chu kỳ gồm ba nhiệt độ 94 °C trong 30 giây, 60 °C trong 30 giây, 72 °C trong 1 phút; và cuối cùng là 72 °C trong 10 phút.

Sau khi xác định được các mẫu chứng, chúng tôi tiến hành tối ưu phản ứng dựa trên các mẫu chứng vừa tìm được và cuối cùng đã tìm ra điều kiện TAPMA tối ưu trong xác định kiểu gen cho từng SNP.

Bảng 3. Trình tự 2 mồi sử dụng cho giải trình tự của rs11614913 trên miR-192a và rs6977848 trên miR-148a

SNP	Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Tm (°C)
rs11614913	Seq196F	CCCTTACCCACCCAGCAACC	57,9
	Seq196R	CTGGACCCTCTTTGTCTGTCTC	56,7
rs6977848	Seq148F	AGGAGTCCACCAGGGTAAGATGA	58,1
	Seq148R	TCTGAGGACGGGTAGGAAGGA	57,6

Chúng tôi thực hiện phản ứng TAPMA xác định kiểu gen của rs11614913 với nồng độ các thành phần trong 20 μ L mix gồm 1X Master mix; 0,3 μ M 196F/196R; 0,5 μ M 196FC/196RT; 0,3M Betaine; 60 ng DNA. Điều kiện nhiệt độ cho phản ứng TAPMA gồm hai phần: Chương trình luân nhiệt của PCR gồm các bước 95 °C trong 5 phút; 30 chu kỳ gồm ba bước 95 °C trong 30 giây, 65 °C trong 30 giây, 72 °C trong 30 giây và cuối cùng là 74 °C trong 3 phút. Chương trình phân tích nhiệt độ chảy gồm các bước 95 °C trong 15 giây; 60 °C trong 15 giây; đọc tín hiệu huỳnh quang trong mỗi lần tăng 0,5 °C; 95 °C trong 15 giây và cuối cùng là giữ ở 4 °C. Mẫu sau khi chạy TAPMA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 3 % trong 40 phút ở 90V. Kích thước các sản phẩm điện di gồm 116 bp (chứng nội), 74 bp (alen T) và 83 bp (alen C). Đối với rs6977848,

phản ứng TAPMA xác định kiểu gen được thực hiện với nồng độ các thành phần trong 20 μ L mix gồm 1X Master mix; 0,2 μ M 148F/148RT; 0,4 μ M 148FG/148R; 0,3 M Betaine; 30 ng DNA. Điều kiện nhiệt độ cho phản ứng TAPMA gồm hai phần: Chương trình luân nhiệt của PCR gồm các bước 95 °C trong 5 phút; 30 chu kỳ gồm ba bước 95 °C trong 30 giây, 66 °C trong 30 giây, 74°C trong 1 phút và cuối cùng là 72 °C trong 1 phút. Chương trình phân tích nhiệt độ chảy gồm các bước 95 °C trong 15 giây; 60 °C trong 15 giây; đọc tín hiệu huỳnh quang trong mỗi lần tăng 0,5 °C; 95 °C trong 15 giây và cuối cùng là giữ ở 4 °C. Mẫu sau khi chạy TAPMA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5 % trong 60 phút ở 90 V. Kích thước các sản phẩm điện di gồm 788 bp (alen T) và 834 bp (alen G).

Phương pháp khảo sát tần số kiểu gen và alen của SNP

Sau khi xác định được số lượng từng loại kiểu gen trong tổng số 106 mẫu đối với rs11614913 và 100 mẫu đối với rs6977848,

chúng tôi tiến hành tính tần số kiểu gen và alen của SNP trong quần thể bằng các công thức bên dưới.

Tần số 1 loại kiểu gen bằng tỉ lệ:

$$\frac{\text{Số cá thể có kiểu gen đó}}{\text{Tổng số cá thể có trong quần thể}} \times 100 \%$$

Tần số alen về 1 gen nào đó bằng tỉ lệ:

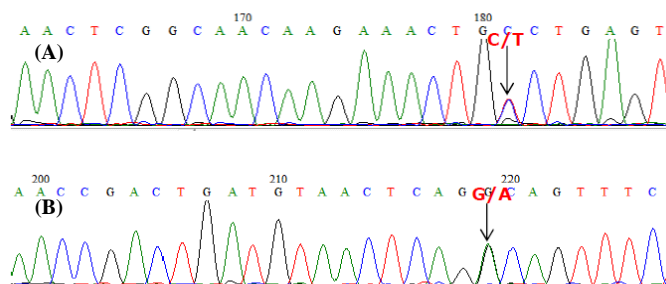
$$\frac{\text{Giao tử mang alen đó}}{\text{Tổng số giao tử của quần thể tại một thời điểm xác định}} \times 100 \%$$

KẾT QUẢ

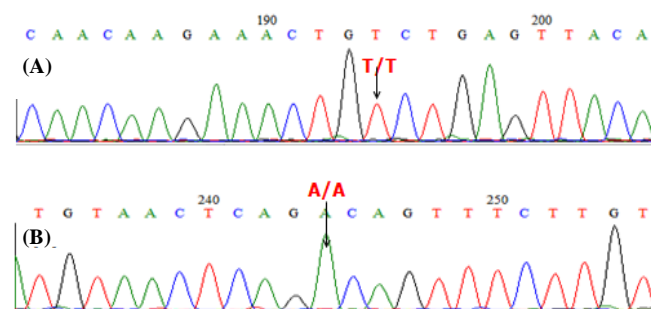
Tầm soát tần số SNP rs11614913/miR-196a2 trên bệnh nhân ung thư vú.

Trong quá trình thực hiện tối ưu phương pháp và tầm soát kiểu gen của rs11614913, chúng tôi đã tìm được ba mẫu với ba kiểu gen CC, TT và CT. Các mẫu này đã được giải trình tự để

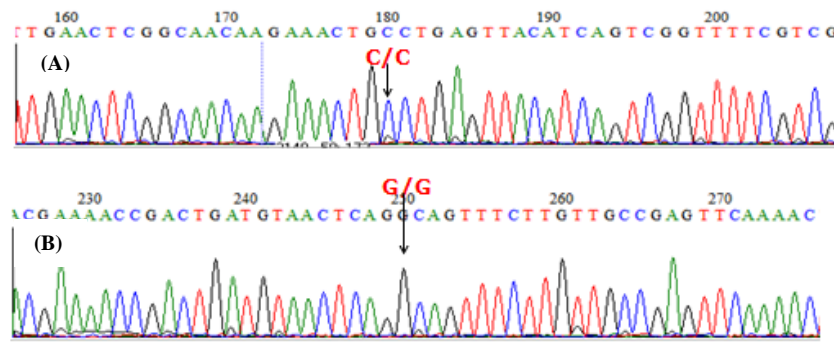
khẳng định lại kiểu gen (Hình 2, 3 và 4), sau đó được sử dụng làm mẫu chứng trong phản ứng TAPMA xác định kiểu gen của các mẫu còn lại. Kết quả TAPMA tương ứng với các mẫu chứng cũng như kết quả kiểm tra lại bằng điện di được trình bày trong Hình 5.



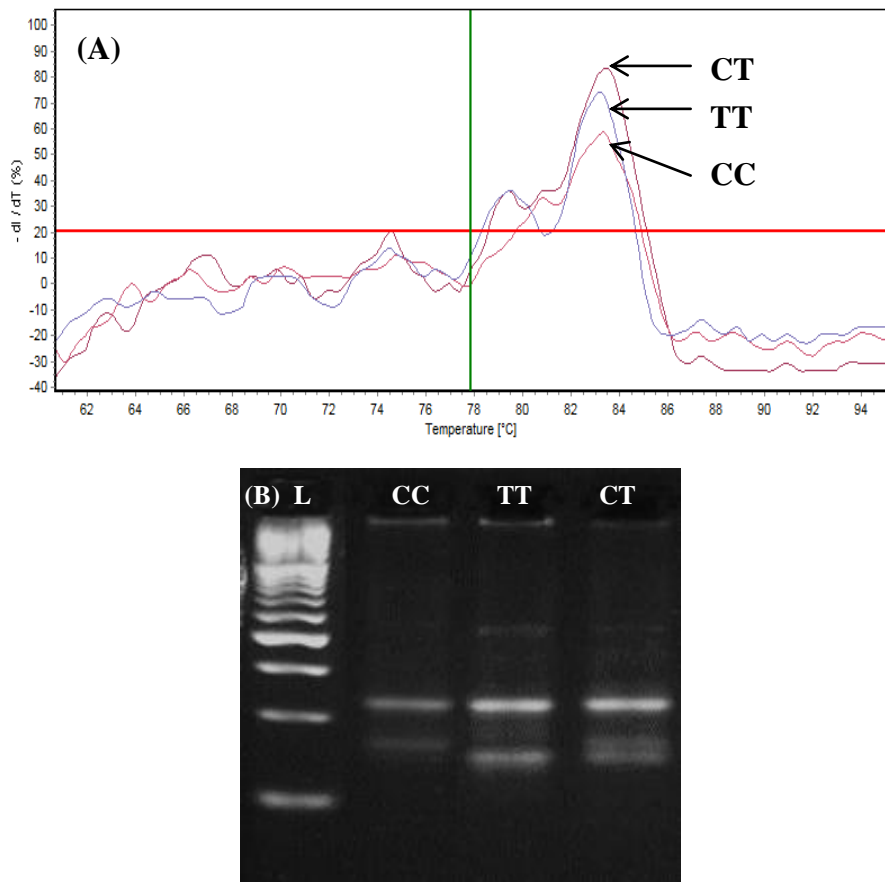
Hình 2. Kết quả giải trình tự của mẫu 8049 có kiểu gen dị hợp CT rs11614913. (A) Mạch âm với C/T tại vị trí snp. (B) Mạch dương với G/A tại vị trí snp.



Hình 3. Kết quả giải trình tự của mẫu 4557 đồng hợp TT rs11614913. (A) Mạch âm với T tại vị trí snp. (B) Mạch dương với A tại vị trí snp.



Hình 4. Kết quả giải trình tự của mẫu 5229 đồng hợp CC rs11614913. (A) Mạch âm với C lại vị trí snp. (B) Mạch dương với G tại vị trí snp.



Hình 5. Kết quả tối ưu phương pháp xác định kiểu gen của rs11614913 trên mẫu chứng. (A) Kết quả ba kiểu hình đường cong nóng chảy của phương pháp TAPMA cho ba kiểu gen CC, TT và CT. (B) Kết quả điện di tương ứng của 3 kiểu gen CC, TT và CT.

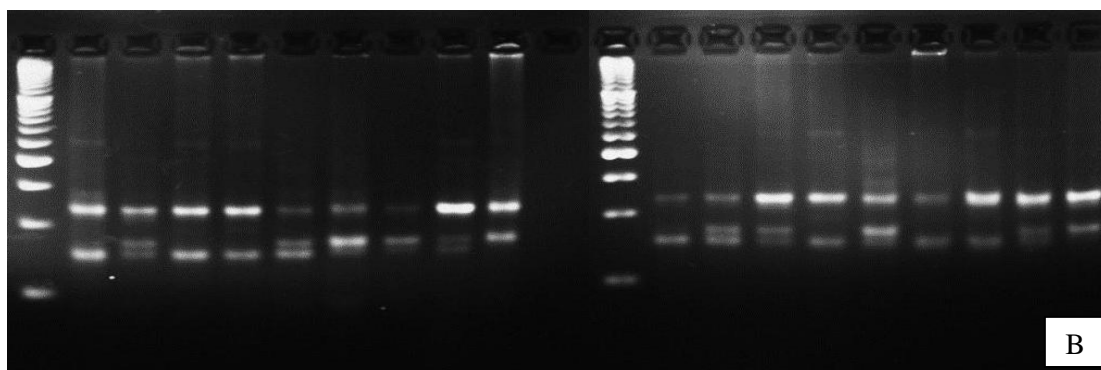
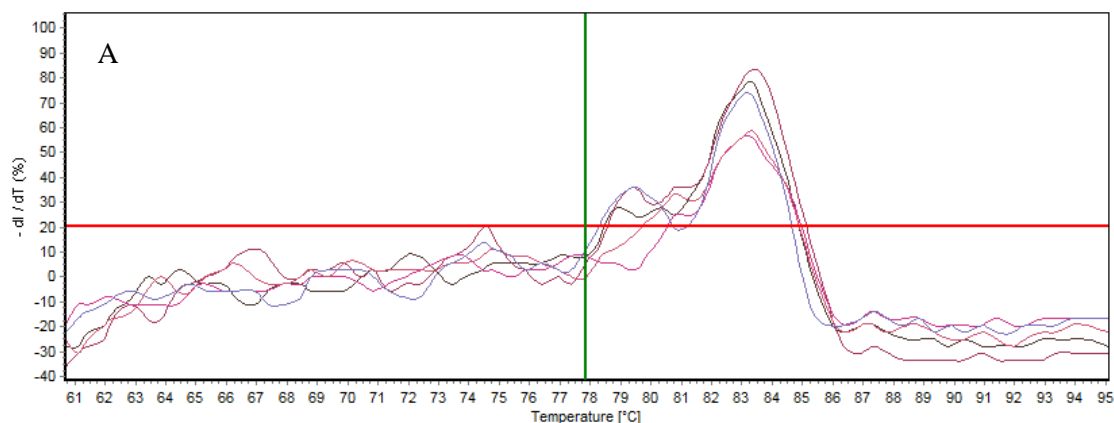
Sử dụng điều kiện đã tối ưu hoá cho rs11614913 để chạy TAPMA tầm soát kiểu gen của rs11614913 trên mẫu DNA trích từ máu bệnh nhân ung thư vú. Các kiểu gen khác nhau có thể phân biệt được trong một kết quả phân tích đường cong nóng chảy của TAPMA (Hình 6A). Việc kiểm tra bằng điện di cũng được tiến hành song song để kiểm chứng tính chính xác của phương pháp TAPMA (Hình 6B). Tất cả các lần

chạy mẫu đều so sánh với các mẫu chứng đã giải trình tự.

Áp dụng công thức tính tần số kiểu gen (1) và tần số (2) sẽ có kết quả tần số kiểu gen và alen của rs11614913 được trình bày trong Bảng 4. Trên tổng số 106 mẫu máu bệnh nhân ung thư vú, tần số xuất hiện của kiểu gen CC là 46,2 %; CT là 25,5 %; TT là 28,3 %. Trên tổng số 212 alen, tần số xuất hiện của alen C là 58,96 % và alen T là 41,04 %.

Bảng 4. Tần số kiểu gen và alen của rs11614913 trên miR-196a2

	Kiểu gen			Alen	
	CC	CT	TT	C	T
Số mẫu ung thư vú (106)	49	27	30	125	87
Tần số xuất hiện	46,2 %	25,5 %	28,3 %	58,96 %	41,04 %

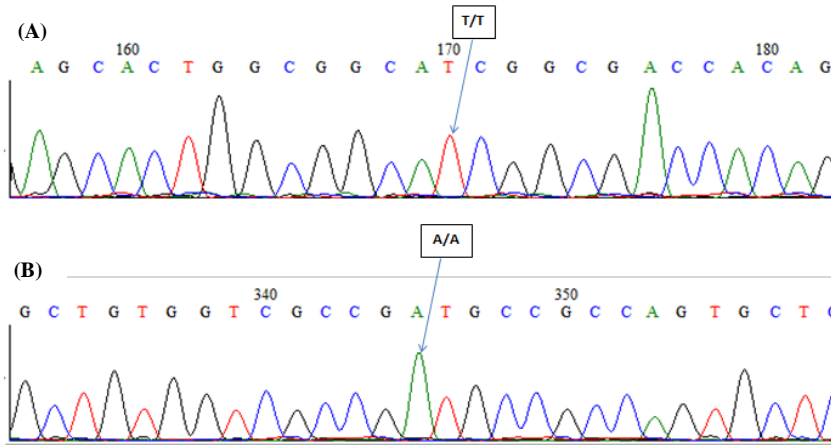


Hình 6. Kết quả xác định kiểu gen của rs11614913 trên mẫu DNA của bệnh nhân ung thư vú. (A) Kết quả TAPMA với ba kiểu gen CC, TT và CT trong một lần chạy mẫu. (B) Kết quả kiểm tra bằng điện di các mẫu bệnh cùng với ba mẫu chứng CC, TT và CT.

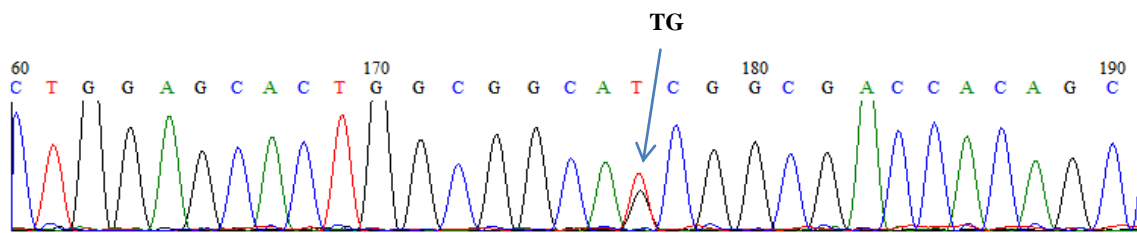
Tầm soát tần số SNP rs6977848/miR-148a trên bệnh nhân ung thư vú

Hai mẫu chuẩn đã được tìm thấy trong quá trình tối ưu TAPMA được giải trình tự và xác định kiểu gen TT và TG của SNP rs6977848 (Hình 7, 8). Các mẫu này được sử dụng làm

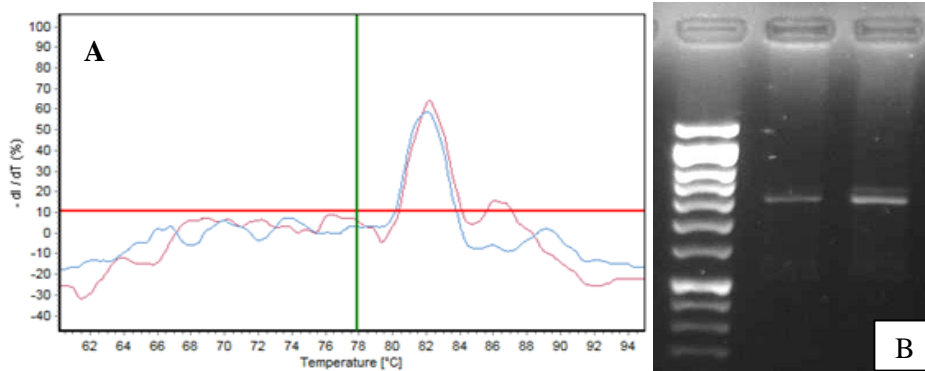
mẫu chứng trong phản ứng TAPMA xác định kiểu gen của các mẫu còn lại. Kết quả TAPMA tương ứng với các mẫu chứng cũng như kết quả kiểm tra lại bằng điện di được trình bày trong Hình 9.



Hình 7. Kết quả giải trình tự của mẫu 6403 đồng hợp TT rs6977848. (A) Mạch âm với T lại vị trí SNP. (B) Mạch dương với A tại vị trí SNP



Hình 8. Kết quả giải trình tự của mẫu 5084 dị hợp TG rs6977848. Mạch âm với kiểu gen TG



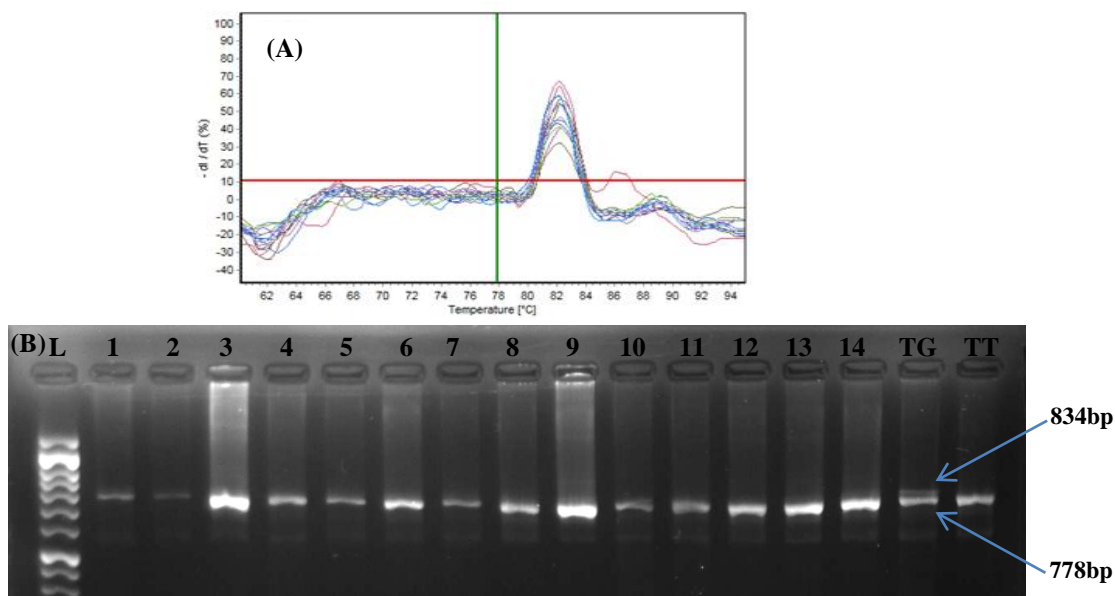
Hình 9. Kết quả tối ưu phương pháp xác định kiểu gen của rs6977848 trên mẫu chứng. (A) Kết quả hai kiểu hình đường cong nóng chảy của phương pháp TAPMA cho hai kiểu gen TT và TG. (B) Kết quả điện di tương ứng của hai kiểu gen TT và TG.

Chúng tôi cũng sử dụng điều kiện và thành phần PCR TAPMA đã tối ưu và các mẫu chứng để chạy xác định kiểu gen của rs6977848 trên mẫu DNA bệnh nhân ung thư vú thu thập được. Tất cả kết quả được đọc bằng cả 2 kiểu phân tích: đường cong nóng chảy và điện di (Hình 10). Tất cả các lần chạy mẫu đều so sánh với các mẫu chuẩn đã giải trình tự.

Áp dụng công thức tính tần số kiểu gen (1) và tần số (2) ta có kết quả khảo sát tần số kiểu gen và alen của rs6977848 được trình bày trong bảng 5. Trên tổng số 100 mẫu ung thư vú, tần số xuất hiện của kiểu gen TT là 98 %; TG là 2 %; GG là 0 %. Trên tổng số 200 alen, tần số xuất hiện của alen T là 99 % và alen G là 2 %.

Bảng 5. Kết quả khảo sát tần số kiểu gen và alen của rs6977848 trên miR-148a

	Kiểu gen			Alen	
	TT	TG	GG	T	G
Số mẫu ung thư vú (100)	98	2	0	198	2
Tần số xuất hiện	98 %	2 %	0 %	99 %	1 %



Hình 10. Kết quả xác định kiểu gen của rs6977848 trên mẫu DNA của bệnh nhân ung thư vú. (A) Kết quả TAPMA với hai kiểu gen TT và TG trong một lần chạy mẫu. (B) Kết quả kiểm tra bằng điện di các mẫu bệnh cùng với hai mẫu chuẩn TT và TG.

THẢO LUẬN

MiR-196a hoạt động như một gen sinh ung thư [26]. Khi miR-196a2 biểu hiện quá mức sẽ ức chế biểu hiện ANXA1 dẫn đến tăng sinh tế bào tự do và ức chế quá trình chết theo chu trình tế bào

[10, 16, 19, 26]. Một số nghiên cứu đã cho thấy rs11614913 trên miR-196a2 có tác động đến sự biểu hiện của miR-196a2 và có liên quan đến các loại ung thư khác nhau [9, 11, 17, 31]. Bên cạnh

đó, vẫn có một vài nghiên cứu cho rằng không có mối liên hệ trực tiếp giữa rs11614913 và biểu hiện của miR-196a [6, 10].

Mối liên quan của rs11614913 với nguy cơ ung thư nói chung và ung thư vú nói riêng đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới chứng minh [7, 9, 10, 12, 18, 22, 25, 26]. Trong nghiên cứu của Chu và cộng sự năm 2011 [7] trên quần thể người Trung Quốc đã chỉ ra rằng người mang kiểu gen rs11614913CT/CC có nguy cơ ung thư cao hơn so với những người có kiểu gen TT. Đối với nguy cơ ung thư vú, rs11614913 cũng đã được chứng minh là có liên quan trên quần thể người Trung Quốc, Mỹ (bang Connecticut) và Brazil [10, 12, 18]. Tuy nhiên, ở những nghiên cứu trên quần thể người Đức, Ý và Úc lại cho kết luận rs11614913 không liên quan đến nguy cơ ung thư vú [5, 15].

Nghiên cứu trên quần thể 106 bệnh nhân ung thư vú Việt Nam, tần số xuất hiện kiểu gen CC, CT và TT lần lượt là 46,2 % , 25,5 % và 28,3 %; tần số suất hiện alen C nhiều hơn alen T lần lượt là 59 % và 41 % (Bảng 7). Nghiên cứu của Hu [12] trên quần thể người Trung Quốc, quần thể gần với người Việt Nam, cho thấy alen C có tần số trên người bệnh (48 %) lớn hơn so với người bình thường (44 %). Ở nghiên cứu này, Hu đã chỉ ra rằng có sự tăng đáng kể tần số alen C trong quần thể bệnh nhân ung thư vú, từ đó rút ra kết luận về khả năng làm tăng nguy cơ ung thư vú của rs11614913:T>C ở quần thể người Trung Quốc. Có kết luận tương tự với Hu là nghiên cứu của Hoffman và cộng sự năm 2009 ở

Connecticut-Mỹ. Kết quả nghiên cứu của Hoffman [10] còn cho thấy khả năng hoạt động như một gen sinh ung thư của miR-196a2. Ngược lại, nghiên cứu trên quần thể người Brazil do Linhares và cộng sự [18] thực hiện lại cho thấy sự xuất hiện của rs11614913T liên quan mật thiết với tăng nguy cơ ung thư vú với tần số 53 % ở người bệnh và 46 % ở người bình thường. Ở quần thể người Úc, kết quả tần số kiểu gen và alen của rs11614913 trên bệnh nhân ung thư vú có xu hướng giống với kết quả nghiên cứu của Linhares. Tuy nhiên, kết luận cuối cùng của Jedlinski là không có mối liên quan giữa rs11614913 với ung thư vú, với tần số alen C ở người bệnh và người bình thường lần lượt là 59 % và 58 % [15]. Sự khác nhau giữa các kết quả này có thể là do ảnh hưởng của một số yếu tố đặc trưng của quần thể, như sự khác nhau trong phân bố kiểu gen, lối sống hoặc môi trường sống.

Để làm rõ vai trò của rs11614913 trong ung thư vú ở Việt Nam, nghiên cứu này cần khảo sát thêm tần số SNP trên nhóm người bình thường. Tuy nhiên, chúng tôi có thể dự đoán số liệu này bằng cách tham khảo tần số kiểu gen và alen ở các quần thể gần với Việt Nam trong khu vực Châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản (Bảng 6). So với tần số xuất hiện của alen C trên người bình thường ở Trung Quốc và Nhật Bản (49% và 37 %), tần số xuất hiện alen C trên bệnh nhân ung thư vú ở Việt Nam cao hơn với 59 % (Bảng 4). Như vậy, có khả năng rs11614913C liên quan đến nguy cơ tăng ung thư vú ở Việt Nam.

Bảng 6. Tần số kiểu gen và alen của SNP rs11614913 trong nhóm người bình thường ở khu vực Châu Á

Quần thể người	Tần số kiểu gen (%)			Tần số alen (%)	
	CC	CT	TT	C	T
Trung Quốc-Châu Á*	27,3	43,2	29,5	49	51
Nhật Bản-Châu Á*	15,6	42,2	42,2	37	63

* Số liệu lấy từ HapMap trên <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Đã có một vài công trình nghiên cứu trên thế giới về vai trò của miR-148a trong một số bệnh ung thư. Xin Zhou và cộng sự [35] đã thực hiện nghiên cứu xác định vai trò của miR-148a trong ung thư biểu mô buồng trứng. Kết luận của nghiên cứu trên cho rằng miR-148a có thể có vai trò như một chất sinh ung trong điều hòa sự phát triển của tế bào biểu mô buồng trứng. Do đó, miR-148a có thể được sử dụng như một dấu ấn sinh học mới để phát hiện sớm hoặc điều trị ung thư buồng trứng. MiR-148a cũng được cho là một dấu ấn sinh học của ung thư biểu mô thực quản [33] và ung thư đại trực tràng [24]. Zhang cùng cộng sự đã chứng minh được rằng miR-148a biểu hiện tăng cao hơn ở bệnh nhân ung thư biểu mô thực quản và giảm biểu hiện trong tế bào ung thư đại trực tràng.

Rối loạn điều hòa của microRNA là một nguyên nhân phổ biến trong các bệnh ung thư của con người, bao gồm cả ung thư vú. MiR-148a có chức năng nhắm mục tiêu các thụ thể estrogen, có vai trò quan trọng trong việc phát triển bệnh ung thư vú [32]. Một nghiên cứu về tác động của miR-148 trên tế bào ung thư vú đã được Xu và cộng sự thực hiện [27]. Đây là nghiên cứu đầu tiên cho thấy miR-148a có khả năng ức chế tăng sinh tế bào và hình thành khối u thông qua điều hòa biểu hiện của IGF-IR và IRS1 và ức chế con đường truyền tín hiệu AKT-ERK. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Yu và cộng sự vào năm 2011 [30] đã cho thấy ERBB3 là một mục tiêu trực tiếp khác của miR-148a cũng như cung cấp bằng chứng trực tiếp rằng miR-148a ức chế hình thành mạch máu khối u thông qua điều hòa sự biểu hiện

ERBB3 và các phân tử tín hiệu hạ lưu của nó. Từ những bằng chứng trên cho thấy một biến đổi trên miR-148a có thể dẫn đến thay đổi chức năng của miR-148a dẫn đến nguy cơ ung thư vú.

Một nghiên cứu gần đây về vai trò của rs6977848 trên miR-148a đối với ung thư vú ở Úc vừa được hoàn thành đầu năm 2014 do Giang và cộng sự thực hiện [21]. Kết quả khảo sát của nghiên cứu cho thấy ở người bệnh, tần số alen G cao (59 %) và tần số kiểu gen dị hợp GT là cao nhất (45,99 %). Tuy nhiên, kết luận của nghiên cứu này sau khi tiếp tục khảo sát trên nhóm người bình thường (58 % tần số alen G) là không có sự liên quan giữa rs6977848 với ung thư vú ở người Úc.

Các quần thể khác nhau thường có tần số kiểu gen và alen SNP khác nhau. Đối với người Việt Nam, trong nghiên cứu này, tần số xuất hiện của alen T chiếm đến 99 % và không tìm thấy mẫu nào mang kiểu gen GG. Tuy nhiên, vì nghiên cứu này chưa khảo sát tần số SNP trên nhóm người bình thường nên chưa thể kết luận về mối quan hệ giữa rs6977848 với ung thư vú ở Việt Nam. Tuy nhiên, chúng tôi có thể dự đoán kết quả dựa vào tần số xuất hiện SNP trên quần thể người Trung Quốc và Nhật Bản được cung cấp trên HapMap (Bảng 7). Đây đều là hai quốc gia Châu Á gần gũi với Việt Nam nên có thể sử dụng số liệu này để tham khảo. Kết quả so sánh cho thấy có sự tương đồng về tần số alen T giữa quần thể người Châu Á (98,9 %) với bệnh nhân ung thư vú ở Việt Nam (99 %) (Bảng 5). Như vậy, có khả năng rs6977848 không liên quan đến nguy cơ ung thư vú ở Việt Nam.

Bảng 7. Tần số kiểu gen và alen của SNP rs6977848 trong nhóm người bình thường ở khu vực Châu Á

Quần thể người	Tần số kiểu gen (%)			Tần số alen (%)	
	GG	GT	TT	G	T
Trung Quốc-Châu Á*	-	2,2	97,8	1,1	98,9
Nhật Bản-Châu Á*	-	2,3	97,7	1,1	98,9

* Số liệu lấy từ HapMap trên <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

KẾT LUẬN

Đối với rs11614913 trên miR-196a2, tần suất xuất hiện kiểu gen CC, CT và TT lần lượt là 46,2 %; 25,5 % và 28,3 % trong tổng số 106 bệnh nhân ung thư vú. Bên cạnh đó, trong tổng số 212 alen, tần suất xuất hiện alen C và alen T của rs11614913 lần lượt là 58,96 % và 41,04 %. Tần số alen C khá cao trong quần thể bệnh nhân ung thư vú Việt Nam so với quần thể người Châu Á bình thường (HapMap). Do đó, có thể alen C là alen làm gia tăng nguy cơ bệnh và kiểu gen CC có thể là kiểu gen đặc trưng ở người bệnh ung thư vú. SNP rs11614913 có thể được nghiên cứu về mối liên quan để chứng minh vai trò của SNP này trong bệnh ung thư vú ở người Việt Nam và có thể sử dụng làm chỉ thị cho các chẩn đoán sớm bệnh ung thư vú.

Đối với rs6977848 trên miR-148a, tần suất xuất hiện kiểu gen TT, TG và GG lần lượt là 98 %; 2 % và 0 % trong tổng số 100 bệnh nhân ung thư vú. Như vậy, trong tổng số 200 alen, tần suất xuất hiện alen T và alen G lần lượt là 99 % và 1

%. Tần số alen T khá cao trong quần thể bệnh nhân ung thư vú Việt Nam, tương đương với trong quần thể người Châu Á bình thường (HapMap). Do đó, có thể alen T của SNP rs6977848 là phổ biến trong quần thể người Châu Á và không liên quan đến nguy cơ gây ung thư vú. Tuy nhiên, vẫn cần có nghiên cứu tiếp theo để khẳng định lại mối liên quan giữa SNP này với ung thư vú ở Việt Nam.

Những nghiên cứu sâu hơn cần tiếp tục khảo sát tần số kiểu gen và alen trên mẫu người bình thường để tìm mối liên hệ giữa ung thư vú với rs11614913 trên miR-196a2 và rs6977848 trên miR-148a trong quần thể người Việt Nam, đồng thời tăng số lượng mẫu khảo sát để tăng tính chính xác và độ tin cậy cho kết quả nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-YS.01-2013.09

Screening mutations in miRNA196a2 and miRNA148a in Vietnamese breast cancer patients

- **Nguyen Thi Ngoc Thanh**
University of Science, VNU-HCM
- **Hoang Thanh Hai**
International University, VNU-HCM
- **Nguyen Thi Hue**
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Breast cancer, affecting women mostly, is the second common cancer in the world. Previous studies showed that miRNAs played a role in the regulation of signal transduction pathways in many different

stages of cancer. The SNPs that occur on miRNA can have broad impact in cancer by many different ways. It was found that SNP rs11614913 C>T in miR-196a2 related to breast cancer risk in Asia. In addition, the

association between SNP rs6977848 T> G in miR-148a and breast cancer have early proven on the Australian. In this study, a combination of Tetra-Arms-PCR and PCR product melting analysis, was used to screen for the presence of the allele of rs11614913 and rs6977848 in Vietnamese breast cancer patients. The results showed that the frequency of C and T allele of rs11614913 were 58.96 % and 41.04 % respectively; the frequency of T and G allele of rs6977848

were 99 % and 1 %, respectively. Based on the genotype frequencies in the HapMap, rs11614913 is predicted to be associated with breast cancer while rs6977848 is probably not related to breast cancer in Vietnam due to a highly dominant frequency of only one type allele. However, there is still need for further research on a larger sample size to confirm the association between the two SNPs with breast cancer in Vietnam.

Keywords: Breast cancer, miRNA, miR-196a2, miR-148a, SNP, rs11614913, rs6977848, TAPMA

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J. Gong, et al., Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum Mutat*, 33, 1, 254-63 (2012).
- [2]. B. Cancer. [cited 2014 18th June]; Available from: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/index> (2013).
- [3]. A.A. Alshatwi,, et al., Differential expression profile and genetic variants of microRNAs sequences in breast cancer patients. *PLoS One*, 7, 2, e30049 (2012).
- [4]. E.Z. Ang, et al., Annexin-1 regulates growth arrest induced by high levels of estrogen in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Res*, 7, 2, 266-74 (2009).
- [5]. I. Catucci, et al., Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Hum Mutat*, 31, 1, E1052-7 (2010).
- [6]. B.C. Christensen,, et al., Mature microRNA sequence polymorphism in MIR196A2 is associated with risk and prognosis of head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 16, 14, 3713-20 (2010).
- [7]. H. Chu,, et al., Hsa-miR-196a2 Rs11614913 polymorphism contributes to cancer susceptibility: evidence from 15 case-control studies. *PLoS One*, 6, 3, e18108, 2011
- [8]. Globocan. Breast Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, [cited 2014 April 3rd] Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (2012).
- [9]. B. He,, et al., The association between four genetic variants in microRNAs (rs11614913, rs2910164, rs3746444, rs2292832) and cancer risk: evidence from published studies. *PLoS One*, 7, 11 e49032. (2012).
- [10]. A.E. Hoffman,, et al., microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Res*, 69,14, 5970-7 (2009).
- [11]. Z. Hu,, et al., Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest*, 118, 7, 2600-8, (2008).
- [12]. Z. Hu,, et al., Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with

- increased risk of breast cancer in Chinese women. *Hum Mutat*, 30, 79-84 (2009).
- [13]. IAEA. A Regular Day at "K Hospital" in Hanoi. [cited 2014 18th June], (2014) Available from: <http://www.iaea.org/newscenter/news/2014/cancervietnam.html>.
- [14]. M.V. Iorio, et al., MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 65, 16, 7065-70 (2005).
- [15]. D.J. Jedlinski, et al., Single nucleotide polymorphism in hsa-mir-196a-2 and breast cancer risk: a case control study. *Twin Res Hum Genet*, 14, 5, 417-21 (2011).
- [16]. M. Kayani, et al., Role of miRNAs in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12, 12, 3175-80 (2011).
- [17]. X.D. Li, et al., A variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese patients with cirrhosis. *Pathology*, 42, 7, 669-73 (2010).
- [18]. J.J. Linhares, et al., Evaluation of single nucleotide polymorphisms in microRNAs (hsa-miR-196a2 rs11614913 C/T) from Brazilian women with breast cancer. *BMC Med Genet*, 13, 119 (2012).
- [19]. R. Luthra, et al., MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene*, 27, 52, 6667-78 (2008).
- [20]. M.H. Mo, et al., Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *J Cancer*, 3, 432-48 (2012).
- [21]. N. Dien, T. Giang, et al., Genetic polymorphisms in miRNAs targeting the estrogen receptor and their effect on breast cancer risk. *Meta Gene*, 2, 226-236 (2014).
- [22]. L.X. Qiu, et al., miR-196a2 C allele is a low-penetrant risk factor for cancer development. *Cytokine*, 56, 3, 589-92 (2011).
- [23]. H. Qu, et al., Circulating miRNAs: promising biomarkers of human cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12, 5, 1117-25, (2011).
- [24]. M. Takahashi, et al., The clinical significance of MiR-148a as a predictive biomarker in patients with advanced colorectal cancer. *PLoS One*, 7, 10, e46684, (2012).
- [25]. D. Wan, et al., Effects of common polymorphisms rs2910164 in miR-146a and rs11614913 in miR-196a2 on susceptibility to colorectal cancer: a systematic review meta-analysis. *Clin Transl Oncol* (2014).
- [26]. F. Wang, et al., A genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 39, 1, 269-75 (2012).
- [27]. Q. Xu, et al., A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1. *J Mol Cell Biol*, 5, 1, 3-13 (2013).
- [28]. W. Xu, et al., Effects of common polymorphisms rs11614913 in miR-196a2 and rs2910164 in miR-146a on cancer susceptibility: a meta-analysis. *PLoS One*, 6, 5, e20471 (2011).
- [29]. Y. Xu, et al., Different effects of three polymorphisms in MicroRNAs on cancer risk in Asian population: Evidence from published literatures. *PLoS One*, 8, 6, e65123, (2013).
- [30]. J. Yu, et al., MiR-148a inhibits angiogenesis by targeting ERBB3. *J Biomed Res*, 25, 3, 170-7 (2011).
- [31]. J.F. Zhan, et al., A functional variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility of colorectal cancer in a Chinese population. *Arch Med Res*, 42, 2, 144-8 (2011).

- [32]. B. Zhang, et al., microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 302, 1, 1-12 (2007).
- [33]. C. Zhang, et al., Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Chem*, 56, 12, 1871-9 (2010).
- [34]. Z.J. Zhang, S.L. Ma, miRNAs in breast cancer tumorigenesis (Review). *Oncol Rep*, 27, 4, 903-10 (2012).
- [35]. X. Zhou, et al., Altered expression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation. *Oncol Rep*, 27, 2, 447-54 (2012).