

## Bước đầu đánh giá biến đổi của gen *MT-ATP6* ty thể trên bệnh nhân ung thư vú ở Việt Nam

Nguyễn Thị Tú Linh, Nguyễn Thị Thảo, Đỗ Thị Dung, Trịnh Hồng Thái\*

*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN,  
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 03 tháng 10 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 04 tháng 11 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 07 tháng 12 năm 2017

**Tóm tắt:** Gen *MT-ATP6* ty thể mã hóa cho tiểu đơn vị protein  $\alpha$ , trung tâm của kênh proton của phức hệ tổng hợp ATP. Biến đổi của gen *MT-ATP6* được cho là ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp ATP và có liên quan với quá trình tạo u. Trong nghiên cứu này, biến đổi của gen *MT-ATP6* được xác định trên 102 mẫu mô của bệnh nhân ung thư vú và 65 mẫu máu đối chứng sử dụng phương pháp PCR giải trình tự trực tiếp và PCR-RFLP, sau đó sử dụng các phương pháp phân tích thông kê để đánh giá mối liên quan giữa một số biến đổi điển hình với các đặc điểm bệnh học của ung thư vú. Kết quả đã xác định được 20 biến đổi của gen *MT-ATP6* trên 35 mẫu mô u của bệnh nhân ung thư vú và 13 biến đổi trên 26 mẫu máu của người bình thường, trong đó có 12 biến đổi làm thay đổi trình tự axit amin và 1 biến đổi 9183insC chưa được công bố trước đây. Đa số các biến đổi có tần suất thấp từ 2,86% đến 5,71%. Các biến đổi làm thay đổi trình tự axit amin G9053A và G8584A với tần suất cao trên mẫu mô u được sàng lọc trong các mẫu nghiên cứu. Kết quả cho thấy tỉ lệ dạng biến đổi G9053A và G8584A tương ứng là 21,6% (22/102 trường hợp) và 24,5% (25/102 trường hợp) ở mô của bệnh nhân ung thư vú và 18,5% (12/65 trường hợp) ở mẫu máu của người bình thường. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ biến đổi G9053A và G8485A khi so sánh giữa nhóm bệnh nhân và đối chứng cũng như theo các đặc điểm bệnh học của ung thư vú như độ tuổi, kích thước khối u, số hạch, kích thước hạch, mức độ xâm lấn (giai đoạn T), mức độ hạch (giai đoạn N), mức độ biệt hóa của khối u và giai đoạn bệnh. Nghiên cứu này cho thấy biến đổi của gen *MT-ATP6* khác nhau tùy thuộc vào từng nhóm bệnh nhân. Trên đối tượng bệnh nhân ung thư vú Việt Nam, tỉ lệ biến đổi G9053A và G8485A tương đối cao, tuy nhiên các biến đổi này không có mối liên hệ có ý nghĩa thống kê với bệnh ung thư vú.

*Từ khóa:* ADN ty thể, *MT-ATP6*, Ung thư vú.

### 1. Mở đầu

Ty thể là bào quan đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo ra năng lượng của tế bào, ATP, thông qua chuỗi vận chuyển điện tử được tạo thành từ 4 phức hệ enzyme hô hấp (các phức

hệ I - IV) và một phức hệ tổng hợp ATP (phức hệ V) nằm ở màng trong của ty thể [1]. Để đảm nhận chức năng này, ADN ty thể có 37 gen, mã hóa cho 2 rARN, 22 tARN cần thiết cho quá trình tổng hợp protein của ty thể và 13 protein của các phức hệ I, III, IV và V [2]. Phức hệ tổng hợp ATP (phức hệ V) là một enzyme sử dụng một dòng các proton đi qua màng trong của ty thể để tổng hợp nên ATP từ ADP. Nó bao gồm một phần nằm ở trên màng của ty thể ( $F_0$ ) chứa

\* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-4-38582798.

Email: thaith@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4087>

một kênh proton và một thành phần xúc tác ( $F_1$ ) liên kết với  $F_0$  nằm ở trong chất nền của ty thể [3].  $F_0$  có 9 tiểu đơn vị protein, trong đó có 2 tiểu đơn vị  $a$  và  $A6L$  được mã hóa tương ứng bởi các gen  $MT-ATP6$  và  $MT-ATP8$  của ty thể [4]. Trong 2 gen này, sản phẩm của gen  $MT-ATP6$  được coi là trung tâm của kênh proton của phức hệ tổng hợp ATP [2] bởi vì  $F_0$  không thể hoạt động được nếu thiếu tiểu đơn vị  $a$  [5].

Gen  $MT-ATP6$  (hay còn được gọi với tên khác là  $ATP6$  hay  $ATPase6$ ) có kích thước 681 bp, từ vị trí 8527 đến 9207 trên ADN ty thể. Đột biến của gen  $MT-ATP6$  được báo cáo sớm nhất trong các khiếm khuyết của phức hệ V [6] và là các biến đổi được nghiên cứu nhiều nhất trong phức hệ V cho đến nay [3]. Các biến đổi của gen  $MT-ATP6$  cũng đã được báo cáo trong nhiều dạng ung thư khác nhau, bao gồm ung thư vú, đại trực tràng, ung thư buồng trứng và một số dạng ung thư khác [7-9]. Tuy nhiên, vai trò của các biến đổi này trong bệnh ung thư vẫn còn nhiều điều chưa được làm sáng tỏ.

Cho đến nay, vai trò của các đột biến ADN ty thể trong quá trình phát sinh và tiến triển ung thư đã được chứng minh rõ ràng và kết quả cho thấy chúng có tiềm năng sử dụng làm chỉ thị phân tử trong một số bệnh ung thư [8]. Đặc biệt đối với ung thư vú, loại ung thư phổ biến nhất và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong các loại ung thư ở nữ giới (Globocan, 2012), việc tìm kiếm các chỉ thị phân tử nhằm đánh giá tiến triển, di căn xa, sàng lọc và phát hiện sớm bệnh sẽ giúp cho việc điều trị được hiệu quả hơn. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá biến đổi của gen  $MT-ATP6$  ty thể trong mẫu mô của bệnh nhân ung thư vú và tìm hiểu mối liên quan giữa các biến đổi này với các đặc điểm bệnh học của ung thư vú trên một nhóm đối tượng bệnh nhân người Việt Nam.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp

### 2.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu bao gồm mẫu mô ung thư biểu mô ống tuyến vú (được lấy tại vị trí khối u,

gọi là mô u) và mô liền kề (cách mép u khoảng 5 cm) của 102 bệnh nhân ung thư vú được phẫu thuật triệt căn có vết hạch và chẩn đoán xác định bằng mô bệnh học tại Khoa Giải phẫu bệnh - Tế bào, Bệnh viện K trong thời gian từ tháng 12/2012 đến tháng 12/2013. Các bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định là ung thư biểu mô ống tuyến vú và có kết quả chẩn đoán xác định bằng mô bệnh học sau mổ là ung thư vú. Các mẫu bệnh phẩm được lấy vào vùng không bị hoại tử và loại trừ các trường hợp ung thư di căn từ nơi khác đến kèm với danh sách một số đặc điểm bệnh học bao gồm độ tuổi, kích thước khối u, số hạch, kích thước hạch, giai đoạn TNM và mức độ biệt hóa của khối u. Mẫu đối chứng bao gồm mẫu máu của 65 người cho máu bình thường do Khoa Sàng lọc máu, Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương cung cấp. Nghiên cứu được thực hiện đúng theo các quy định hiện hành về đạo đức trong nghiên cứu y học trong việc thu thập các mẫu máu và mô của bệnh nhân. Các dẫn liệu thu được đều được giữ bí mật, chỉ nhằm phục vụ cho mục đích nghiên cứu, không sử dụng cho mục đích nào khác.

### 2.2. Phương pháp

*Tách chiết ADN tổng số và PCR giải trình tự trực tiếp:* ADN tổng số được tách chiết từ mẫu mô và mẫu máu sử dụng QIAamp DNA Mini Kit và QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Đức) tương ứng theo quy trình của nhà sản xuất. Nồng độ ADN tổng số được xác định bằng máy quang phổ NanoDrop 2000c (Thermoscientific, Mỹ). Các cặp mồi đặc hiệu cho từng đoạn ADN quan tâm được thiết kế sử dụng chương trình Primer-BLAST với trình tự ADN ty thể được tham khảo từ cơ sở dữ liệu trong NCBI (mã số NC-012920.1). Trong đó, cặp mồi ATP6 được sử dụng để nhân đoạn ADN có kích thước 1148 bp sử dụng cho giải trình tự trực tiếp được trình bày trong Bảng 1. Thành phần của phản ứng PCR bao gồm: 6,25  $\mu$ l Maxima Hot Start PCR Master Mix 2X; 0,25  $\mu$ l mỗi mồi (0,2  $\mu$ M); khuôn ADN (1 - 2,5 ng/ $\mu$ l) và  $H_2O$  trong tổng thể tích 12,5  $\mu$ l. Chu trình nhiệt sử dụng với cặp mồi ATP6 để nhân

đoạn gen quan tâm như sau: 95°C: 4 phút, 35 chu kỳ (95°C: 30 giây; 56°C: 30 giây; 72°C: 75 giây); 72°C: 5 phút, sau đó giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%, tinh sạch bằng ExoSAP-IT (Affymetrix, Mỹ) và giải trình tự (Công ty 1<sup>st</sup> Base, Malaysia).

**Sàng lọc các biến đổi sử dụng phương pháp PCR-RFLP:** Các biến đổi được lựa chọn của gen *MT-ATP6* (G9053A và G8584A) được tiến hành nhân bản sử dụng cặp mồi 9053 và 8584 (Bảng 1) với thành phần phản ứng bao gồm: 6,25 µl Maxima Hot Start PCR Master Mix 2X;

0,25 µl mỗi mồi (0,2 µM); khuôn ADN (1 - 2,5 ng/µl) và H<sub>2</sub>O trong tổng thể tích 12,5 µl. Chu trình nhiệt sử dụng với cặp mồi 9053 và 8584 được thiết lập như sau: 95°C: 4 phút, 35 chu kỳ (95°C: 30 giây; 54°C: 30 giây; 72°C: 30 giây); 72°C: 5 phút, sau đó giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR có kích thước 298 bp và 292 bp được xử lý với enzyme giới hạn *Hin6I* và *SatI* (Thermo Scientific, Mỹ) tương ứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm cắt enzyme giới hạn (Bảng 1) được điện di kiểm tra trên gel agarose 2,5%.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi và các enzyme giới hạn sử dụng trong xác định biến đổi của gen *MT-ATP6*

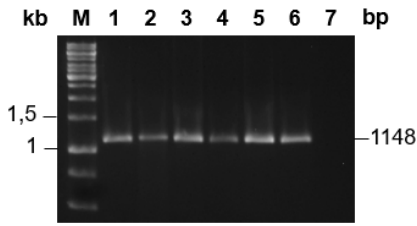
Mục đích	Tên mồi	Kích thước sản phẩm (vị trí)	Trình tự mồi xuôi (5' - 3')	Trình tự mồi ngược (5' - 3')	Enzyme sử dụng	Sản phẩm cắt	
						Không biến đổi	Có biến đổi
Giải trình tự	ATP6	1148 bp (8197-9344)	cagtttcacgcc atcgt	gcctagtagaggagg gtta	-	-	-
Sàng lọc biến đổi G9053A	9053	298 bp (8802-9099)	tacaccaaccacc caactatct	gataagtgtagagg aaggttaaag	<i>Hin6I</i> 5' G↓CGC 3'	252 bp, 46 bp	298 bp
Sàng lọc biến đổi G8584A	8584	292 bp (8451-8742)	taaacacaaacta ccacctacctc	tagtataagagatcag gttcgtcgt	<i>SatI</i> 5' GC↓NGC 3'	160 bp, 132 bp	292 bp

**Phân tích thống kê:** Sử dụng phần mềm BioEdit để phân tích kết quả giải trình tự và chương trình BLAST để so sánh trình tự thu được với trình tự ADN chuẩn của ty thể (NC-012920.1). Mối liên quan giữa các dạng biến đổi ở mẫu mô u và mô liền kề với một số đặc điểm bệnh học của ung thư vú được phân tích bằng kiểm định  $\chi^2$  hoặc kiểm định Fisher sử dụng phần mềm SPSS23. Đối với mỗi biến đổi, tỉ số nguy cơ OR và khoảng tin cậy 95% được tính toán để xác định mối liên quan với nguy cơ mắc ung thư vú. Tất cả các kiểm định thống kê được ghi nhận theo 2 chiều và giá trị  $p < 0,05$  được coi là có ý nghĩa thống kê.

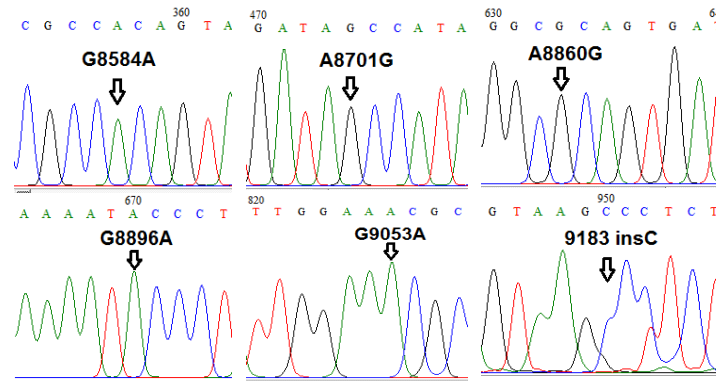
### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Giải trình tự gen *MT-ATP6* ty thể và phân tích các dạng biến đổi

Trong nghiên cứu này, đoạn ADN có kích thước 1148 bp chứa gen *MT-ATP6* được nhân bản và sử dụng để giải trình tự trực tiếp trên một số mẫu nhằm xác định các dạng biến đổi (Hình 1). Kết quả giải trình tự (minh họa ở Hình 2) đã phát hiện thấy 20 biến đổi của gen *MT-ATP6* trên 35 mẫu mô u của bệnh nhân ung thư vú và 13 biến đổi trên 26 mẫu máu của người bình thường. Trong số đó, có 5 biến đổi G8584A, A8701G, A8860G, G9053A và G9055A được thấy xuất hiện ở cả mẫu mô và mẫu máu đối chứng (Bảng 2). Tất cả các biến đổi đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu của Mitomap, trừ biến đổi 9183InsC chưa được công bố trước đây. Đặc biệt, các biến đổi này đều ở trạng thái đồng tế bào chất (homoplasmy).



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%  
M: Thang chuẩn ADN 1 kb. Giếng 1-3: Sản phẩm PCR từ mẫu mô (#33157, 33538, 33695). Giếng 4-6: Sản phẩm PCR từ mẫu máu (#29049, 28988, 29110). Giếng 7: Đối chứng âm (H<sub>2</sub>O).



Hình 2. Một số biến đổi của gen *MT-ATP6* được xác định bằng giải trình tự

Bảng 2. Thống kê biến đổi của gen *MT-ATP6* trên mẫu mô u của bệnh nhân ung thư vú và mẫu máu bình thường

TT	Vị trí	Biến đổi	Thay đổi axit amin	Tần suất		Công bố
				Mẫu mô	Mẫu máu	
1	8575	C > T	L - L	1/35	-	+
2	8584	G > A	A - T	11/35	1/26	+
3	8603	T > C	F - S	1/35	-	+
4	8610	T > C	P - P	1/35	-	+
5	8697	G > A	M - M	1/35	-	Ung thư tuyến giáp
6	8701	A > G	T - A	13/35	11/26	Ung thư tuyến giáp
7	8718	A > G	K - K	-	1/26	+
8	8772	T > C	T - T	1/35	-	+
9	8784	A > G	G - G	1/35	-	+
10	8829	C > T	N - N	1/35	-	+
11	8835	C > T	A - A	-	2/26	+
12	8853	A > G	W - W	-	1/26	+
13	8860	A > G	T - A	35/35	26/26	+
14	8866	A > G	I - V	1/35	-	+
15	8868	T > C	I - I	1/35	-	+
16	8896	G > A	A - T	2/35	-	+
17	8922	C > T	G - G	-	1/26	+
18	8972	T > C	L - P	1/35	-	+
19	9000	A > G	V - V	1/35	-	+
20	9053	G > A	S - N	8/35	2/26	+
21	9055	G > A	A - T	1/35	1/26	+
22	9076	A > T	I - F	1/35	-	+
23	9090	T > C	S - S	1/35	-	+
24	9123	G > A	L - L	-	1/26	+
25	9127	A > G	I - V	-	1/26	+
26	9165	T > C	V - V	-	1/26	+
27	9183	InsC	-	-	1/26	k
28	9202	A > C	T - P	1/35	-	+

Chú thích: (+): Đã công bố trên MITOMAP. (k): Chưa công bố trên Mitomap

Trong số 20 biến đổi của gen *MT-ATP6* được xác định trên mẫu mô u của bệnh nhân, có 9 biến đổi không làm thay đổi trình tự axit amin và 11 biến đổi làm thay đổi trình tự axit amin (Bảng 2). Trong đó, 2 biến đổi G8697A (1/35 mẫu) và A8701G (13/35 mẫu) đã được công bố trong ung thư tuyến giáp. Ngoài một số biến đổi làm thay đổi trình tự axit amin có tần suất cao là A8701G (37,14%, 13/35 mẫu), G8584A (31,43%, 11/35 mẫu) và G9053A (22,86%, 8/35 mẫu), các biến đổi còn lại được xác định với tần suất từ 2,86% - 5,71% (1 - 2 mẫu). Riêng biến đổi A8860G được xác định thấy có mặt trong 100% mẫu giải trình tự. Trên mẫu máu đối chứng, kết quả đã xác định được tổng số 13 biến đổi, trong đó có 6 biến đổi làm thay đổi trình tự axit amin (Bảng 2). Những biến đổi có tần suất cao gặp trong mẫu máu của người bình thường là G8860A (100%, 26/26 mẫu) và A8701G (42,31%, 11/26 mẫu). Kết quả này cho thấy biến đổi của gen *MT-ATP6* trên mẫu máu đối chứng có tần suất thấp hơn so với biến đổi được tìm thấy trong mẫu mô của bệnh nhân. Từ kết quả nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành lựa chọn 2 biến đổi G9053A và G8584A là các biến đổi làm thay đổi trình tự axit amin của phân tử protein, có tần suất cao trên mẫu mô u và tần suất thấp trên mẫu máu của người bình thường để thực hiện phản ứng PCR-RFLP nhằm sàng lọc trên các mẫu nghiên cứu.

### 3.2. Tần suất biến đổi G9053A và G8584A trong các mẫu nghiên cứu

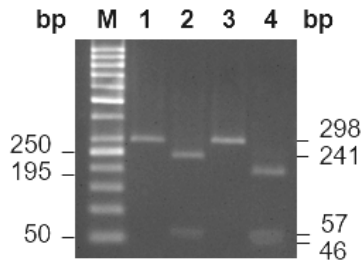
Biến đổi G9053A được sàng lọc trên các mẫu nghiên cứu bằng phương pháp PCR-RFLP sử dụng enzyme *Hin6I* (Thermo Scientific, Mỹ). Theo tính toán, nếu không có biến đổi (9053G) thì enzyme sẽ cắt sản phẩm PCR có kích thước 298 bp thành 2 đoạn ADN có kích thước 252 bp và 46 bp. Ngược lại, nếu có biến đổi (9053A) thì enzyme sẽ không cắt và tạo thành 1 băng duy nhất có kích thước bằng sản phẩm PCR (298 bp). Tuy nhiên, kết quả cắt enzyme ở Hình 3 cho thấy: tại giếng 2 xuất hiện 2 băng có kích thước 241 bp và 57 bp, giếng 4 xuất hiện 3 băng. Kết quả này khác so với tính toán ban đầu. Kiểm tra lại bằng giải trình tự

trực tiếp cho thấy 100% các mẫu đều có biến đổi A8860G. Biến đổi từ A > G tại vị trí 8860 tạo ra 1 điểm cắt của enzyme *Hin6I* làm cho các mẫu không có biến đổi G9053A được cắt tại 2 vị trí và tạo ra 3 băng có kích thước là 195 bp, 57 bp và 46 bp. Tương tự, với các mẫu có đồng thời 2 biến đổi G9053A và A8860G thì enzyme *Hin6I* sẽ cắt tại 1 vị trí và tạo thành 2 băng có kích thước 241 bp và 57 bp. Kết quả này cho thấy ở giếng số 2 là mẫu có biến đổi G9053A và giếng số 4 là mẫu không có biến đổi. Tiến hành sàng lọc trên các mẫu nghiên cứu cho thấy tỉ lệ dạng biến đổi 9053A là 21,6% (22/102 trường hợp) ở mô của bệnh nhân ung thư vú và 18,5% (12/65 trường hợp) ở mẫu máu của người bình thường. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,627$  (Bảng 3).

Tương tự, biến đổi G8584A được sàng lọc trên các mẫu nghiên cứu sử dụng enzyme *SatI* (Thermo Scientific, Mỹ). Theo Hình 4, các mẫu không biến đổi sẽ cho 2 băng có kích thước 160 bp và 132 bp (giếng 5). Ngược lại, các mẫu có biến đổi sẽ cho duy nhất 1 băng ADN có kích thước là 292 bp (giếng 2, 3). Kết quả sàng lọc trên các mẫu nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,359$ ) về tỉ lệ biến đổi G8584A trên các mẫu của bệnh nhân ung thư vú và đối chứng, trong đó, tỉ lệ dạng biến đổi 8584A được xác định là 24,5% (25/102 trường hợp) ở mô u và lân cận u của bệnh nhân và 18,5% (12/65 trường hợp) ở mẫu máu của bình thường (Bảng 3).

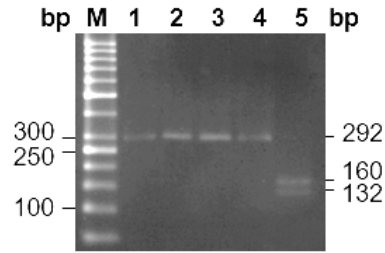
### 3.3. Mối liên quan giữa biến đổi G9053A và G8584A với một số đặc điểm bệnh học của ung thư vú

Nghiên cứu mối liên quan giữa biến đổi G9053A và G8584A với một số đặc điểm bệnh học của ung thư vú đã cho thấy không có mối liên quan giữa tỉ lệ biến đổi G9053A và G8485A ở mô u với các đặc điểm bệnh học của ung thư vú như độ tuổi, kích thước khối u, số hạch, kích thước hạch, mức độ xâm lấn (giai đoạn T), mức độ hạch (giai đoạn N), mức độ biệt hóa của khối u và giai đoạn bệnh (Bảng 3).



Hình 3. Ảnh điện di xác định biến đổi G9053A bằng enzyme *Hin6I* trên gel agarose 2,5%.

M: Thang chuẩn ADN 50 bp. Giếng 1, 3: sản phẩm PCR mẫu mô u của bệnh nhân (#48839 và #50264). Giếng 2: Sản phẩm cắt mẫu mô u có biến đổi G9053A (#48839). Giếng 4: Sản phẩm cắt mẫu mô u không có biến đổi G9053A (#50264).



Hình 4. Ảnh điện di xác định biến đổi G8584A bằng enzyme *SatI* trên gel agarose 2,5%.

M: Thang chuẩn ADN 50 bp. Giếng 1, 4: sản phẩm PCR mẫu mô u của bệnh nhân (#34891 và #31403). Giếng 2, 3: Sản phẩm cắt mẫu mô u và mô liền kề có biến đổi G8584A (#34891). Giếng 5: Sản phẩm cắt mẫu không có biến đổi G8584A (#31403).

Bảng 3. Mối liên quan giữa biến đổi G9053A và G8584A của gen MT-ATP6 với các đặc điểm bệnh học của ung thư vú

Đặc điểm	n	9053		p <sup>1</sup>	8584		p <sup>2</sup>
		G (% , n)	A (% , n)		G (% , n)	A (% , n)	
Loại mẫu							
Mô ung thư vú	102	78,4% (80)	21,6% (22)	0,627	75,5% (77)	24,5% (25)	0,359
Máu bình thường	65	81,5% (53)	18,5% (12)		81,5% (53)	18,5% (12)	
Độ tuổi							
< 50	38	76,3% (29)	23,7% (9)	0,606	81,6% (31)	18,4% (7)	0,306
≥ 50	62	80,6% (50)	19,4% (12)		72,6% (45)	27,4% (17)	
Kích thước khối u (cm <sup>3</sup> )							
< 5	47	74,5% (35)	25,5% (12)	0,368	78,7% (37)	21,3% (10)	0,483
≥ 5	55	81,8% (45)	18,2% (10)		72,7% (40)	27,3% (15)	
Số hạch							
< 10	75	80,0% (60)	20,0% (15)	0,521	76,0% (57)	24,0% (18)	0,842
≥ 10	27	74,1% (20)	25,9% (7)		74,1% (20)	25,9% (7)	
Kích thước hạch (cm)							
≤ 0,5	43	81,4% (35)	18,6% (8)	0,505	76,7% (33)	23,3% (10)	0,764
> 0,5	58	75,9% (44)	24,1% (14)		74,1% (43)	25,9% (15)	
Mức độ xâm lấn (giai đoạn T)							
T <sub>1-2</sub>	82	75,6% (62)	24,4% (20)	0,232*	75,6% (62)	24,4% (20)	1,0*
T <sub>3-4</sub>	19	89,5% (17)	10,5% (2)		73,7% (14)	26,3% (5)	
Mức độ hạch (giai đoạn N)							
N <sub>0</sub>	56	76,8% (43)	23,2% (13)	0,697	76,8% (43)	23,2% (13)	0,689
N <sub>1-2</sub>	45	80,0% (36)	20,0% (9)		73,3% (33)	26,7% (12)	
Mức độ biệt hóa							
Rõ	10	80,0% (8)	20,0% (2)	0,980	90,0% (9)	10,0% (1)	0,136
Vừa	66	77,3% (51)	22,7% (15)		69,7% (46)	30,3% (20)	
Kém	23	78,3% (18)	21,7% (5)		87,0% (20)	13,0% (3)	
Giai đoạn bệnh							
Giai đoạn 0 - II	80	80,0% (64)	20,0% (16)	0,397*	72,5% (58)	27,5% (22)	0,212
Giai đoạn III - IV	21	71,4% (15)	28,6% (6)		85,7% (18)	14,3% (3)	

Chú thích: n: số lượng mẫu. P: các giá trị p nhận được từ kiểm định Fisher (\*) và kiểm định  $\chi^2$  khi so sánh các mẫu có biến đổi G9053A (<sup>1</sup>) và biến đổi G8584A (<sup>2</sup>). Giai đoạn 0 - I: T<sub>0-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>; Giai đoạn II: T<sub>3-4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>; Giai đoạn III: T<sub>1-4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>, T<sub>bất kỳ</sub>N<sub>2</sub>M<sub>0</sub>; Giai đoạn IV: T<sub>bất kỳ</sub>N<sub>bất kỳ</sub>M<sub>1</sub>

#### 4. Thảo luận

Biến đổi của các gen ty thể từ lâu đã được cho là có liên quan với quá trình tạo u bởi vì các tế bào ung thư cần sử dụng nhiều năng

lượng ATP và tổng hợp mới các nucleotide, lipid và protein cần cho tăng sinh nhanh chóng [12]. Ở tế bào bình thường, ATP chủ yếu được tổng hợp ở ty thể thông qua chu trình axit tricarboxylic (TCA) và sau đó là OXPHOS.

Ngược lại, theo Warburg, các tế bào ung thư dựa chủ yếu vào đường phân để sản xuất ATP ngay cả khi có mặt oxy. Điều này cho thấy chức năng phosphoryl hóa oxy hóa của ty thể có thể bị biến đổi trong các tế bào ung thư [12]. Phức hệ V của ty thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo ATP và con đường chết theo chương trình của tế bào và do đó nếu gen *MT-ATP6* của phức hệ V bị biến đổi thì sẽ liên quan đến sự chuyển đổi của tế bào [8]. Theo tổng kết của Lu và cs (2009), có 55 đột biến của gen *MT-ATP6* đã được báo cáo trong nhiều dạng ung thư khác nhau như ung thư vú, đại trực tràng, ung thư phổi và một số dạng ung thư khác, tuy nhiên, vai trò của các biến đổi này trong quá trình phát sinh ung thư vẫn còn nhiều điều chưa được làm sáng tỏ [9].

Trên đối tượng bệnh nhân ung thư vú, các biến đổi của gen *MT-ATP6* đã được báo cáo trong một số nghiên cứu trước đây, tuy nhiên kết quả thu được rất khác biệt trên các nhóm bệnh nhân khác nhau. Sharp và cs (1992) nghiên cứu trên 17 bệnh nhân và không phát hiện thấy có biến đổi nào trên gen *MT-ATP6* [13]. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Chintha và cs (2013) trên 180 bệnh nhân ung thư vú [14]. Ngược lại, nghiên cứu của Tan và cs (2002) trên các mẫu mô u và mô liền kề của bệnh nhân ung thư vú đã phát hiện thấy 1 đột biến soma (T9131C) và 8 đột biến dòng mầm của gen *MT-ATP6*, trong đó có 4 đột biến mới chưa được công bố trước đó [15]. Grzybowska-Szatkowska và cs (2014) cũng phát hiện thấy 8 biến đổi nucleotide của gen *MT-ATP6*, chiếm 72% (36/50) bệnh nhân được nghiên cứu, trong đó có 5 biến đổi G8557A, G8697A, T8793C, G8854A và A8860G đã được công bố trong Cơ sở dữ liệu hệ gen ty thể người của Đại học Uppsala và 3 biến đổi mới lần đầu tiên được công bố (G8858C, T9119G, C9130G) [4]. Gần đây, Ghaffarpour và cs (2014) giải trình tự toàn bộ gen *MT-ATP6* của 49 bệnh nhân ung thư vú Iran và phát hiện được 23 biến đổi (chiếm 82,14%) ở mô u của bệnh nhân thuộc gen *MT-ATP6*. Trong đó, đa số các biến đổi có tần suất thấp: 16 biến đổi (69,6%) chỉ xuất hiện duy nhất 1 lần, 4 biến đổi (17,4%)

xuất hiện 2 lần và 2 biến đổi (8,7%) xuất hiện 3 lần [16]. Một nghiên cứu trên 30 bệnh nhân ung thư vú người Mizoram, Ấn Độ và nhóm đối chứng đã tìm thấy 9 đột biến thay thế nucleotide trên 2 gen *MT-ATP6* và *MT-ATP8* trong 5 mẫu nghiên cứu (chiếm 62,5%). Trong đó các biến đổi G8584A, T8602C và G8701A dẫn đến sự thay đổi axit amin A20T, F26L và T59A tương ứng, từ đó có thể dẫn đến sai hỏng trong hệ thống OXPHOS của ty thể. Kết quả cũng cho thấy tỉ lệ đột biến nucleotide của gen *MT-ATP6* và *MT-ATP8* cao hơn so với gen ND1 (chiếm 25%) trong cùng nghiên cứu và gen *MT-ATP6* bị biến đổi nhiều hơn so với gen *MT-ATP8* trên nhóm bệnh nhân ung thư vú Mizoram, tương tự như trong các quần thể khác. Nhóm tác giả cũng cho rằng các gen *MT-ATP6/8* dễ biến đổi hơn trong bệnh ung thư vú và có thể giữ một vai trò quan trọng trong quá trình sinh ung thư bằng cách thay đổi mức độ trao đổi năng lượng trong tế bào ung thư [17]. Trong nghiên cứu này, kết quả xác định được 20 biến đổi của gen *MT-ATP6* trên 35 mẫu mô u và 13 biến đổi trên mẫu máu đối chứng, trong đó, có duy nhất 1 biến đổi 9183InsC chưa thấy được công bố trước đây. Các biến đổi đều ở dạng đồng tế bào chất, trong đó, đa số xuất hiện với tần suất thấp (81,8%, 27/33 biến đổi) và làm thay đổi trình tự axit amin của chuỗi protein (51,52%, 17/33 biến đổi). Mặc dù vậy, vai trò của các biến đổi có tác động đến cấu trúc và chức năng của phân tử protein có mối liên quan với quá trình tạo u hay không cần phải được tiếp tục nghiên cứu sâu hơn bởi vì các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng một số đột biến soma của gen *MT-ATP6* ở mô ung thư đóng vai trò là tác nhân gây bệnh và tham gia vào quá trình tạo u. Ví dụ, Petros và cs (2005) đã xác định thấy biến đổi T8993G có vai trò làm tăng tốc độ phát triển của khối u đối với ung thư tuyến tiền liệt bằng cách tăng sản sinh ra các gốc tự do chứa oxy (ROS) và oxy hóa ít pyruvate và NADH hơn dẫn đến chuyển sang con đường hô hấp hiếu khí [2]. Tương tự, nghiên cứu của Shidara và cs (2005) cũng cho thấy đột biến T8993G và T9176C thúc đẩy quá trình tạo u bằng cách ngăn chặn quá trình

apoptosis mặc dù cơ chế chi tiết vẫn chưa được hiểu biết rõ [18].

Ngoài các đột biến của ADN ty thể tác động trực tiếp đến phân tử protein, sự có mặt của các đa hình ADN ty thể cũng được cho là đóng vai trò quan trọng vì chúng gây ra một sự gia tăng nhẹ, gần như không thể phát hiện được, trong sản xuất ROS và có thể tạo ra ưu thế chọn lọc đối với các ADN đột biến [4]. Ví dụ, biến đổi A8860G của gen *MT-ATP6* đã được báo cáo là đa hình trong các nghiên cứu trước đây với tần suất từ 79 - 100% trong ung thư vú [15, 16, 19] và từ 75 - 100% trong các dạng ung thư khác [1]. Mặc dù biến đổi này làm thay đổi axit amin từ threonine thành alanine ở vùng protein kém bảo thủ và không tác động đến cấu trúc của protein, tuy nhiên nó vẫn có thể ảnh hưởng đến các đột biến của ADN nhân và ADN ty thể khác và có thể làm tăng nguy cơ mắc ung thư vú [16]. Tương tự, biến đổi đa hình G9055A, làm thay đổi axit amin alanine thành threonine ở vùng protein bảo thủ và có thể ảnh hưởng đến cấu trúc của phân tử protein, đã được báo cáo với tần suất từ 10,5 - 18,6% và có thể làm tăng nguy cơ mắc cũng như tiến triển của ung thư vú [23]. Theo Czarnecka và cs (2010), một số đa hình của gen *MT-ATP6* cùng với các đột biến soma G8697A, A8706G, C9030T, A8701G (T-A), A8716G (K-E), T9137C (I-T) ở tuyến giáp có liên quan với khối u tế bào Hürthle [8]. Giải thích cho điều này, Máximo và cs (2002) cho rằng các đa hình của gen *MT-ATP6* có thể dẫn đến sự sao chép ADN ty thể kém hiệu quả và dẫn đến các bất thường của ADN ty thể như mất đoạn lớn của ADN ty thể và sự hình thành của khối u [24].

Trong nghiên cứu này, 2 biến đổi đa hình G9053A (S-N) và G8584A (A-T) lần đầu tiên được sàng lọc trong 102 mẫu mô của bệnh nhân ung thư vú người Việt Nam và 65 mẫu đối chứng. Tuy nhiên, tần suất của các biến đổi G9053A và G8584A ở nhóm bệnh nhân (21,6% và 24,5% tương ứng) và nhóm đối chứng (18,5%) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy không có mối liên quan giữa 2 biến đổi này với các đặc điểm bệnh học của ung thư vú như độ

tuổi, kích thước khối u, số hạch, kích thước hạch, mức độ xâm lấn (giai đoạn T), mức độ hạch (giai đoạn N), mức độ biệt hóa của khối u và giai đoạn bệnh. Trong nghiên cứu của Ghaffarpour và cs (2014) trên 49 bệnh nhân ung thư vú Iran, các biến đổi của gen *MT-ATP6* xác định được không có mối liên hệ có ý nghĩa thống kê với các đặc điểm bệnh học của bệnh ung thư vú như độ tuổi, độ mô học, giai đoạn TNM, kích thước khối u, tình trạng hạch lympho, tình trạng di căn hạch... Các biến đổi G9053A và G8584A không xác định thấy trong nhóm bệnh nhân này [16]. Tương tự, Grzybowska-Szatowska và cs (2014) xác định thấy 8 biến đổi ở 36/50 bệnh nhân ung thư vú, tuy nhiên, không có bệnh nhân nào có biến đổi G9053A và G8584A [4]. Trong nghiên cứu của Thapa và cs (2016) trên 8 bệnh nhân ung thư vú Ấn Độ và 5 đối chứng, biến đổi G8485A được xác định với tần suất 12,5% (1/8 bệnh nhân) và không có trường hợp nào có biến đổi G9053A [17]. Như vậy, có thể thấy tỉ lệ của biến đổi G9053A và G8485A khác nhau tùy thuộc vào từng nhóm bệnh nhân. Trên đối tượng bệnh nhân ung thư vú Việt Nam, tỉ lệ biến đổi tương đối cao, tuy nhiên, tần suất của các biến đổi này không có mối liên hệ có ý nghĩa thống kê với đặc điểm bệnh học của ung thư vú.

### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Hà Nội trong đề tài mã số QG.16.14.

### Tài liệu tham khảo

- [1] Chatterjee A, Dasgupta S, Sidransky D, Mitochondrial subversion in cancer, *Cancer Prev Res (Phila)* 2011, 4(5):638-54.
- [2] Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF, Wallace DC, mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(3):719-24.



- [3] Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ, Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology, *J Inherit Metab Dis* 2012, 35(2):211-25.
- [4] Grzybowska-Szatowska L, Slaska B, Rzymowska J, Brzozowska A, Florianczyk B, Novel mitochondrial mutations in the ATP6 and ATP8 genes in patients with breast cancer, *Mol Med Rep* 2014, 10(4): 1772-8.
- [5] Hejzlarová K, Mráček T, Vrbacký M, Kaplanová V, Karbanová V, Nůsková H, Pecina P, Houštěk J, Nuclear genetic defects of mitochondrial ATP synthase, *Physiol Res* 2014, 63 Suppl 1:S57-71.
- [6] Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA, A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy, *Am J Hum Genet* 1990, 46(3): 428-33.
- [7] Copeland WC, Wachsman JT, Johnson FM, Penta JS, Mitochondrial DNA alterations in cancer, *Cancer Invest* 2002, 20(4):557-69.
- [8] Czarnecka AM, Kukwa W, Krawczyk T, Scinska A, Kukwa A, Cappello F, Mitochondrial DNA mutations in cancer--from bench to bedside, *Front Biosci* 2010, 15:437-60.
- [9] Lu JSL, Bai Y, Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis, *Cell Research* 2009, 19:802-15.
- [10] Kulawiec M, Salk JJ, Ericson NG, Wanagat J, Bielas JH, Generation, function, and prognostic utility of somatic mitochondrial DNA mutations in cancer, *Environ Mol Mutagen* 2010, 51(5): 427-39.
- [11] Plak K, Czarnecka AM, Krawczyk T, Golik P, Bartnik E, Breast cancer as a mitochondrial disorder (Review), *Oncol Rep* 2008, 21(4): 845-51.
- [12] Dumas JF, Rousse D, Servais S, Mitochondria and cancer, *Cellular Bioenergetics in Health and Diseases: New Perspectives in Mitochondrial Biology*, 2012, 115-47.
- [13] Sharp MG, Adams SM, Walker RA, Brammar WJ, Varley JM, Differential expression of the mitochondrial gene cytochrome oxidase II in benign and malignant breast tissue, *J Pathol* 1992, 168(2): 163-8.
- [14] Chintla R, Kaipa PR, Sekhar N, Hasan Q, Mitochondria and tumors: A new perspective, *Indian J Cancer* 2013, 50(3).
- [15] Tan DJ, Bai RK, Wong LJ, Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer, *Cancer Res* 2002, 62(4):972-6.
- [16] Ghaffarpour M, Mahdian R, Fereidooni F, Kamalidehghan B, Moazami N, Houshmand M, The mitochondrial ATPase6 gene is more susceptible to mutation than the ATPase8 gene in breast cancer patients, *Cancer Cell Int* 2014, 14(1):21.
- [17] Thapa S, Lalrohlu F, Ghatak S, Zohmingthanga J, Lallawmzuali D, Pautu JL, Senthil Kumar N, Mitochondrial complex I and V gene polymorphisms associated with breast cancer in mizo-mongloid population, *Breast Cancer* 2016, 23(4):607-16.
- [18] Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, Nakano K, Kwong JQ, Manfredi G, Oda H, Ohta S, Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis, *Cancer Res* 2005, 65(5):1655-63.
- [19] Czarnecka AM, Klemba A, Krawczyk T, Zdrozny M, Arnold RS, Bartnik E, Petros JA, Mitochondrial NADH-dehydrogenase polymorphisms as sporadic breast cancer risk factor, *Oncol Rep* 2010, 23(2):531-35.
- [20] Aikhionbare FO, Khan M, Carey D, Okoli J, Go R, Is cumulative frequency of mitochondrial DNA variants a biomarker for colorectal tumor progression? *Mol Cancer* 2004, 3:30.
- [21] Aikhionbare FO, Mehrabi S, Kumaresan K, Zavareh M, Olatinwo M, Odunsi K, Partridge E, Mitochondrial DNA sequence variants in epithelial ovarian tumor subtypes and stages, *J Carcinog* 2007, 6:1.
- [22] Mehrabi S, Akwe JA, Adams G Jr, Grizzle W, Yao X, Aikhionbare FO, Analysis of mtDNA sequence variants in colorectal adenomatous polyps, *Diagn Pathol* 2010, 5:66.
- [23] Bai RK, Leal SM, Covarrubias D, Liu A, Wong LJ, Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk, *Cancer Res* 2007, 67(10):4687-94.
- [24] Máximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M, Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hürthle cell tumors, *Am J Pathol* 2002, 160(5):1857-65.

## Preliminary Study of *MT-ATP6* Gene's Alterations in Patients with Breast Cancer in Vietnam

Nguyen Thi Tu Linh, Nguyen Thi Thao,  
Do Thi Dung, Trinh Hong Thai

*VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam*

**Abstract:** The *MT-ATP6* gene encodes for a protein subunit which is central to the proton channel of the ATP synthase. Mutations of *MT-ATP6* gene can affect the ATP synthesis and may play an important role in the process of tumorigenesis. The purpose of this study was to identify potential changes of *MT-ATP6* gene in pair of tumor and adjacent tissues of 102 patients with breast cancer and in blood samples of 65 controls by using direct DNA sequencing and PCR-RFLP method. Then, statistical analysis was used to analyze the association between some typical changes and pathological features of breast cancer. As a result, 20 changes in the *MT-ATP6* gene in 35 examined breast cancer tissues and 13 changes in 26 blood control samples were reported, of which 12 alterations altered the amino acid and a variant, 9183insC, had not been described in the literature so far. Most of the variants had low frequencies from 2.86% to 5.71%. Two variants, G9053A and G8584A, which changed the amino acid sequence and had high frequency, were screened in all samples. Our results indicated that the frequencies of G9053A and G8584A were 21,6% (22/102 cases) and 24,5% (25/102 cases) respectively in tissues of breast cancer patients and 18,5% (12/65 cases) in normal blood controls. However, there was no statistically significant difference in G9053A and G8485A rates between breast cancer patients and controls as well as between mtDNA alterations and the pathological features of breast cancer such as age, size of tumors, number of lymph nodes, size of lymph nodes, T stage, N stage, tumor differentiation and stages of disease. This study showed that the variations of *MT-ATP6* gene differed from patient groups. In Vietnamese patients with breast cancer, the rates of G9053A and G8485A were relatively high but these changes were not statistically related to breast cancer.

*Keywords:* Breast cancer, mitochondrial DNA, MT-ATP6.