



Biến đổi của gen *MT-ATP8* ty thể và mất đoạn 9 bp 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, ĐHQG Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Gen *MT-ATP8* ty thể mã hóa cho tiểu đơn vị protein A6L thuộc kênh proton của phức hệ tổng hợp ATP. Biến đổi của gen *MT-ATP8* có thể ảnh hưởng tới cấu trúc và chức năng của enzyme ATP synthase, từ đó có thể gây bệnh. Trong nghiên cứu này, biến đổi của gen *MT-ATP8* được xác định trên mẫu mô của bệnh nhân ung thư vú và mẫu máu của người bình thường sử dụng phương pháp PCR kết hợp giải trình tự trực tiếp và PCR-RFLP, sau đó được phân tích và đánh giá bằng các phương pháp tin sinh học và thống kê sinh học. Kết quả PCR và giải trình tự trực tiếp đã xác định được 5 biến đổi của gen *MT-ATP8* trên 35 mẫu mô u của bệnh nhân ung thư vú và 26 mẫu máu của người bình thường, trong đó có 2 biến đổi làm thay đổi trình tự axit amin của phân tử protein tương ứng là C8414T và C8417T. Biến đổi C8417T được sàng lọc tiếp bằng PCR-RFLP và là biến đổi hiếm gặp với tần suất 0,98% (1/102 mẫu mô) của bệnh nhân ung thư vú. Biến đổi này làm thay đổi axit amin leucine thành phenylalanine (L18F) thuộc vị trí bảo thủ của A6L và được dự đoán có nhiều khả năng làm thay đổi cấu trúc và chức năng của phân tử protein. Bên cạnh đó, mất đoạn 9 bp cũng được tìm thấy trong vùng không mã hóa của ADN ty thể có tần suất 26,5% (27/102 trường hợp) ở bệnh nhân và 27% (7/26 trường hợp) ở mẫu đối chứng. Như vậy, kết quả đã cho thấy đột biến C8417T ở vị trí bảo thủ của gen *MT-ATP8* thuộc loại hiếm gặp và lần đầu tiên được xác định thấy trong một nhóm bệnh nhân ung thư vú tại Việt Nam.

Từ khóa: ADN ty thể, MT-ATP8, Ung thư vú.

1. Mở đầu

Ty thể được coi là “nhà máy năng lượng” của tế bào vì nó tạo ra hơn 90% năng lượng ATP cho các hoạt động của tế bào. Để đảm nhận chức năng này, ty thể có hệ gen riêng với 37 gen mã hóa cho 13 protein của các phức hệ

hô hấp ty thể (phức hệ I - V), 2 ARN ribosome và 22 ARN vận chuyển [1]. Ty thể cũng giữ vai trò quan trọng trong chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào, do đó biến đổi của các gen ty thể được cho là có liên quan với quá trình tạo u bởi vì các tế bào ung thư cần sử dụng nhiều năng lượng để sinh trưởng và tăng sinh dưới các điều kiện hạn chế [2].

Trong các phức hệ hô hấp ty thể, phức hệ V là phức hệ tổng hợp ATP. Nó bao gồm một

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-243-8582798.

Email: thaith@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4713>

kênh proton nằm ở trên màng của ty thể (F_0) và một thành phần xúc tác (F_1) nằm ở trong chất nền. Trong số 9 tiểu đơn vị của F_0 , 2 tiểu đơn vị α và A6L được mã hóa bởi các gen *MT-ATP6* và *MT-ATP8* của ty thể [3]. Đột biến trong trình tự mã hóa cho 2 tiểu đơn vị này của phức hệ tổng hợp ATP có thể ảnh hưởng tới cấu trúc và chức năng của enzyme ATP synthase [4].

Gen *MT-ATP8* (còn được gọi với tên khác là *ATP8* hay *ATPase8*) có kích thước 207 bp, nằm từ vị trí 8366 đến 8572 trên sợi nặng của ADN ty thể và mã hóa cho tiểu đơn vị A6L. Gen này mã hóa cho phân tử protein thuộc vùng có chức năng quan trọng của phức hệ tổng hợp ATP, tuy nhiên vai trò các biến đổi của gen *MT-ATP8* trong ung thư vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu đầy đủ. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá biến đổi của gen *MT-ATP8* ty thể 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) 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 và mẫu máu của 26 người cho máu bình thường do Khoa Sàng lọc máu, Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương cung cấp. 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. Danh sách một số đặc điểm bệnh học bao gồm độ tuổi, kích thước khối u, số hạch, kích thước hạch, giai đoạn TNM (u nguyên phát - hạch tại vùng - di căn xa) và mức độ biệt hóa của khối u được cung cấp kèm theo mẫu bệnh phẩm. 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 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) 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) (Bảng 1). Thành phần của phản ứng PCR nhân bản đoạn ADN có kích thước 1148 bp sử dụng để giải trình tự bao gồm: 6,25 μ l Maxima Hot Start PCR Master Mix 2X; 0,25 μ l mỗi mồi (0,2 μ M); khuôn ADN (với nồng độ từ 1 - 2,5 ng/ μ l) và H₂O trong tổng thể tích 12,5 μ l. Hỗn hợp phản ứng được chạy trên máy GenAmp[®] PCR System 9700 với chu trình nhiệt 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 1st Base, Malaysia).

Dự đoán khả năng gây bệnh của biến đổi dựa trên sự thay đổi trình tự axit amin: Tác động của các biến đổi gen làm thay đổi trình tự axit amin đến cấu trúc và chức năng của phân tử protein được dự đoán bằng chương trình PolyPhen-2[5].

Sàng lọc biến đổi C8417T sử dụng phương pháp PCR-RFLP: Đoạn gen *MT-ATP8* mang biến đổi C8417T (được dự đoán có vai trò quan trọng đến phân tử protein) được tiến hành nhân bản sử dụng cặp mồi 8417 (Bảng 1) với thành phần phản ứng bao gồm: 6,25 μ l Maxima Hot Start PCR Master Mix 2X; 0,25 μ l mỗi mồi (0,2 μ M); khuôn ADN (với nồng độ từ 1 - 2,5 ng/ μ l) và H₂O trong tổng thể tích 12,5 μ l. Chu trình

nhệt sử dụng với cặp mồi 8417 được thiết lập như sau: 95°C: 4 phút, 35 chu kỳ (95°C: 30 giây; 52°C: 30 giây; 72°C: 30 giây); 72°C: 5 phút, sau đó giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR có kích thước 255 bp được xử lý với enzyme giới hạn

DdeI (Thermo Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm cắt enzyme giới hạn được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide 8%.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi và enzyme giới hạn sử dụng trong xác định biến đổi của gen *MT-ATP8*

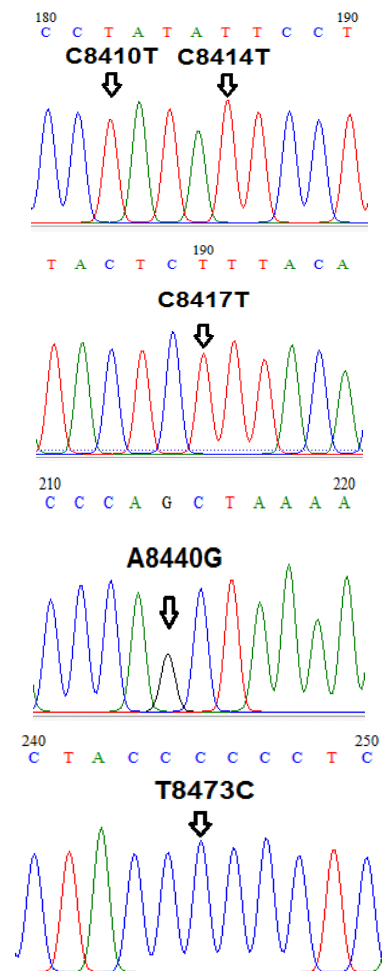
Mục đích	Tên mồi	Kích thước sản phẩm (vị trí)	Trình tự mồi xuôi (5' – 3')	Trình tự mồi ngược (5' – 3')	Enzyme sử dụng	Sản phẩm cắt	
						Không biến đổi	Có biến đổi
Giải trình tự	ATP8	1148 bp (8197-9344)	cagtttcattg cccattcgt	gcctagtagtggaggag cggtta	-	-	-
Sàng lọc biến đổi C8417T	8417	255 bp (8185-8439)	tggagcaaaa ccacagttta c	tgggtgatgaggaat agtctaa	<i>DdeI</i> 5' C↓TNAG 3'	125 bp, 108 bp, 22 bp	125 bp, 130 bp

Các phần mềm tin sinh học và phân tích thống kê: Các mồi đặc hiệu cho phản ứng PCR được thiết kế bằng chương trình Primer BLAST (NCBI). Trình tự các gen ty thể được so sánh, phân tích với trình tự tham chiếu của ADN ty thể công bố trên cơ sở dữ liệu NCBI (NC_012920.1) bằng các phần mềm tin sinh học chuyên dụng như BioEdit v7.0, BLAST và ClustalX. Xác định sản phẩm cắt enzyme giới hạn bằng chương trình Watcut. So sánh thống kê được thực hiện bằng kiểm định χ^2 hoặc kiểm định Fisher (Fisher's exact test) để phân tích mối liên quan giữa các biến đổi với các đặc điểm bệnh học của ung thư vú.

3. Kết quả

3.1. Giải trình tự gen *MT-ATP8* ty thể và phân tích các dạng biến đổi

Trong nghiên cứu này, đoạn ADN chứa gen *MT-ATP8* có kích thước 1148 bp được nhân bản và sử dụng để giải trình tự trực tiếp nhằm xác định các dạng biến đổi. Kết quả giải trình tự trực tiếp trên 35 mẫu mô u của bệnh nhân ung thư vú và 26 mẫu máu đối chứng đã phát hiện thấy 5 biến đổi của gen *MT-ATP8* là C8410T, C8414T, C8417T, A8440G và T8473C (Hình 1).



Hình 1. Các biến đổi của gen *MT-ATP8* xác định thông qua giải trình tự trực tiếp

Trong các biến đổi trên có 3 biến đổi C8414T, A8440G và T8473C được thấy xuất hiện đồng thời ở mẫu mô của bệnh nhân và mẫu máu đối chứng. Các biến đổi của gen *MT-ATP8* ở mẫu mô và máu có tần suất thấp, xuất hiện ở 2/35 bệnh nhân (chiếm 5,7%) và 2/26 đối

chứng (chiếm 7,7%) (Bảng 2). Tất cả các biến đổi đều ở trạng thái đồng tế bào chất (homoplasmy) và đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu của Mitomap. Đáng chú ý, có 2/5 biến đổi (chiếm 40%), C8414T và C8417T, là làm thay đổi trình tự axit amin của phân tử protein (Bảng 2).

Bảng 2. Thống kê biến đổi của gen *MT-ATP8* trên mẫu mô u của bệnh nhân ung thư vú và mẫu máu bình thường xác định bằng giải trình tự trực tiếp

TT	Vị trí	Biến đổi	Thay đổi axit amin	Tần suất		Công bố
				Mẫu mô	Mẫu máu	
1	8410	C > T	P15P	1/35	-	+
2	8414	C > T	L17F	1/35	1/26	Longevity
3	8417	C > T	L18F	1/35	-	+
4	8440	A > G	Q25Q	-	1/26	+
5	8473	T > C	P36P	1/35	1/26	+

Chú thích: (+): Đã công bố trên MITOMAP

3.2. Tác động của biến đổi gen làm thay đổi trình tự axit amin

Mặc dù biến đổi C8414T đã được báo cáo trước đây trong bệnh ung thư vú [6], tuy nhiên trong nghiên cứu này, biến đổi C8414T được phát hiện thấy trong cả mẫu mô của bệnh nhân và mẫu máu của người bình thường. Do đó, chúng tôi lựa chọn phân tích biến đổi C8417T, là biến đổi làm thay đổi trình tự axit amin của phân tử protein, thấy xuất hiện trên mẫu mô của bệnh nhân và không thấy trong mẫu máu đối chứng để tiến hành các phân tích tiếp theo.

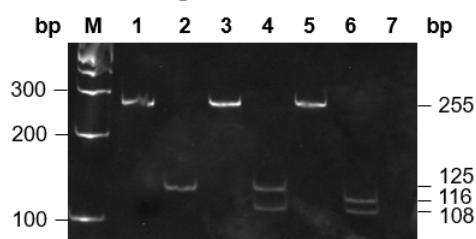
Vai trò của biến đổi C8417T (L18F) đến cấu trúc và chức năng của phân tử protein A6L được dự đoán sử dụng chương trình PolyPhen-2. Theo đó, biến đổi này nằm ở vị trí bảo thủ và được dự đoán là có nhiều khả năng ảnh hưởng đến phân tử protein (PolyPhen-2 score: 0,994). Tiếp theo, chúng tôi thực hiện sàng lọc biến đổi này trong các mẫu nghiên cứu.

3.3. Tần suất biến đổi C8417T trong các mẫu nghiên cứu

Để phân tích biến đổi C8417T trong các mẫu nghiên cứu, đoạn ADN có kích thước 255 bp có chứa vị trí biến đổi 8417 được nhân bản (Giếng 1, 3, 5, Hình 2) và sàng lọc trên các mẫu

nghiên cứu sử dụng enzyme *DdeI* (Thermo Scientific, Mỹ) có vị trí nhận biết C^ATNAG.

Theo tính toán, nếu không có biến đổi (8417C) thì enzyme giới hạn sẽ cắt sản phẩm PCR có kích thước 255 bp thành 3 đoạn ADN tương ứng là 125 bp, 108 bp và 22 bp. Trên gel polyacrylamide 8%, dạng này được xác định nhờ vào 2 băng 125 bp và 108 bp (Giếng 4, Hình 2). Ngược lại, nếu có biến đổi (8417T) thì enzyme giới hạn sẽ cắt sản phẩm PCR có kích thước 255 bp thành 2 đoạn ADN tương ứng là 130 bp và 125 bp. Trên gel polyacrylamide 8%, dạng 8417T được xác định nhờ vào 1 băng có kích thước ~ 130 bp.



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR với cặp mồi 8417 và sản phẩm cắt xác định biến đổi C8417T bằng enzyme *DdeI* trên gel polyacrylamide 8%

M: Thang chuẩn ADN 100 bp. Giếng 1, 3, 5: sản phẩm PCR mẫu mô u của bệnh nhân (#30698, #33114, #33157). Giếng 2, 4, 6: Sản phẩm cắt bằng enzyme *DdeI* mẫu mô u của bệnh nhân (#30698, #33114, #33157). Giếng 7: Đối chứng âm (H₂O).

Kết quả sàng lọc trên 102 mẫu mô của bệnh nhân ung thư vú cho thấy có 1/102 mẫu (chiếm 0,98%) có biến đổi C8417T và 101/102 mẫu bệnh không có biến đổi tại vị trí 8417 (chiếm 99,02%). Kết quả sàng lọc trên 26 mẫu máu đối chứng cho thấy tất cả các mẫu máu đối chứng đều không có biến đổi C8417T.

3.4. Mất đoạn 9 bp thuộc vùng không mã hóa của ADN ty thể trong các mẫu nghiên cứu

Kết quả điện di sản phẩm cắt bằng enzyme *DdeI* cho thấy ngoài các băng ADN có kích thước ~ 125 bp và 108 bp theo đúng tính toán ban đầu, một số mẫu có xuất hiện thêm băng ADN có kích thước lạ khác. Các mẫu này được tinh sạch và tiến hành giải trình tự trực tiếp nhằm xác định biến đổi. Kết quả giải trình tự cho thấy ở các mẫu này có xuất hiện 1 mất đoạn nhỏ có kích thước 9 bp, có trình tự CCCCTCTA, nằm ở vị trí 8272 - 8280 trong vùng không mã hóa của ADN ty thể (giữa gen *MT-CO2* và *MT-TK*) (Hình 3). Mất đoạn 9 bp làm cho sản phẩm cắt có kích thước 125 bp trở thành sản phẩm chỉ có kích thước 116 bp (Giếng 6, Hình 2).



Hình 3. Kết quả giải trình tự xác định mất đoạn 9 bp (8272 - 8280)

A: Không có mất đoạn 9 bp. B: Có mất đoạn 9 bp.

Kết quả sàng lọc trên các mẫu nghiên cứu phát hiện thấy 27/102 trường hợp có mất đoạn 9 bp ở mô u của bệnh nhân ung thư vú (chiếm 26,5%) và 7/26 trường hợp có mất đoạn 9 bp (chiếm 27%) ở máu đối chứng. Phân tích tần suất xuất hiện của mất đoạn 9 bp này theo các đặc điểm bệnh học của ung thư vú cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo mức độ biệt hóa (rõ, vừa và kém) của khối u, kích thước hạch (N_0 so với N_{1-2}), số hạch (< 10 hạch và ≥ 10 hạch) và giai đoạn T (T_{1-2} và T_{3-4}) ($p > 0,05$). Tuy nhiên, mất đoạn này lại thấy cao hơn có ý nghĩa thống kê ở độ tuổi ≥ 50 (21/62 trường hợp, chiếm 33,9%) so với độ tuổi < 50 (6/32 trường hợp, chiếm 18,8%) (dữ liệu không được báo cáo).

4. Bàn luận

Vai trò của ADN ty thể liên quan với quá trình phát sinh ung thư đã được báo cáo rất sớm từ những năm 1920 khi Otto Warburg phát hiện thấy các tế bào ung thư cần sử dụng nhiều năng lượng ATP cho tăng sinh nhanh chóng thông qua tổng hợp bằng con đường đường phân (glycolysis) nhiều hơn, thay vì sử dụng phosphoryl hóa oxy hóa (OXPHOS) ở ty thể [7]. Điều này cho thấy chức năng của OXPHOS và ADN ty thể có thể bị biến đổi trong các tế bào ung thư [8].

Gen *MT-ATP8* mã hóa cho tiểu đơn vị A6L của phức hệ ATP synthase, enzyme chịu trách nhiệm chính trong tổng hợp ATP của tế bào, do đó các biến đổi của gen *MT-ATP8* có thể ảnh hưởng đến chức năng tổng hợp ATP và có thể gây bệnh [9]. Ví dụ như đột biến G8529A nằm ở vùng gối lên nhau giữa 2 gen *MT-ATP6* và *MT-ATP8* trên ADN ty thể đã được báo cáo trước đây. Mặc dù đột biến này không làm thay đổi trình tự axit amin của phân tử protein α do gen *MT-ATP6* mã hóa nhưng lại tạo ra một bộ ba kết thúc sớm trong vùng bảo thủ của gen *MT-ATP8* (W55X). Do đó, biến đổi này dẫn đến việc lắp ráp không chính xác và làm giảm hoạt tính của holoenzyme phức hệ V [10]. Một đột biến khác, T8528C, cũng được cho là đột

biến gây bệnh vì nó dẫn đến sự thay thế axit amin tryptophan (có tính kỵ nước, bảo thủ cao) thành arginine (có tính kiềm cao) thuộc tiểu đơn vị A6L do gen *MT-ATP8* mã hóa và thay đổi mã bộ ba mở đầu dịch mã trong gen *MT-ATP6* làm thay thế methionine thành threonine trong tiểu đơn vị α của phức hệ V. Do đó, biến đổi này có thể ảnh hưởng đến cả 2 tiểu đơn vị của phức hệ V ty thể [11].

Biến đổi của gen *MT-ATP8* đã được báo cáo trong một số loại ung thư như C8414T (L17F), A8459G (N32D) và C8472T (P36L) trong ung thư buồng trứng [12], [13], C8468T và C8472T (P36L) trong ung thư tuyến giáp [1],[15], C8395T và C8515T trong ung thư tuyến cận giáp [16] (Bảng 3)... Trong các nghiên cứu này, đa số các biến đổi của gen *MT-ATP8* xuất hiện với tần suất thấp và không làm thay đổi trình tự axit amin của phân tử protein. Trên đối tượng bệnh nhân ung thư vú, dữ liệu ban đầu về biến đổi của gen *MT-ATP8* thu được rất khác biệt trên các nhóm bệnh nhân khác nhau. Chintha và cộng sự (cs) (2013) sàng lọc biến đổi của các gen OXPHOS trên 180 mẫu bao gồm mẫu mô và mẫu máu của bệnh nhân ung thư vú, mẫu mô u và mô lành liền kề của bệnh nhân mắc u vú lành tính và u nang, tuy nhiên không phát hiện được biến đổi nào thuộc gen *MT-ATP8* [17]. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Tan và cs năm 2002 [18]. Tipirisetti và cs (2013) phát hiện thấy biến đổi T8426C (F21L) xảy ra ở vị trí bảo thủ của phân tử protein và được dự đoán là đột biến có hại bằng chương trình PolyPhen-2 [19]. Nghiên cứu gần đây của Grzybowska-Szatowska và cs (2014) đã phát hiện thấy 05 biến đổi của gen *MT-ATP8* trong 10/50 cặp mẫu mô u và mô liền kề của bệnh nhân ung thư vú, bao gồm: 1 biến đổi đa hình G8557A và 4 đột biến C8429A, A8439C, T8448C và G8519A. Đa số các biến đổi đều ở dạng đồng tế bào chất (trừ C8429A) và gây ra sự thay đổi axit amin của phân tử protein. Trong số đó, biến đổi A8439C chưa từng được báo cáo trước đây và được cho là có ảnh hưởng đến chức năng của *MT-ATP8* [4]. Tương tự, Ghaffarpour và cs (2014) phân tích trên 49 cặp mẫu mô u và mô liền kề của bệnh

nhân ung thư vú cũng phát hiện thấy 5 biến đổi của gen *MT-ATP8* trong 4/49 trường hợp (chiếm 8,16%). Trừ 2 biến đổi T8542C và G8557A, 3 biến đổi làm thay đổi trình tự axit amin A8384G (T7A), T8567C (S68P) và G8572A (G69S) đều được cho là có tác động đến phân tử protein [20]. Nghiên cứu trên 30 bệnh nhân ung thư vú người Mizoram, Ấn Độ và nhóm đối chứng, Thapa và cs (2016) đã tìm thấy 1 đột biến C8414T (L17F) của gen *MT-ATP8* trong các mẫu nghiên cứu. Đột biến này nằm ở vị trí bảo thủ và làm thay đổi trình tự axit amin từ leucine thành phenylalanine, do đó được dự đoán là có ảnh hưởng đến phân tử *MT-ATP8*. Trong nghiên cứu của chúng tôi, biến đổi của gen *MT-ATP8* được sàng lọc bằng giải trình tự trực tiếp trên 35 mẫu mô của bệnh nhân ung thư vú và 26 mẫu máu đối chứng. Tần suất biến đổi thấp của gen *MT-ATP8* cũng tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước đây. Kết quả đã xác định được 5 biến đổi, trong đó có 2 biến đổi chỉ thấy xuất hiện ở mẫu mô của bệnh nhân (C8410T và C8417T), 1 biến đổi chỉ xuất hiện ở nhóm đối chứng (A8440G) và 2 biến đổi xuất hiện đồng thời ở cả mẫu mô của bệnh nhân và mẫu máu đối chứng (C8414T và T8473C). Trừ biến đổi C8414T, các biến đổi còn lại chưa thấy được công bố trước đây trong các nghiên cứu trên đối tượng bệnh nhân ung thư vú [6]. Đặc biệt, có 2/5 biến đổi (C8414T và C8417T) làm thay đổi trình tự axit amin từ leucine thành phenylalanine ở vị trí bảo thủ của phân tử protein A6L và được dự đoán là có tác động đến phân tử protein tương ứng. Trong đó, biến đổi C8417T chỉ được phát hiện thấy trong 1/102 mẫu mô của bệnh nhân ung thư vú mà không thấy có trong nhóm đối chứng, do đó biến đổi này có thể có mối liên quan đến bệnh. Trong nghiên cứu trước đây của Perucca-Lostanlen và cs (2000), biến đổi đồng tế bào chất A8381G (T6A) nằm ở vị trí bảo thủ cao của gen *MT-ATP8* cũng được tìm thấy trong mẫu mô của bệnh nhân và không xuất hiện trong nhóm đối chứng. Biến đổi này được cho là có thể ảnh hưởng đến độ ổn định và hoạt động của phức hệ tổng hợp ATP, dẫn đến giảm sản xuất ATP và có thể gây bệnh [21]. Tương

tự, Mkaouar-Rebai và cs (2010) cũng phát hiện thấy biến đổi A8411G (M16V) ở vị trí bảo thủ của gen *MT-ATP8* chỉ xuất hiện ở mẫu bệnh và không xuất hiện trong nhóm đối chứng. Biến

đổi này có thể gây ra sự rối loạn chức năng tổng hợp ATP do có tác động đến phân tử *MT-ATP8* và do đó có thể liên quan đến bệnh [9].

Bảng 3. Một số biến đổi của gen *MT-ATP8* đã được báo cáo trong các loại ung thư

TT	Loại ung thư	Vị trí	Biến đổi	Thay đổi axit amin	Tài liệu
1	Ung thư buồng trứng	8392	G → A	Không	[13]
		8410	C → T	Không	[12]
		8414	C → T	L17F	[13]
		8459	A → G	N32D	[13]
		8472	C → T	P36L	[12]
		8473	T → C	Không	[13]
2	Ung thư tuyến giáp	8468	C → T	Không	[15]
		8472	C → T	P36L	[14]
3	Ung thư tuyến cận giáp	8395	C → T	Không	[16]
		8515	C → T	Không	[16]
4	Ung thư vú	8384	A → G	T7A	[20]
		8414	C → T	L17F	[6]
		8426	T → C	F21L	[19]
		8542	T → C	Không	[20]
		8557	G → A	Không	[20]
		8567	T → C	S68P	[20]
		8572	G → A	G69S	[20]

Trong nghiên cứu này, ngoài biến đổi của gen *MT-ATP8*, kết quả phân tích PCR-RFLP còn phát hiện thấy 27/102 trường hợp bệnh nhân (chiếm 26,5%) có mất đoạn 9 bp ở vùng không mã hóa của ADN ty thể. Mất đoạn 9 bp làm mất đi một trình tự lặp CCCCTCTA ở vùng giữa gen *MT-CO2* và *MT-TK* là một trong những đa hình ADN ty thể được nghiên cứu nhiều nhất và đã được báo cáo có liên quan đến một số dạng ung thư như ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư buồng trứng, [22][24][13]... Jin và cs (2012) phát hiện thấy tần suất mất đoạn 9 bp có sự khác biệt giữa nhóm bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan và nhóm đối chứng, trong đó mất đoạn 9 bp có khả năng làm tăng nguy cơ mắc ung thư với OR = 1,48; 95% CI: 1,03-2,14; p = 0,027 [23]. Tương tự, theo nghiên cứu của Ren và cs (2015), mất đoạn 9 bp có tần suất cao ở nhóm bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan (304/390 trường hợp) và tần suất thấp hơn ở nhóm đối chứng (86/431 trường hợp). Mất đoạn

này cũng được cho là phổ biến đối với các quần thể ở Châu Á và có thể gây ra sự thay đổi nhiệt động học đối với phân tử tARN^{Lys} và do đó có vai trò quan trọng trong phát sinh bệnh [24]. Trong nghiên cứu của Bai và cs (2014), mất đoạn 9 bp được cho là có mối liên quan với sự phát triển của bệnh ung thư biểu mô tế bào thận khi tiến hành phân tích đa biến (OR = 1,599; 95% CI: 1,365-1,872; p < 0,001). Do đó, mất đoạn này có thể được sử dụng như một chỉ thị tiên lượng độc lập đối với bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào thận. Bên cạnh đó, khi phân tích mối liên quan với các đặc điểm bệnh học của bệnh, kết quả cho thấy có mối liên quan giữa độ tuổi, kích thước khối u và đặc điểm mô học với thời gian sống sót của bệnh nhân. Cụ thể, những bệnh nhân có mất đoạn 9 bp có thời gian sống sót thấp hơn so với những người không có mất đoạn này (p < 0,001). Lý giải cho điều này, nhóm tác giả cho rằng mất đoạn 9 bp có khả năng làm thay đổi biểu hiện gen ở vùng xuôi dòng hoặc ngược dòng, trong đó có một số gen

đóng vai trò quan trọng trong chuỗi hô hấp của ty thể như *MT-ATP8*, *MT-ATP6*, *MT-CO3* (cytochrome oxidase III) và *MT-CYB* (cytochrome b). Biểu hiện bất thường của các gen này có thể làm thay đổi chức năng phosphoryl hóa oxy hóa và mức độ stress oxy hóa của tế bào [22]. Trên đối tượng bệnh nhân ung thư vú, theo hiểu biết của chúng tôi, chưa có nghiên cứu nào tập trung phân tích mất đoạn 9 bp ở vùng không mã hóa giữa gen *MT-CO2* và *MT-TK*. Do đó, nghiên cứu này sẽ cung cấp dữ liệu ban đầu về tần suất của biến đổi này trên nhóm bệnh nhân ung thư vú người Việt Nam. Theo đó, mất đoạn 9 bp được phát hiện thấy trong 26,5% bệnh nhân mắc ung thư vú (27/102 trường hợp) và 27% của nhóm đối chứng (7/26 trường hợp). Tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tần suất của mất đoạn này trong nhóm bệnh nhân so với đối chứng. Mặc dù vậy, phân tích theo các đặc điểm bệnh học cho thấy mất đoạn 9 bp cao hơn có ý nghĩa thống kê ở độ tuổi ≥ 50 (21/62 trường hợp, chiếm 33,9%) so với độ tuổi < 50 (6/32 trường hợp, chiếm 18,8%). Điều này có thể được giải thích là các mất đoạn có thể được tích lũy theo thời gian và ở các mô sau nguyên phân với tỉ lệ khác nhau [25]. Do đó, mất đoạn 9 bp được cho là không có mối liên quan với nhóm bệnh nhân ung thư vú người Việt Nam.

5. Kết luận

Như vậy, bằng phương pháp PCR - giải trình tự trực tiếp kết hợp với PCR-RFLP đã xác định được 5 biến đổi của gen *MT-ATP8* trên 35 mẫu mô u của bệnh nhân ung thư vú và 26 mẫu máu của người bình thường. Trong đó, đột biến C8417T ở vị trí bảo thủ của gen *MT-ATP8* là biến đổi hiếm gặp (tần suất 0,98%, 1/102 mẫu) và lần đầu tiên được xác định thấy trong một nhóm bệnh nhân ung thư vú người Việt Nam. Bên cạnh đó, mất đoạn 9 bp trong vùng không mã hóa của ADN ty thể có tần suất 26,5% ở mẫu mô và 27% ở mẫu máu được cho là không có mối liên quan với nhóm bệnh nhân này.

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] 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.
- [2] Wang X, The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes Dev* (2001), 15(22):2922-33.
- [3] Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ, Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology, *J Inher Metab Dis* (2012), 35(2):211-25.
- [4] Grzybowska-Szatkowska 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] Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR, A method and server for predicting damaging missense mutations, *Nat Methods* (2010), 7(4):248-9.
- [6] 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.
- [7] Warburg O, On the origin of cancer cells, *Science* (1956), 123:309-14.
- [8] Dumas JF, Rousse D, Servais S, Mitochondria and cancer, *Cellular Bioenergetics in Health and Diseases: New Perspectives in Mitochondrial Biology* (2012), 115-47.
- [9] Mkaouar-Rebai E, Kammoun F, Chamkha I, Kammoun N, Hsairi I, Triki C, Fakhfakh F, A de novo mutation in the adenosine triphosphatase (ATPase) 8 gene in a patient with mitochondrial disorder, *J Child Neurol* (2010), 25(6):770-5.
- [10] Jonckheere AI, Hogeveen M, Nijtmans LG et al., A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy, *J Med Genet* (2008), 45:129-33.

- [11] Ware SM, El-Hassan N, Kahler SG et al., Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes, *J Med Genet* (2009), 46:308-14.
- [12] Liu VW, Shi HH, Cheung AN, Chiu PM, Leung TW, Nagley P, Wong LC, Ngan HY, High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas, *Cancer Res* (2001), 61(16):5998-6001.
- [13] Zhuo G, Feng G, Leng J, et al., A 9-bp deletion homoplasmy in women with polycystic ovary syndrome revealed by mitochondrial genome-mutation screen, *Biochem Genet* (2010), 48:157-163.
- [14] Abu-Amro KK, Alzahrani AS, Zou M, Shi Y, Association of mitochondrial DNA transversion mutations with familial medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome, *Oncogene* (2006), 25:677-84.
- [15] Bonora E, Porcelli AM, Gasparre G, et al., Defective oxidative phosphorylation in thyroid oncocytic carcinoma is associated with pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting complexes I and III, *Cancer Res* (2006), 66:6087-96.
- [16] Costa-Guda J, Tokura T, Roth SI, Arnold A, Mitochondrial DNA mutations in oxyphilic and chief cell parathyroid adenomas, *BMC Endocr Disord* (2007); 7:8.
- [17] Chintha R, Kaipa PR, Sekhar N, Hasan Q, Mitochondria and tumors: A new perspective, *Indian J Cancer* (2013), 50(3).
- [18] Tan DJ, Bai RK, Wong LJ, Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer, *Cancer Res* (2002), 62(4):972-6.
- [19] Tipiriseti NR, Lakshmi RK, Govatati S, Govatati S, Vuree S, Singh L, Raghunadha Rao D, Bhanoori M, Vishnupriya S, Mitochondrial genome variations in advanced stage breast cancer: a case-control study, *Mitochondrion* (2013), 13(4):372-8.
- [20] 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.
- [21] Perucca-Lostanlen D, Narbonne H, Hernandez JB, et al., Mitochondrial DNA variations in patients with maternally inherited diabetes and deafness syndrome, *Biochem Biophys Res Commun* (2000), 277(3):771-5.
- [22] Bai Y, Guo Z, Xu J, Zhang J, Cui L, Zhang H, Zhang S, The 9-bp deletion at position 8272 in region V of mitochondrial DNA is associated with renal cell carcinoma outcome, *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal* (2014), 27(3):1973-5.
- [23] Jin Y, Yu Q, Zhou D, Chen L, Huang X, Xu G, Huang J, Gao X, Gao Y, Shen L, The mitochondrial DNA 9-bp deletion polymorphism is a risk factor for hepatocellular carcinoma in the Chinese population, *Genet Test Mol Biomarkers* (2012), 16(5):330-4.
- [24] Ren W, Li Y, Li R, Feng H, Wu S, Mao Y, Huang L, Mitochondrial intergenic COII/tRNA(Lys) 9-bp deletion, a biomarker for hepatocellular carcinoma? *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal* (2015), 27(4):2520-2.
- [25] Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N, A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues, *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992), 89(16):7370-4.

Alterations of the *MT-ATP8* Gene and 9-bp Deletion in Vietnamese Patients with Breast Cancer

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-ATP8* gene encodes for A6L protein subunit belonging to the proton channel of the ATP synthase. *MT-ATP8* gene's mutations can affect the structure and function of the ATP synthase, which may cause diseases. In this study, alterations of *MT-ATP8* gene were investigated in tumor tissues of patients with breast cancer and control blood samples using PCR combined with direct sequencing and PCR-RFLP methods, data were analyzed using bioinformatics tools and statistical methods. Sequencing results revealed 5 variants of *MT-ATP8* gene on 35 breast tumor tissues and 26 blood samples of controls, of which two mutations C8414T and C8417T altered the amino acid sequence of the resulting protein. The C8417T was further screened by PCR-RFLP and was found in 0,98% (1/102) of breast tumor samples. This change lead to substitution of leucine to phenylalanine (L18F) in a highly conserved position of A6L and was predicted as probably damaging to the structure and function of the protein. Additionally, a 9 bp deletion was also observed in a non-coding region of mtDNA in 26,5% (27/102) of breast cancer patients and 27% (7/26) of controls. Thus, these results showed that C8417T variant in the conserved position of *MT-ATP8* gene was rare and first identified in a group of breast cancer patients in Vietnam.

Keywords: Breast cancer, mitochondrial DNA, MT-ATP8.