

MỘT SỐ BIẾN ĐỔI THUỘC VÙNG D-LOOP CỦA ADN TY THỂ Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG

Phạm Thị Bích¹, Phạm Hoàng Khánh¹, Lương Thị Huyền¹, Đỗ Minh Hà¹
Phạm Kim Bình², Tạ Văn Tờ³, Trịnh Hồng Thái^{1*}

TÓM TẮT: Vùng D-Loop (Displacement loop) thuộc ADN ty thể là vùng không mã hóa gồm 2 vùng siêu biến HVI (hypervariable region 1) và HVII (hypervariable region 2). Hầu hết các biến đổi ADN trong vùng D-Loop là biến đổi đa hình, một số là đột biến soma có liên quan tới một số loại bệnh, đặc biệt là các bệnh về cơ thần kinh và ung thư, trong đó có ung thư đại trực tràng. Mục tiêu nghiên cứu này nhằm xác định một số biến đổi ADN ty thể ở vùng D-Loop của một nhóm bệnh nhân ung thư đại trực tràng ở Việt Nam và đánh giá mối liên quan của những biến đổi xác định được với bệnh. Sử dụng phương pháp PCR-RFLP kết hợp giải trình tự trực tiếp ADN nhằm xác định các biến đổi A188G, G203A và G16390A, chúng tôi đã xác định được 7/98 (7,2%) trường hợp có biến đổi G16390A trên ADN ty thể của mẫu mô ung thư đại trực tràng, 2/29 (6,9%) trường hợp có biến đổi G16390A trên ADN ty thể của mẫu máu đối chứng. Không tìm thấy biến đổi tại vị trí 188 và 203 trong vùng HVII của ADN ty thể ở các mẫu mô ung thư đại trực tràng. Kết quả giải trình tự trực tiếp các mẫu có biến đổi G16390A và một số mẫu khác đã phát hiện thêm các dạng biến đổi khác nhau: T16304C, A16309G, T16519C, A73G, T146C, A263G... trên ADN ty thể ở mẫu mô của bệnh nhân ung thư trực tràng. Tuy nhiên, chúng tôi chưa tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ biến đổi G16390A trên hai nhóm đối tượng mẫu mô ung thư và mẫu máu đối chứng, giữa mô u và lân cận u của bệnh nhân ung thư đại trực tràng đồng thời cũng chưa thấy có mối liên quan giữa biến đổi G16390A với các đặc điểm lâm sàng như tuổi, giới tính, vị trí khối u và giai đoạn TNM ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng ($p>0.05$).

Từ khóa: biến đổi G16390A, D-Loop, ADN ty thể, Ung thư đại trực tràng

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, ung thư đại trực tràng (UTĐTT) là một trong những loại ung thư phổ biến nhất trên thế giới, chiếm tỉ lệ cao thứ 3 trong các trường hợp ung thư. Tại Việt Nam UTĐTT xếp thứ 4 ở nam giới, xếp thứ 5 ở nữ giới về tỷ lệ mắc mới và tử vong và căn bệnh này đang có xu hướng trẻ hóa [13]. Trong những năm gần đây các nghiên cứu về đột biến ADN ty thể và

mối liên quan giữa các đột biến này với bệnh ung thư, trong đó có UTĐTT đang được quan tâm. Ở người, ADN ty thể chứa 16569bp chia thành 2 vùng: Vùng điều khiển (vùng D-Loop là vùng không mã hóa) và vùng phiên mã. Vùng D-Loop gồm vùng siêu biến HV I (hypervariable region I) và HV II (hypervariable region II), nằm ở vị trí nucleotide 16024-16569 và 1-576, tương ứng (Anderson và cs, 1981). Vùng D-Loop là vùng có chứa các trình tự nhận biết để khởi đầu và điều khiển quá trình phiên mã. Trên vùng HV II có trình tự đặc trưng cho các protein bám vào để khởi động quá trình sao mã như: CSBI, mtTFA, CSBII, CSBIII... Ở vùng HVI có vùng trình tự nhận biết TAS (Termination Associated Sequence) đóng vai trò dừng hoạt động phiên mã (Corts và cs, 1993)

¹ Trường đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Bệnh viện Việt Đức

³ Bệnh viện K, Hà Nội

* Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Trịnh Hồng Thái

Email: thaith@vnu.edu.vn

Ngày nhận bài: 5/2/2015

Ngày nhận bài phản biện: 12/2/2015

Ngày chấp nhận đăng: 8/3/2015

[6]. D-Loop là vùng có sự đa hình cao và được coi là điểm nóng xảy ra đột biến, đặc biệt các biến đổi A188G, G203A và G16390A đã được nghiên cứu trên một số loại ung thư như ung thư vú, ung thư buồng trứng (Bai và cs, 2007., Bragoszewski và cs, 2008) [3], [4]. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu một số biến đổi thuộc vùng D-Loop của ADN ty thể ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng nhằm mục tiêu tìm những biến đổi trên vùng D-Loop, bước đầu đánh giá mối liên quan của một số biến đổi xác định được với bệnh UTĐTT trên một nhóm bệnh nhân UTĐTT tại Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu sẽ cung cấp thêm các dữ liệu phân tử về các biến đổi thuộc vùng D-Loop và vai trò của các biến đổi tìm được trên bệnh nhân UTĐTT ở Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

98 cặp mẫu mô (mô u và mô lân cận u - lấy cách khối u khoảng 5-10 cm) của bệnh nhân UTĐTT do Khoa Tế bào - Giải phẫu bệnh, Bệnh viện K và Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Việt Đức, Hà Nội cung cấp, 29 mẫu máu của người bình thường khỏe mạnh được lấy tại Khoa sàng lọc máu của Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số từ mẫu mô của bệnh nhân UTĐTT và mẫu máu của người bình thường được tách chiết bằng kit QIAamp ADN Mini Kit (QIAGEN, Đức) và GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Mỹ), tương ứng. Các bước tiến hành theo đúng quy trình của nhà sản xuất. ADN sau khi tách chiết được bảo quản ở -20°C.

Phương pháp PCR- RFLP

Sử dụng phương pháp PCR-RFLP với 3 cặp mồi và enzym cắt giới hạn phù hợp để sàng lọc các biến đổi tại các vị trí quan tâm trên vùng D-Loop như A188G, G203A và G16390A. Các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu gồm: cặp mồi 188, 203, 16390 được thiết kế bằng chương trình Primer 3, do hãng Macrogen (Hàn Quốc) tổng hợp.

Trình tự các cặp mồi: Cặp mồi 188 gồm mồi xuôi 5'-TAC GTT CAA TAT TAC AG CCG-3' (188-f), mồi ngược 5'-GGT GTT AGG GTT GTT TGT TT-3' (188-r); cặp mồi 203 gồm mồi xuôi 5'-CAG GCG AAC ATA CTT ACT TAA-3' (203-f), mồi ngược chính là 188-r; cặp mồi 16390 gồm mồi xuôi 5'-CCC TCA ACT ATC ACA CAT CAA C-3' (16390-f), mồi ngược 5'- ATG TCG GAT ACA GTT CAC TTT AG-3' (16390-r).

Thành phần PCR bao gồm: 6,25 µl Maxima Hot Start PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific, Mỹ); 0,2 µl mồi thuộc mỗi loại gồm mồi xuôi và mồi ngược (10 µM); 12,5-31ng ADN khuôn, sau đó bổ sung H₂O đến 12,5 µl.

Chu trình nhiệt như sau: sau khi biến tính ở 95°C trong 4 phút, khuếch đại 35 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 30 giây, kết thúc bằng kéo dài chuỗi ở 72°C trong 5 phút. Nhiệt độ bắt mồi là 52°C trong 30 giây đối với cặp mồi 188 và 203, 54°C trong 30 giây đối với cặp mồi 16390. Sản phẩm PCR của các cặp mồi trên với kích thước lần lượt là 211bp, 197bp và 280bp được cắt bằng enzym giới hạn FastDigest (Fermentas), trình tự nhận biết của enzym được nêu trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự nhận biết và sản phẩm sau khi cắt của các enzym cắt giới hạn

Enzym	Vị trí nhận biết	Mục đích
<i>MspI</i>	5'...C↓CGG...3' 3'...GGC↑C...5'	Phát hiện biến đổi tại vị trí 188: Biến đổi (188G): Có vị trí cắt tạo ra 2 băng 193bp và 18bp Không biến đổi (188A): Không có vị trí cắt tạo ra băng 211bp
<i>AflII</i>	5'...C↓TTAAG...3' 3'...GAATT↑C...5'	Phát hiện biến đổi tại vị trí 203: Biến đổi (203A): Không có vị trí cắt tạo ra băng 197 Không biến đổi (203G): Có vị trí cắt tạo ra băng 180bp và 17bp
<i>Avall</i>	5'...G↓GWCC...3' 3'...CCWG↑G...5' (W: A hoặc T)	Phát hiện biến đổi tại vị trí 16390: Biến đổi (16390 A): Không có vị trí cắt tạo ra băng 280bp Không biến đổi (16390G): Có vị trí cắt tạo ra băng 170bp và 110bp

Thành phần của phản ứng cắt bằng enzym gồm: 17 µl H₂O loại ion, vô trùng; 2 µl đệm 10X FastDigest; 10 µl sản phẩm PCR (~0,2 µg); 1 µl enzym giới hạn tương ứng. Sản phẩm PCR- RFLP được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide 10% và nhuộm Ethidium Bromide.

Phương pháp giải trình tự trực tiếp

Để khẳng định kết quả PCR- RFLP và phát hiện các biến đổi khác thuộc vùng D-Loop, chúng tôi sử dụng cặp mồi 15973. Cặp mồi 15973 khuếch đại đoạn ADN có kích thước 975bp chứa phần lớn vùng D-Loop của ADN ty thể. Sau đó, sản phẩm PCR của cặp mồi 15973 được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp. Trình tự cặp mồi 15973 gồm: mồi xuôi 5'-AAC TCC ACC ATT AGC ACC-3', mồi ngược: sử dụng mồi 188-r. Thành phần PCR và chu trình nhiệt tương tự như trên với nhiệt độ bắt

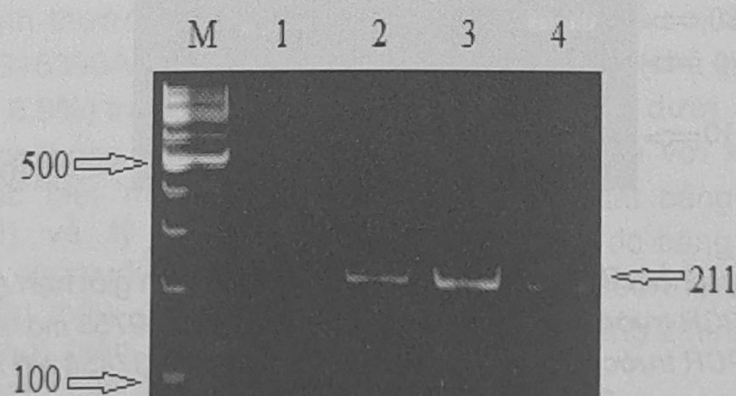
mồi là 55°C trong 30 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 60 giây.

Phân tích thống kê: Sử dụng kiểm định χ^2 với mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$ để so sánh tỷ lệ biến đổi ở những vị trí khảo sát được trên vùng D-Loop với các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân UTĐTT.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân tích PCR- RFLP của ADN ty thể chứa vị trí 188, 203 và 16390

Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu 188, 203 và 16390, chúng tôi đã khuếch đại thành công đoạn ADN thu được từ 98 cặp mẫu mô của bệnh nhân UTĐTT, kích thước sản phẩm PCR lần lượt là 211bp, 197bp và 280bp. Sản phẩm PCR được cắt bởi enzym *MspI* (cặp mồi 188), *AflII* (cặp mồi 203) và *Avall* (cặp mồi 16390). Kết quả phân tích được thể hiện ở hình 1-4.



Hình 1. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR, sản phẩm cắt bằng enzyme *MspI* của mồi 188

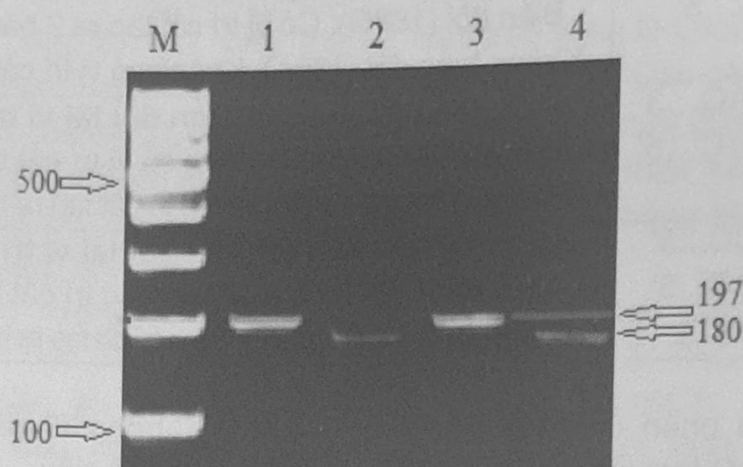
Giếng 1, 2: Sản phẩm PCR trước và sau cắt bằng enzyme của bệnh nhân 4644 mô lân cận u.

Giếng 3, 4: Sản phẩm PCR trước và sau cắt bằng enzym của bệnh nhân 4644 mô u.

Giếng M: thang chuẩn ADN 100bp.

Hình 1 cho thấy các mẫu được cắt bằng enzyme *MspI* đều thu được một băng duy nhất có kích thước bằng kích thước

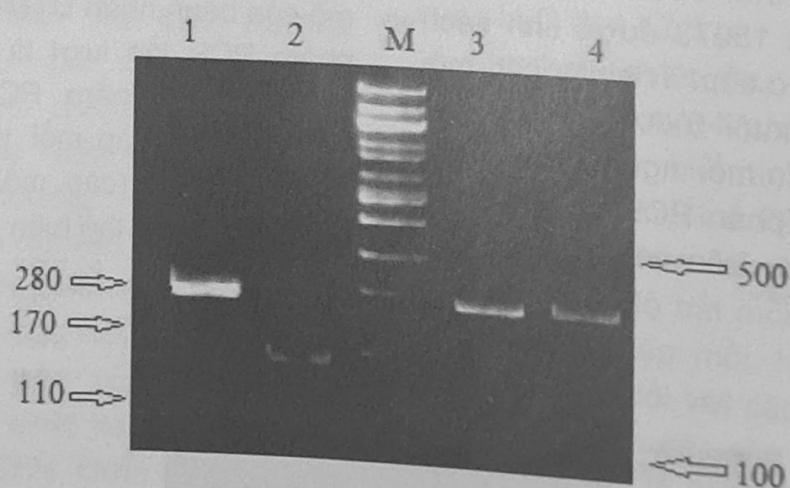
sản phẩm PCR, chứng tỏ tất cả các mẫu này không chứa biến đổi tại vị trí 188.



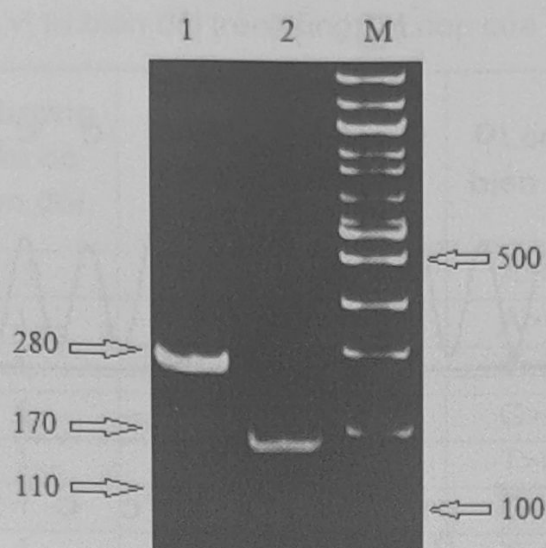
Hình 2. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR, sản phẩm cắt bằng enzyme *AflII* của mồi 203
 Giếng: 1, 2; Sản phẩm PCR trước và sau cắt bằng enzyme của bệnh nhân 41262 mô lân cận u.
 Giếng: 3, 4; Sản phẩm PCR trước và sau cắt bằng enzyme của bệnh nhân 41262 mô u.
 Giếng M: thang chuẩn ADN 100bp.

Trong hình 2, các mẫu được cắt bằng enzyme *AflII* đều thu được một băng có kích thước khoảng 180bp ở sản phẩm cắt chứng tỏ tất cả các mẫu này không chứa đột biến (băng có kích thước 17bp đã ra ngoài bản gel do kích thước quá nhỏ).

Chúng tôi đã thực hiện PCR- RFLP trên 98 bệnh nhân UTĐTT, tuy nhiên không phát hiện thấy biến đổi tại 2 vị trí 188, 203.



Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm PCR và sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn *AvaII* của mồi 16390
 Giếng 1, 2: Sản phẩm PCR trước và sau cắt bằng enzyme của mẫu 9753 mô lân cận u. Giếng: 3, 4:
 Sản phẩm PCR trước và sau cắt bằng enzyme của mẫu 37456 mô lân cận u.
 Giếng M: Thang chuẩn ADN 100bp



Hình 4. Ảnh điện di sản phẩm PCR và sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn Avall có phát hiện hiện tượng dị tế bào chất

Giếng 1, 2: Sản phẩm PCR trước và sau cắt bằng enzym mẫu 10282,
Giếng M: Thang ADN chuẩn 100bp

Thực hiện PCR và cắt bằng enzym Avall, chúng tôi đã xác định thấy có biến đổi G16390A ở 6/98 mẫu. Sản phẩm PCR của các mẫu này không bị cắt bởi enzym Avall (hình 3, giếng 4). Ngoài ra, sản phẩm PCR của 1 mẫu (mã số 10282) sau khi cắt enzyme thu được ba băng có kích thước lần lượt: 280bp, 170bp và 110bp, đó là mẫu có hiện tượng dị tế bào chất – hiện tượng bản sao mang đột biến và bản sao dạng đại cùng tồn tại trong tế bào (giếng 2 hình 4). Như vậy, trên 98 bệnh nhân UTĐTT có 7 trường hợp có chứa biến đổi G16390A (chiếm 7,2%).

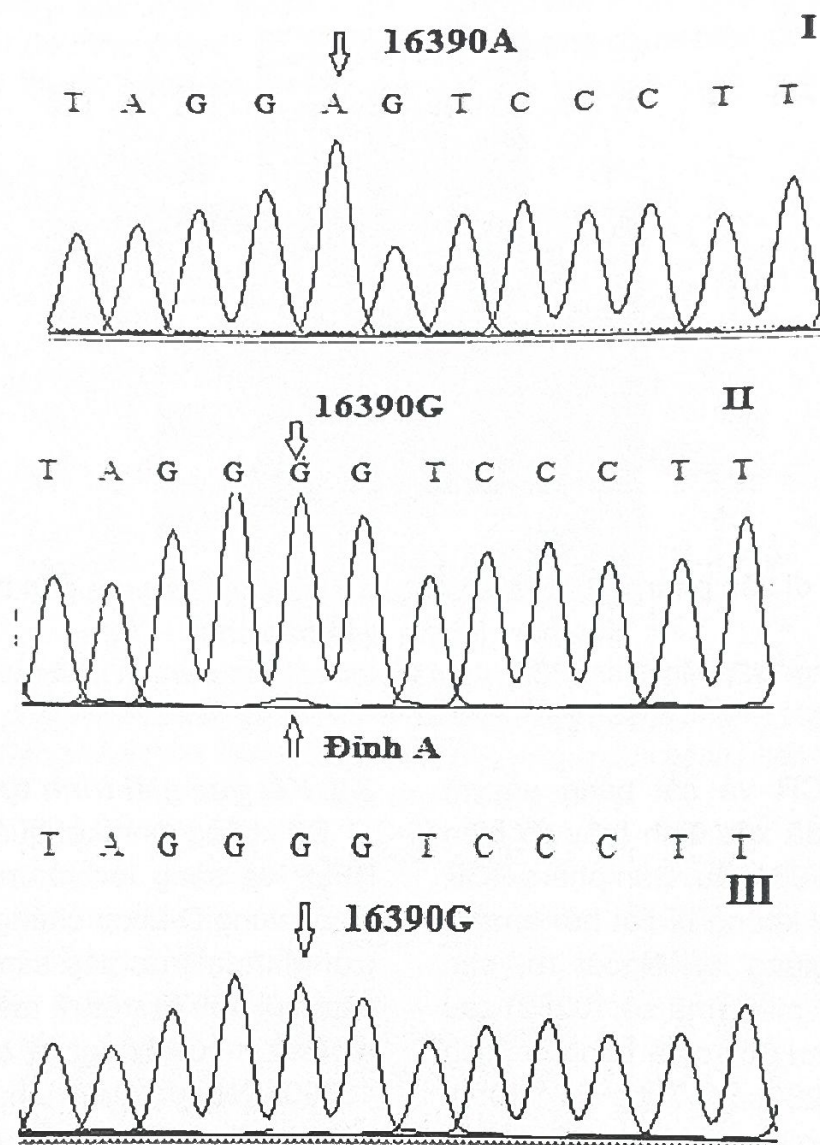
Tiến hành PCR-RFLP trên 29 mẫu máu của người bình thường với cặp mồi 16390, biến đổi G16390A đã được tìm thấy ở 2/29 (chiếm 6,9%) trường hợp.

Kết quả phân tích thống kê đã cho thấy không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p > 0.05$) về tỷ lệ biến đổi G16390A trên hai nhóm đối tượng mẫu mô ung thư và mẫu máu, giữa mô u và lân cận u. Đồng thời biến đổi G16390A không phụ thuộc vào các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân UTĐTT như tuổi, giới tính, vị trí khối u và giai đoạn TNM ($p > 0.05$).

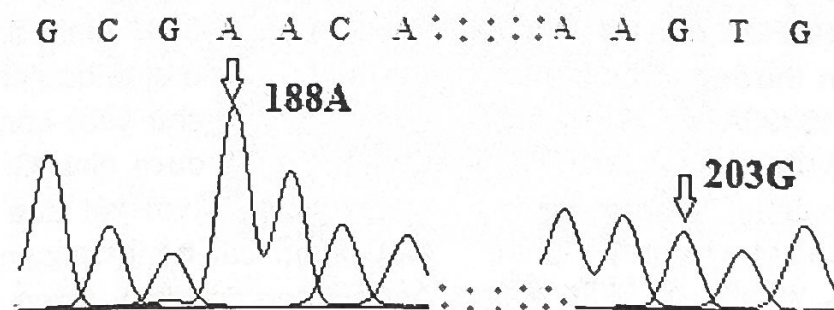
3.2. Kết quả giải trình tự trực tiếp

Để khẳng định kết quả phân tích PCR-RFLP và sàng lọc những biến đổi khác thuộc vùng D-Loop chúng tôi đã tiến hành giải trình tự trực tiếp sản phẩm PCR của cặp mồi 15973 trên 7 mẫu có biến đổi và một số mẫu không có biến đổi tại vị trí 16390. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự ADN chuẩn của ty thể người (mã số NC_012920).

Hình 5 thể hiện kết quả giải trình tự: mẫu có biến đổi G thành A (mẫu 37456, hình 5.I), mẫu dị tế bào chất (mẫu 10282, hình 5.II), mẫu không có biến đổi tại vị trí 16390 (mẫu 4374, hình 5.III). Riêng ở trường hợp mẫu dị tế bào chất (hình 5.II), ngoài đỉnh G (chủ yếu) còn có một đỉnh nhỏ A ở phía dưới đỉnh G. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả PCR-RFLP: sản phẩm cắt bằng enzym Avall cho 3 băng, trong đó băng tương ứng với dạng biến đổi 16390A là băng 280 bp thể hiện mờ nhạt (giếng 2 hình 4).



Hình 5: Trình tự đoạn ADN ty thể chứa vị trí 16390 của mẫu 37456 (I), mẫu 10282 (II) và mẫu 4374 (III)



Hình 6: Trình tự đoạn ADN ty thể chứa vị trí 188, 203 của mẫu 4374

Kết quả phân tích trình tự cũng không xác định thấy biến đổi tại vị trí 188 và 203 (hình 6). Như vậy kết quả giải trình tự đã khẳng định kết quả PCR-RFLP là hoàn toàn chính xác. Ngoài ra, khi phân tích kết

quả giải trình tự trực tiếp trên 11 mẫu chúng tôi còn phát hiện thấy những biến đổi tại các vị trí khác của vùng D_Loop ở bệnh nhân UTĐTT (bảng 2).

Bảng 2. Thống kê các vị trí biến đổi trên vùng D-Loop của bệnh nhân UTĐTT

Vị trí trên trình tự ADN ty thể	Loại biến đổi	Số lượng mẫu có biến đổi	Tần suất (%)	Vị trí trên trình tự ADN ty thể	Loại biến đổi	Số lượng mẫu có biến đổi	Tần suất (%)
73	A>G	11	100	263	A>G	11	100
101	G>C	1	9,1	282	A>C	1	9,1
103	G>T	1	9,1	320	T>C	1	9,1
125	T>C	1	9,1	16129	G>A	4	36,3
127	T>C	1	9,1	16192	T>C	1	9,1
128	C>T	1	9,1	16223	C>T	6	54,5
131	T>C	1	9,1	16304	T>C	2	18,2
146	T>C	1	9,1	16309	A>G	2	18,2
150	C>T	2	18,2	16519	T>C	3	27,3
152	T>C	1	9,1	16183	A>C	1	9,1
183	A>G	1	9,1	16189	T>C	3	27,3
199	T>C	2	18,2	16311	T>G	3	27,3

4. BÀN LUẬN

D-Loop được coi là điểm nóng xảy ra các đột biến và đa hình. Đã có nhiều nghiên cứu xác định được các biến đổi xảy ra trên vùng D-Loop trên các loại ung thư khác nhau. Theo số liệu tổng hợp của Chatterjee và cs (2006) [5] đã tập hợp từ các công bố về các biến đổi trên vùng D-Loop trên các loại ung thư như: Đối với ung thư vú vùng D310 thuộc vùng D-Loop của ADN ty thể được coi là điểm nóng xảy ra đột biến bao gồm các dạng đột biến mất, chèn (58%), đột biến lặp đoạn từ 303-315 (Parrella và cs, 2001) [8]. Đối với ung thư buồng trứng, trong công bố của Vincent và cs (2001) đã xác định được 3/15 (20%) đột biến thuộc vùng D-Loop [11]. Đặc biệt đối với bệnh ung thư gan, đột biến trong vùng D-Loop là một sự kiện thường xuyên. Theo Nomoto và cs (2002) có tới 13/19 (68%) bệnh nhân chứa ít nhất một đột biến thuộc vùng D-loop, đáng chú ý nhất là biến đổi tại vị trí G263A được tìm thấy trong tất cả các mẫu ADN ty thể [9]. Tần số các đột biến tương quan với mức độ ác tính của bệnh ung thư gan. Cũng đối với bệnh ung thư

gan, nghiên cứu của Tamori và cs (2004) đã chỉ ra rằng đột biến trong vùng D-Loop là đặc trưng cho ung thư gan vì vậy tìm hiểu các đột biến trong vùng này có thể giúp chẩn đoán bệnh ung thư gan [10].

Năm 2011 bằng phương pháp PCR-SSCP kết hợp với giải trình tự, Abdel và cs đã tiến hành xác định đột biến trên sáu vùng khác nhau của ADN ty thể trong các tổn thương tiền ung thư (dạng viêm loét đại tràng, polyp u tuyến) và ung thư đại trực tràng của nhóm bệnh nhân người Ai Cập [1]. Các biến đổi được phát hiện trong nghiên cứu này phần lớn đều thuộc vùng D-loop và chúng ở dạng đột biến soma, các đột biến này liên quan đến các tổn thương bao gồm viêm loét đại trực tràng, polyp u tuyến và ung thư đại trực tràng. Trong nghiên cứu của Duan và cs (2002) trên ung thư vú có 74% bệnh nhân được nghiên cứu có đột biến soma trong đó có tới 81 % là đột biến thuộc vùng D-Loop [7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc những biến đổi thuộc vùng D-Loop của ADN ty thể ở bệnh nhân UTĐTT người Việt Nam. Nhìn vào bảng 2

nhận thấy có rất nhiều biến đổi xảy ra trên vùng D-Loop. Theo dữ liệu công bố trên Mitomaps có những biến đổi đã được công bố (tại vị trí 73, 263... được tìm thấy ở bệnh u não, cơ thần kinh, ung thư tuyến giáp, ung thư vòm họng, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư gan...) có những biến đổi chưa được công bố (tại vị trí 101, 103...) và có những biến đổi xảy ra với tần xuất cao 100% tại các vị trí 73, 263; 54,5% ở vị trí 16223 [12]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự với một số quả đã được công bố trước đó về sự biến đổi tại vùng D-Loop. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi một lần nữa khẳng định vùng D-Loop là vùng tồn tại rất nhiều biến đổi.

Khi tìm hiểu về vai trò của những vị trí xảy ra biến đổi, chúng tôi nhận thấy rằng các biến đổi được phát hiện không nằm trong vùng trình tự bám của protein tạo nên phức hợp khởi đầu sao mã, tuy nhiên các biến đổi này thuộc vùng trình tự điều khiển sao chép (cis-element) của ty thể, vì vậy chúng có thể ảnh hưởng tới sự sao chép của ADN ty thể dẫn đến thay đổi số bản sao ADN ty thể trong tế bào. Ngoài ra, các biến đổi này còn thuộc vùng promoter, vì vậy có khả năng gây ảnh hưởng đến quá trình phiên mã của ty thể, do đó ảnh hưởng tới các quá trình tổng hợp các sản phẩm mà ADN ty thể mã hóa.

5. KẾT LUẬN

Sử dụng phương pháp PCR-RFLP kết hợp giải trình tự trực tiếp đã xác định thấy biến đổi G16390A với 7/98 (7,2%) trường hợp, trong đó có 1 trường hợp dị thể bào chất ở bệnh nhân UTĐTT và 2/29 (6,9%) trường hợp biến đổi trên mẫu máu của người bình thường. Không phát hiện được trường hợp nào có biến đổi tại vị trí 188 và 203. Không có sự khác biệt về tỷ lệ biến đổi G16390A trên hai nhóm đối tượng mẫu mô của bệnh nhân UTĐTT và mẫu máu của người bình thường, giữa mô u và lân cận u trên bệnh nhân ung thư đại trực tràng ($p > 0.05$). Biến đổi G16390A

không phụ thuộc vào các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân UTĐTT như tuổi, giới tính, vị trí khối u và giai đoạn TNM ($p > 0.05$). Ngoài ra, 24 biến đổi khác nhau cũng đã được tìm thấy thuộc vùng D-Loop của ADN ty thể ở bệnh nhân UTĐTT như T16304C, A16309G, T16519C, A73G, T146C, A263G,...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdel MK, Nadia EG, Marwa T, et al. (2011) Mutational Hotspots in the Mitochondrial D-Loop Region of Cancerous and Precancerous Colorectal Lesions in Egyptian Patients. *DNA Cell Biol* 30 (11): 899 - 906
2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 427 - 465
3. Bai RK, Leal SM, Covarrubias D, et al. (2007) Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. *Cancer Res* 67(10): 4687 - 4694
4. Bragoszewski P, Kupryjanczyk J, Bartnik E, et al. (2008) Limited clinical relevance of mitochondrial DNA mutation and gene expression analyses in ovarian cancer. *BMC cancer* 8(1), 292.
5. Chatterjee A, Mambo E and Sidransky D (2006) Mitochondrial DNA mutations in humancancer. *Oncogene* 25(34): 4663-4674.
6. Cort SM, Steven CG and William WH (1993) Protein Binding to a Single Termination-Associated Sequence in the Mitochondrial DNA D-Loop Region. *Mol Cell Biol* 13(4): 2162 - 2171
7. Duan JT, Ren KB and Lee JC (2002) Comprehensive Scanning of Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Breast Cancer. *Cancer Res* 62: 972 - 976.
8. Parrella P, Xiao Y, Fliss M, et al. (2001) Detection of Mitochondrial DNA Mutations in Primary Breast Cancer and Fine-Needle Aspirates. *Cancer Res* 61: 7623 - 7626.

9. Nomoto S, Sanchez-Cespedes M, Sidransky D (2002) Mitochondrial D-loop Mutations As Clonal Markers in Multicentric Hepatocellular Carcinoma and Plasma. *Clin Cancer Res* 8: 481 - 487.

10. Tamori A, Nishiguchi S, Nishikawa M, et al. (2004) Correlation between clinical characteristics and mitochondrial D-loop DNA mutations in hepatocellular carcinoma. *J Gastroentero*

39: 1063 - 1068.

11. Vincent WL, Hong HS, Anie NY et al. (2001) High Incidence of Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Human Ovarian Carcinomas. *Cancer Res* 61(2001): 5998 - 6001

12. <http://www.mitomap.org>

13. <http://www.globocan.iarc.fr/Default.aspx>

SUMMARY

SOME ALTERATIONS OF MITOCHONDRIAL DNA IN D-LOOP OF COLORECTAL CANCER PATIENTS

Pham Thi Bich¹, Pham Hoang Khanh¹, Luong Thi Huyen¹, Do Minh Ha¹,
Pham Kim Binh², Ta Van To³, Trinh Hong Thai¹

¹Hanoi University of Science, VNU, ²Viet Duc Hospital,

³Vietnam National Cancer Hospital

D-Loop of mitochondrial DNA is non-coding regions including two hypervariable regions HVI and HVII. Most of the D-Loop sequence alterations are polymorphic but there are some somatic mutations linked to some diseases, particularly the neuromuscular diseases and cancers including colorectal cancers.

This study aimed to identify some mitochondrial DNA sequence variations of D-Loop in a group of colorectal cancer patients in Vietnam and test the relationship between these variations and the disease. Using PCR-RFLP combining with DNA directly sequencing method in order to determine mutations of A188G, G203A and G16390A, we detected 7 out of 98 (7.2%) colorectal cancer tissue samples with G16390A alteration in the HVI region of mitochondrial DNA and 2 out of 29 (6.9%) blood samples of control people with this alteration. A188G and G203A alterations were not found in the HVII region of mitochondrial DNA in colorectal cancer tissue samples. DNA sequencing results of samples containing G16390A alteration and some other ones revealed different variations: T16304C, A16309G, T16519C, A73G, T146C, A263G... of mitochondrial DNA in colorectal cancer tissue samples. However, the rate of G16390A alteration is not significantly different between colorectal cancer and control groups (blood samples) ($p > 0.05$). G16390A alteration was not correlated with gender, age of patients, location (tumor tissues or adjacent tissues), site of tumor and TNM stage of colorectal cancer patients ($p > 0.05$).

Keywords: G16390A alteration, D - Loop, mitochondrial DNA, Colorectal cancer