

Ảnh hưởng của gen p16 và RASSF1A đến bệnh nhân ung thư gan

Effects of p16 and RASSF1A on hepatocellular carcinoma patients

Nguyễn Văn Hương*, Trần Thủy Tiên*,
Hồng Thị Khánh Ngân****, Lê Hữu Tùng***,
Nguyễn Chí Toàn**, Huỳnh Sinh Viên**,
Nguyễn Văn Tiến**, Bùi Văn Đức**,
Nguyễn Ngọc Hiếu**, Nguyễn Thị Minh Phương**

*Trường Đại học Nguyễn Tất Thành,
**Trường Đại học Duy Tân,
***Trường Đại học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh,
****Bệnh viện Bình Dân TP. HCM

Tóm tắt

Những thay đổi biểu sinh trong biểu hiện gen do quá trình methyl hóa đảo CpG là nguyên nhân chính gây bất hoạt gen p16. Tuy nhiên, gen RASSF1A và p16 có thể bị bất hoạt bởi quá trình methyl hóa. *Mục tiêu:* Phân tích các yếu tố tác động, tần số methyl hóa trong các mẫu mô gan ở những bệnh nhân ung thư gan. *Đối tượng và phương pháp:* Khảo sát độ tuổi, các yếu tố tác động đến ung thư gan và sự ảnh hưởng quá trình methyl hóa hai yếu tố RASSF1A và p16 trên bệnh nhân ung thư gan. *Kết quả:* Bệnh nhân mắc bệnh ung thư gan nằm trong độ tuổi từ 50 - 70, trong đó độ tuổi từ 60 - 70 chiếm tỷ lệ cao nhất 42% ($p < 0,05$) và nam giới có tỷ lệ mắc bệnh cao hơn so với nữ (nam: 74%, nữ: 26%, $p < 0,05$). Số người hút thuốc ở bệnh nhân HCC chiếm tỷ lệ từ 42,85 - 100% tùy theo độ tuổi và tỷ lệ người uống rượu ở bệnh nhân HCC tương đối thấp (16,67 - 19,05%) và chủ yếu tập trung ở độ tuổi từ 50 - 70. Tỷ lệ bệnh nhân ung thư gan dương tính với HBsAg chiếm từ 55,56 - 100% và tập trung ở 40 - 70 tuổi, Trong khi đó, tỷ lệ dương tính với anti HCV thấp (28,57 - 33,33%) và tập trung ở độ tuổi từ 50 - 70 tuổi. Tỷ lệ mẫu có p16 chiếm 44% trong đó bị methyl hóa ở bệnh nhân ung thư gan 63,64% và mô bình thường 36,36% với kích thước 93bp. Các mẫu chứa RASSF1A chiếm 58% trong đó RASSF1A bị methyl hóa ở bệnh nhân ung thư gan 60,35% và ở người bình thường 39,65% với kích thước 145bp. Quá trình methyl hóa của p16 và RASSF1A ở bệnh nhân trên 65 tuổi diễn ra nhiều hơn so với độ tuổi khác và sự phân bố của 2 locus này ở bệnh nhân dương tính với HCV cao hơn so với các đối tượng khảo sát khác. *Kết luận:* Quá trình methyl hóa gen RASSF1A và p16 có mối liên hệ mật thiết đến bệnh nhân ung thư gan và tùy thuộc vào độ tuổi và giới tính.

Từ khóa: Methyl hóa, p16, RASSF1A, ung thư gan.

Summary

Epigenetic changes in gene expression due to CpG island methylation are the main cause of p16 gene inactivation. Recently, it has been suggested that the RASSF1A and p16 genes can be inactivated by methylation. *Objective:* To analyze the

Ngày nhận bài: 30/5/2022, *ngày chấp nhận đăng:* 5/7/2022

Người phản hồi: Nguyễn Ngọc Hiếu, Email: ngochieu0707@gmail.com - Trường Đại học Duy Tân

impact factors and the methylation of tissue samples in liver cancer patients. *Subject and method:* Testing of age groups, factors affecting hepatocellular carcinoma and the influence of methylation of two factors RASSF1A and p16 on cancer patients. *Result:* Hepatocellular carcinoma patients were aged from 50 to 70 years old, the highest rate 42% ($p < 0.05$) in the age group from 60 to 70, and men had a higher incidence than women (male: 74%, female: 26%, $p < 0.05$). The number of smokers in HCC accounted for 42.85 - 100% depending on age and the rate of people who drink alcohol in HCC was relatively low (16.67 - 19.05%) and concentrated in the age group from 50 to 70. The rate of HbsAg-positive patients was 55.56 - 100% and concentrates on 40 - 70 years old. The positive rate for anti HCV was low (28.57 - 33.33%) and concentrates in the age group from 50 to 70 years old. The percentage of samples containing p16 accounted for 44%, including methylation 63.64% in liver cancer patients and 36.36% in normal people with size of 93bp. RASSF1A samples accounted for 58% of which methylation 60.35% in liver cancer patients and 39.65% in normal people with size of 145bp. Methylation of p16 and RASSF1A in patients over 65 years of age occurs more frequently than in other age groups, and the distribution of these 2 loci in HCV-positive patients is higher than others. *Conclusion:* Methylation of p16 and RASSF1A is strongly associated with hepatocellular carcinoma patients and is dependent on age and sex.

Keywords: Liver cancer, methylation, hepatocellular carcinoma, p16, RASSF1A.

1. Đặt vấn đề

Ung thư gan là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ hai trên toàn thế giới, với số ca tử vong cao. Nhiễm virus viêm gan B (HBV) mạn tính là yếu tố phổ biến nhất của bệnh ung thư gan và tiêm phòng vaccin được xem như một giải pháp làm giảm tỷ lệ ung thư gan trong cộng đồng. Mặc dù tầm soát ung thư gan cho phép chẩn đoán sớm ung thư gan nguyên phát và xét nghiệm tìm kháng nguyên bề mặt HBV (HBsAg), kết hợp xét nghiệm alpha-fetoprotein (AFP) huyết thanh và siêu âm để nhận biết khả năng nhiễm HBV [1].

Methyl hóa các gen trong ung thư gan cho phép xác định quá trình methyl hóa chỉ xuất hiện ở gan của người lớn tuổi, và phát triển qua các giai đoạn khác nhau khi nhiễm virus, trong đó nhiễm viêm gan C có thể đẩy nhanh quá trình methyl hóa và tạo ra chất sinh ung thư ở gan [2]. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về ung thư gan tập trung chủ yếu các vấn đề về dịch tễ ở một số địa phương, quá trình khám sàng lọc ung thư ở quy mô rộng, đặc biệt ưu tiên

sàng lọc các ung thư thường gặp, có khả năng điều trị hiệu quả và phát hiện bằng các phương tiện điều trị hiện đại [3].

Gen p16 hoạt động như một chất ức chế chu kỳ tế bào đặc hiệu G1; sự ức chế này mất đi nếu p16 bị bất hoạt, có thể dẫn đến chu kỳ và tăng trưởng tế bào bất thường [1]. Cơ chế chủ yếu để bất hoạt p16 trong các bệnh ung thư ở người là quá trình methyl hóa không bình thường đảo CpG kéo dài từ vùng promoter thành exon 1a và dẫn đến im lặng phiên mã [2]. Do đó, quá trình hypermethyl hóa của các gen hỗ trợ khối u có thể đóng một vai trò quan trọng trong quá trình hình thành ung thư gan. Gần đây, Dammann và cộng sự đã phát hiện đặc trưng gen Ras association family (RASSF) 1A [3]. Nó nằm trong locus 3p21.3 của nhiễm sắc thể, một vùng có thể có ức chế khối u [4]. RASSF1A thường xuyên bị bất hoạt trong ung thư phổi bằng cách tăng methyl hóa promoter và sự tái biểu hiện của RASSF1A trong tế bào ung thư phổi làm giảm sự hình thành khối u ở chuột [3]. Những kết quả này chỉ ra rằng

gen RASSF1A là gen ức chế khối u mục tiêu đối với bệnh ung thư ở người.

Một số mối liên hệ giữa ung thư gan với sự biểu hiện của p16 và RASSF1A chưa được đánh giá sâu về các cơ chế tác động và chưa tập trung nghiên cứu vào việc phát triển các xét nghiệm nhanh trong việc phát hiện mầm móng bệnh từ p16, RASSF1A dù các nghiên cứu trên thế giới đã đưa ra các mối liên hệ chắc chắn trước đó. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã đánh giá tổng thể về việc ảnh hưởng của p16 và RASSF1A ở bệnh nhân ung thư HCC nhằm cung cấp một cơ sở khoa học giúp các nhà nghiên cứu cũng như các nhà lâm sàng có thêm thông tin về nguyên nhân gây bệnh HCC, từ đó có thể giúp chẩn đoán tầm soát HCC sớm và xây dựng một phát đồ điều trị mới hiệu quả thông qua hai gen p16 và RASSF1A.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Các nghiên cứu được thực hiện trên 100 bệnh nhân ung thư gan từ ngày 01/11/2021 - 31/03/2022. Tất cả các bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu và được thông qua Hội đồng Y đức. 100 bệnh nhân được thực hiện các xét nghiệm sinh hóa thường quy kết hợp nhằm chẩn đoán ung thư, trong đó 50 bệnh nhân tiến hành phẫu thuật cắt gan và điều trị hồi phục sau phẫu thuật. Và 50 bệnh nhân được lấy mô gan bình thường dùng làm mẫu chứng cắt ở mẫu mô lành ở rìa tiếp xúc với tế bào ung thư.

2.2. Phương pháp

Tách DNA tinh khiết từ mẫu tế bào gan: Cắt nhỏ 20 mg mô gan vào tube 1,5ml. Thêm 180µl Buffer ATL, 20µl Proteinase K, trộn đều, ủ ở 56°C trong 3 giờ. Bổ sung 200µl Buffer AL, trộn đều trong 15 giây, ủ 70°C trong 10 phút, ly tâm nhẹ và thêm 200µl etanol 100%, vortex trong 15 giây sau đó ly tâm nhanh ống để loại bỏ dung

dịch trên nắp. Chuyển hỗn hợp qua cột QIAamp Mini Spin, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch. Rửa hỗn hợp DNA với 500 µl Buffer AW1, ly tâm 8000 vòng / phút trong 1 phút và 500µl Buffer AW2, ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút trong 3 phút, thu nhận DNA. Tinh sạch DNA trong 200µl Buffer AE, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút, bảo quản ở 4°C hoặc -20°C.

Nhận diện RASSF1A và p16 bằng phương pháp PCR: Cho 25µL cho một phản ứng PCR bao gồm 12,5µL HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 40 ng mẫu DNA và 0,2µmol/L của cặp mỗi p16 - p16INK4A (CDKN2A) Human qPCR Primer Pair (NM_058195):

5'-CTCGTGCTGATGCTACTGAGGA-3';

5'-GGTCGGCGCAGTTGGGCTCC-3' và

RASSF1A:

5'-

CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'.

5'-GTGTTAACGCGTTGCGTATC-3'.

Chu trình nhiệt có 35 chu kỳ bao gồm bước biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, 95°C trong 45 giây, 56°C trong 45 giây, 72°C trong 60 giây và 72°C trong 10 phút, với chúng âm là nước và chúng dương là p16 và RASSF1A. Tiến hành điện di các sản phẩm PCR trên gel agarose 2,5% có bổ sung ethidium bromide. Sau khi điện di, lấy gel đã chạy điện di cho vào máy đọc gel Dolphin - View. Lưu ảnh kết quả vào USB.

Biến tính DNA của tế bào gan: DNA được ủ với 1,2ml với dung dịch natri bisulfit 3,1M; hydroquinone 0,5mM, pH 5,0, ở 50°C trong 40 giờ trong dầu khoáng, sau đó ủ ở 4°C trong dung dịch chứa natri axetat 5mM/hydroquinone 0,5mM (pH 5,2), natri axetat 0,5mM (pH 5,2), nước khử ion, để loại bỏ bisulfit không phản ứng. Hỗn hợp được làm khô trong chân không và tiếp tục ủ trong 100ul của dung dịch Tris HCl 10mM, EDTA 0,1mM, pH 7,5. NaOH 0,3M và amoni axetat 3M, pH 7 lần lượt được thêm vào ở nhiệt độ

phòng, ủ trong 10 phút. Kết tủa DNA - bisulfit được bảo quản trong dung dịch chứa 100 g Tris HCl 10mM, 0,1mM EDTA, pH 7,5 ở -20°C.

Phân tích locus methyl hóa bằng xét nghiệm PCR: Tổng thể tích cho mỗi phản ứng PCR là 25 µL bao gồm 12,5 µL HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 40 ng mẫu DNA được xử lý bằng bisulfit và 0,2 µmol/L của cặp mỗi :

5'-

CTCCGAATTCATCAACAATAAACCAACCA-3' ;

5'-ATAATACTGCAGTTAA1TTAFGATTA-

3'.

Chu trình nhiệt có 40 chu kỳ bao gồm bước biến tính ban đầu ở 95°C trong 10 phút, 95°C trong 45 giây, 60°C trong 45 giây, 72°C trong 60 giây và 72°C trong 10 phút. Sau khi khuếch đại PCR, 10 µL sản phẩm khuếch đại được xử lý với enzym giới hạn để xác định mức độ metyl hóa tại mỗi vị trí. Tiến hành điện di các sản phẩm PCR trên gel agarose 2,5% có bổ sung ethidium bromide. Mỗi xét nghiệm đều thực hiện song song với một mẫu DNA đối chứng dương đã được xử lý bằng CpG methylase và đối chứng âm bao gồm DNA của tế bào lympho hoặc nguyên bào sợi. Sau khi điện di và lấy gel đã chạy điện di cho vào máy đọc gel Dolphin - View. Lưu ảnh kết quả vào USB.

2.2. Phân tích thống kê

Tất cả các phân tích thống kê đã được thực hiện bằng phần mềm SPSS. Khoảng tin cậy (CI) được tính toán ở mức 95%. Một mặt, các nhóm được so sánh bằng kiểm

định χ^2 -test, ở mặt khác khi so sánh tỷ lệ ta dùng Z-test. Các giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Độ tuổi và giới tính ảnh hưởng đến bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan

Tỷ lệ ung thư gan ở các nước đang phát triển ngày càng trẻ hóa do quá trình sinh hoạt, môi trường sống ngày càng ô nhiễm hay ăn nhiều loại thực phẩm chứa nhiều độc tố. Đặc biệt, với lối sống sinh hoạt của giới trẻ hiện nay ít vận động, rượu bia nhiều hay là thường xuyên ăn những thức ăn nhanh là một trong những nguyên nhân gây trẻ hóa ung thư. Từ kết quả ở Bảng 1, cho thấy tỷ lệ bệnh nhân ung thư gan chủ yếu từ 50 - 70 tuổi, trong đó độ tuổi từ 60 - 70 chiếm tỷ lệ cao nhất 42% ($p < 0,05$). Ở giới tính nam tỷ lệ mắc bệnh cao hơn so với nữ (nam: 74%, nữ: 26%, $p < 0,05$). Ở nam giới tỷ lệ mắc bệnh ung thư gan cao nhất ở độ tuổi 50 - 60 tuổi (72,22%) và ở nữ mắc bệnh cao nhất ở độ tuổi 60 - 70 (38,1%). Số người hút thuốc ở bệnh HCC chiếm tỷ lệ từ 42,85 - 100% tùy theo độ tuổi. Trong khi đó, tỷ lệ người uống rượu ở bệnh HCC tương đối thấp (16,67 - 19,05%) và chủ yếu tập trung ở độ tuổi từ 50 - 70. Tỷ lệ bệnh nhân ung thư gan dương tính với HbsAg chiếm từ 55,56 - 100% và tập trung ở 40 - 70 tuổi, Trong khi đó, tỷ lệ dương tính với anti HCV thấp (28,57 - 33,33%) và tập trung ở độ tuổi từ 50 - 70 tuổi.

Bảng 1. Tình trạng bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan

Độ tuổi	Tổng bệnh nhân		Bệnh nhân nam		Bệnh nhân nữ		Ung thư gan			
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Tỷ lệ hút thuốc (%)	Tỷ lệ uống rượu (%)	Tỷ lệ HbsAg (%)	Tỷ lệ Anti HCV (%)

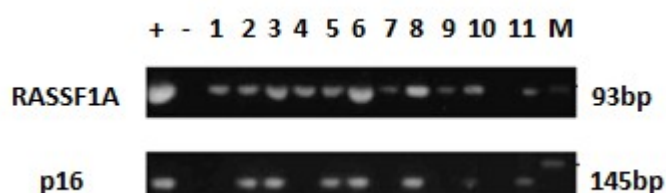
≤ 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(30 - 40)	4	8,00	4	10,81	-	-	100	-	-	-
(40 - 50)	7	14,00	7	18,91	-	-	71,43	-	100	-
(50 - 60)	18	36,00	13	72,22	5	27,78	55,56	16,67	55,56	33,33
(60 - 70)	21	42,00	13	61,9	8	38,1	42,85	19,05	71,42	28,57

Theo nghiên cứu của [Cyriac A Philips](#) và cộng sự, ung thư gan là loại ung thư phổ biến ở nam giới. Năm 2018, Pháp và Malta công bố tỷ lệ mắc ung thư gan ở nam giới (72%) cao hơn 4 lần ở nữ giới [10]. Hiệp hội ung thư Hoa Kỳ cũng công bố tỷ lệ nam/nữ ung thư gan năm 2021 là 227/110 và độ tuổi cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến bệnh ung thư gan. Tại Mỹ, ở độ tuổi 46-81 bệnh nhân ung thư gan chiếm tỷ lệ 64,2% còn ở Trung Quốc tuổi trung bình mắc bệnh ung thư gan là 54 tuổi [9]. Từ đó cho thấy, tùy thuộc vào chủng tộc, khu vực và điều kiện sinh sống mà độ tuổi mắc bệnh

ung thư tế bào gan sẽ khác nhau, đây cũng là một điểm cần lưu ý về dịch tễ.

3.2. Ảnh hưởng của p16 và RASSF1A methyl hóa ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan

Gen ức chế khối u p16 là một chất ức chế các kinase 4 và 6 phụ thuộc vào cyclin, liên kết cyclin D1 và phosphorylate Rb bị thay đổi thường xuyên ở các khối u ở người lớn bao gồm cả HCC. Gần đây, cũng có nhiều chứng minh RASSF1A là gen ức chế khối u đích đối với bệnh ung thư ở người [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát vai trò của việc bất hoạt RASSF1A và p16 trong sự phát triển của HCC.



Hình 1. Kết quả điện di nhận diện p16 và RASSF1A

Quá trình RASSF1A và p16 methyl hóa xuất hiện ở mẫu mô HCC và ở mô thường khác nhau, tỷ lệ ở biểu hiện ở mô HCC cao hơn mô thường. Trong 44 mẫu chứa gen p16 thì quá trình methyl hóa xảy ra ở mô bình HCC cao hơn mô bình thường (63,64% > 36,36%). Trong các mẫu chứa gen RASSF1A tỷ lệ methyl hóa ở mô HCC là 60,35%, trong khi đó ở mô thường là

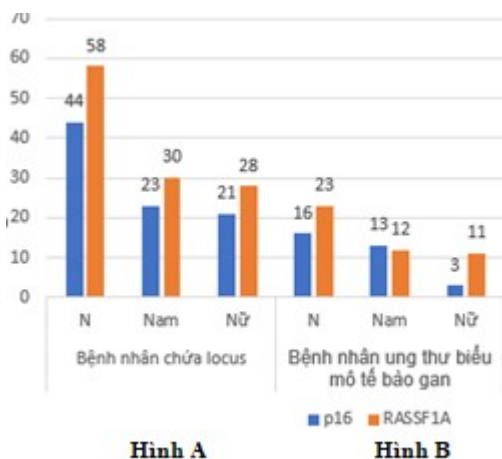
39,65% (Bảng 1, Hình 1). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự như Zhang và cộng sự [2]. Ngoài ra, quá trình RASSF1A methyl ở hai giới nam và nữ không có sự khác nhau đáng kể (nam: 12/23 trường hợp, nữ: 11/23 trường hợp). Trong khi đó, p16 methyl hóa ở nam cao gấp 4,3 lần so với nữ (nam: 81,25%, nữ: 18,75%), kết quả thể hiện ở Hình 2.

Bảng 3. Tần suất xuất hiện của p16 và RASSF1A methyl hóa

Đối tượng	Tổng số bệnh nhân khảo sát	Bệnh nhân chứa locus		Bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan		Đối chứng		OR (95% CI)
		n	%	n	%	n	%	
p16	100	44	44	16	63,64	28	36,36	2,7 (0,6 - 4,7)
RASSF1A	100	58	58	23	60,35	35	39,65	3,2 (1,8 - 4,6)

Gen RASSF1A điều chỉnh sự tăng sinh tế bào và quá trình apoptosis, được tìm thấy trong các mô bình thường và có số lượng ít trong tế bào ung thư [10]. Các locus liên kết với các đoạn môi đặc hiệu, các sản phẩm PCR được nhận diện bởi ethium bromide với kích thước là 93bp đối với RASSF1A và 145bp đối với p16. Gen p16 rất quan trọng đến quá trình phát triển của nhiều bệnh ung thư, nên những thay đổi di

truyền p16 có liên quan đến sự hình thành khối u. Vai trò chính của p16 như một gen ức chế khối u chủ yếu và quá trình methyl hóa promoter p16 đã được xác định là cơ chế chính bất hoạt p16 trong nhiều bệnh ung thư nguyên phát [12]. Các nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh rằng p16 có thể bị bất hoạt bởi các cơ chế khác nhau trong HCC, quá trình hypermetyk hóa xảy ra với tần số 42 - 73 [12].



Hình 2. Ảnh hưởng của giới tính đến p16 và RASSF1A methyl hóa

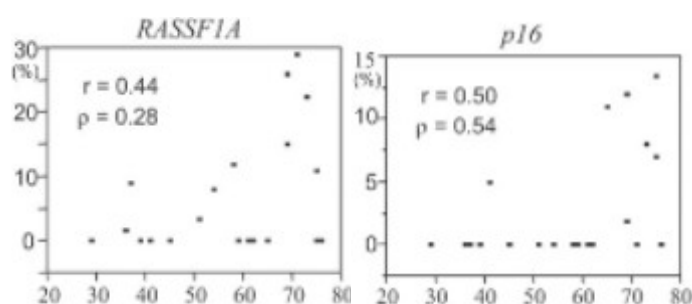
RASSF1A mRNA bị thiếu trong hầu hết các dòng tế bào ung thư phổi, do sự methyl hóa vùng promoter giả định RASSF1A. Sự biểu hiện RASSF1A ngăn chặn sự hình thành khối u ở chuột và ngăn chặn kiểu hình khối u ác tính. Gần đây, RASSF1A cũng được chứng minh bị bất hoạt bởi sự tăng methyl hóa promoter trong một tỷ lệ đáng kể của ung thư vòm họng, thận, dạ dày, bàng quang và ung thư biểu mô ác

tính Hypermethylation của đảo CpG thuộc họ miền liên kết Ras 1A (RASSF1A), một gen ức chế khối u giả định từ locus 3p21.3, xảy ra trong một tỷ lệ lớn các trường hợp ung thư vú ở người [11]. Những kết quả này cho thấy RASSF1A có thể là một gen ức chế khối u quan trọng và quá trình methyl hóa RASSF là một yếu tố quan trọng đối với sự hình thành khối u. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy tần

suất của quá trình bất hoạt RASSF1A liên quan đến quá trình methyl hóa trong HCC, cụ thể trong 100 mẫu thử nghiệm có 58 mẫu có RASSF1A (59,65% bệnh nhân HCC và 39,65% ở người bình thường). Những kết quả này cho thấy sự bất hoạt của RASSF1A là nguyên nhân góp phần vào sự tiến triển ung thư ác tính của HCC.

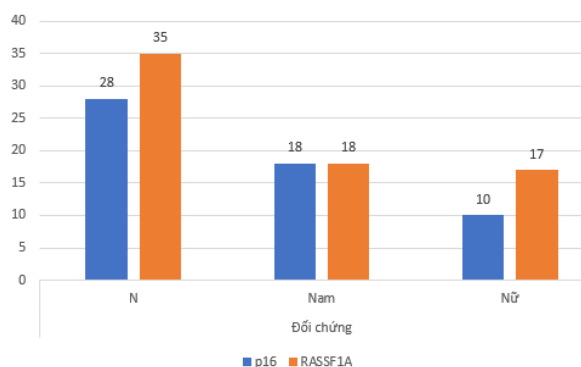
3.3. Ảnh hưởng của độ tuổi và giới tính đến quá trình methyl hóa trong gan bình thường

RASSF1A và p16 được sự methyl hóa trong các mô gan bình thường về mặt bệnh lý và lâm sàng, trong đó khả năng methyl hóa tỉ lệ thuận với độ tuổi với giá trị r nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,44; giá trị p dao động từ 0,54 đến 0,28 (Hình 2). Ngoài ra, mức độ methyl hóa của RASSF1A và p16 ở bệnh nhân từ 65 tuổi trở lên cao hơn so với những người dưới 65 tuổi trong các mẫu gan bình thường. Như vậy, quá trình methyl hóa các gen ức chế khối u được cho là nguyên nhân gây ra sự phát triển của ung thư gan cũng diễn ra trong gan bình thường ở người lớn tuổi.



Hình 3. Tương quan giữa độ tuổi và mật độ methyl hóa ở locus RASSF1A, p16 trong gan

Xét về giới tính (Hình 4), khả năng methyl hóa của RASSF1A ở nữ giới (17/35 trường hợp) và nam giới (18/35 trường hợp) có chênh lệch nhưng không đáng kể. Đặc biệt ở p16, khả năng methyl hóa ở nữ giới (10/28 trường hợp) thấp hơn ở nam giới (18/28 trường hợp).

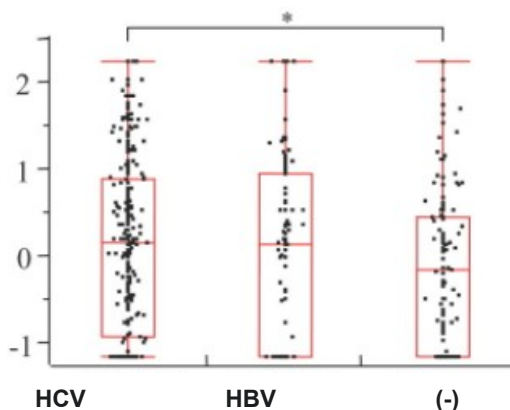


Hình 4. Tương quan giữa giới tính và mật độ methyl hóa ở locus RASSF1A, p16 trong gan

Các thử nghiệm phân tích định lượng của Snorri và cộng sự cho rằng quá trình methyl hóa một số locus RASSF1A và p16 diễn ra trong gan ở người lớn tuổi, các mô gan không ung thư của bệnh nhân ung thư gan và các tế bào gan ung thư và phát triển liên tục, tham gia vào sự phát triển của ung thư gan. Ngoài ra, sự hiện diện của virus viêm gan, đặc biệt là viêm gan C, thúc đẩy quá trình methyl hóa hoạt hóa tế bào ung thư gan [13].

3.4. Tình trạng methyl hóa giữa ung thư gan với HBV, anti HCV và mẫu âm tính với virus

Sự phân bố mật độ methyl hóa (Hình 3) của locus *RASSF1A* và *p16* trong ung thư gan được phân loại gồm các mẫu có chứa HCV, HBV và âm tính với HCV, HBV. Mỗi mật độ được biểu thị dưới dạng Z-score với các đồ thị biểu thị sự phân bố của *RASSF1A* và *p16* methyl hóa trong mẫu chứa HCV cao hơn so với mẫu chứng âm [ANOVA; $F(2, 522) = 4,34, p=0,0134$].



Hình 4. Mật độ methyl hóa giữa ung thư gan với, HBV, HCV và mẫu âm tính với virus

Theo Jicai Z và cộng sự, mức độ methyl hóa cao hơn trong các mô gan ung thư tương ứng so với mô bình thường [14]. Đặc biệt, ở các mô thường xảy ra tình trạng nhiễm virus cũng diễn ra sự methyl hóa đồng thời nhiều gen. Vì HCV là nguyên nhân phổ biến của bệnh gan mạn tính và ung thư gan trên toàn thế giới, có thể đẩy nhanh quá trình methyl hóa hình thành ung thư gan. So sánh mức độ methyl hóa giữa gan bình thường và gan ung thư đã chứng minh rằng sự methyl hóa cao hơn các trường hợp dương tính với HCV, nhưng lại thấp hơn các trường hợp bệnh nhân dương tính với HBV và âm tính với virus. Zhong và cộng sự chứng minh quá trình methyl hóa bất thường của promoter gen *RASSF1A* có trong 95% các mô HCC; các tác giả đưa ra giả thuyết rằng sự thay đổi trong biểu hiện gen *RASSF1A* là một sự kiện sớm trong quá trình hình thành khối u HCC do virus viêm gan B gây ra [11].

5. Kết luận

Quá trình methyl hóa gen *RASSF1A* và *p16* có mối liên hệ mật thiết đến bệnh nhân ung thư gan đặc biệt ở bệnh nhân trên 65 tuổi diễn ra nhiều hơn và tùy thuộc vào độ tuổi và giới tính.

Tài liệu tham khảo

1. [Lukas J, Parry D](#) et al (1995) *Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16*. Nature 375(6531): 503-6. doi: 10.1038/375503a0.
2. [Yu-jing Zhang, Habibul Ahsan](#) et al (2002) *High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A and p16 and its relationship to aflatoxin B1-DNA adduct levels in human hepatocellular carcinoma* Mol Carcinog 35(2): 85-92. doi: 10.1002/mc.10076.
3. [Dammann R, Li C](#) et al (2000) *Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3*. Nat Genet 25(3): 315-319. doi: 10.1038/77083.

4. [Kok K](#), [Naylor SL](#) et al (1997) *Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes*. *Adv Cancer Res* 71: 27-92. doi: 10.1016/s0065-230x(08)60096-2.
5. Trần Văn Huy (2003). *Nghiên cứu dấu ấn vi rút viêm gan B, C và đặc điểm lâm sàng ung thư biểu mô tế bào gan*. Luận án tiến sĩ Y học, Trường Đại Học Y Huế.
6. Varayu Prachayakul, Jiraporn Kanchanapermpoon et al (2017) *DNA methylation markers improve the sensitivity of endoscopic retrograde cholangiopancreatography-based brushing cytology in extrahepatic cholangiocarcinoma*. *Technology in Cancer Research & Treatment* 16(6): 1252-1258
© The Author(s) 2017 Reprints and permission: sagepub.com/journalsPermissions.nav DOI: 10.1177/1533034617748090journals.sagepub.com/home/tct.
7. [Zengli Guo](#) et al (2020) *DCAF1 regulates Treg senescence via the ROS axis during immunological aging*. *J Clin Invest* 130(11): 5893-5908. Published online. doi: [10.1172/JCI136466](https://doi.org/10.1172/JCI136466).
8. [Snorri S Thorgeirsson](#), [Joe W Grisham](#) (2002). *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma* 31(4): 339-346. doi: 10.1038/ng0802-339.
9. Marianne Frommer, Louise E McDonald et al (1992) *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 89: 1827-1831, March 1992 Genetics.
10. Nishida N, Nishimura T et al (2007). *Extensive methylation is associated with beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma: Evidence for two distinct pathways of human hepatocarcinogenesis*. *Cancer Res* 67: 4586-4594.
11. [Katherine A McGlynn](#), [Jessica L Petrick](#) et al (2020) *Epidemiology of hepatocellular carcinoma hepatology*. *Suppl* 1(1): 4-13. doi: 10.1002/hep.31288.
12. [Sheng Zhong](#), [Winnie Yeo](#) (2003) *Intensive hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinomas*. *Clin Cancer Res* 9(9): 3376-3382.
13. [Rocco JW](#), [Sidransky D](#) (2001) *p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression*. *Exp Cell Res* 264(1): 42-55. doi: 10.1006/excr.2000.5149.
14. [Snorri S Thorgeirsson](#), [Joe W Grisham](#) (2002) *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*. 31(4): 339-346. doi: 10.1038/ng0802-339.
15. Jicai Z, Zongtao Y (2006) *Persistent infection of hepatitis B virus is involved in high rate of p16 methylation in hepatocellular carcinoma*. *Mol Carcinog* 45: 530-536.