

KHẢO SÁT TẦN SUẤT ĐỘT BIẾN GEN BRCA1, BRCA2 Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ VÚ NGƯỜI VIỆT NAM

TẠ VĂN TÒ, LÊ THỊ PHƯỢNG,
NGUYỄN THỊ DIỆU THÚY, TRẦN VĂN KHÁNH và CS

TÓM TẮT

Mục đích: Xác định tần suất đột biến BRCA1 và BRCA2 ở phụ nữ ung thư vú người Việt Nam.

Phương pháp: 95 bệnh nhân ung thư vú chọn ngẫu nhiên được lấy máu đưa vào nghiên cứu. Các mẫu máu được ly tâm, lấy phần bạch cầu dùng tách chiết DNA. Các sản phẩm DNA sau đó được đưa vào giải trình tự để xác định đột biến trên 3 vùng đoạn DNA là 185delAG, 6174delT và 5382insC.

Kết quả: Chúng tôi đã tách chiết thành công DNA trên 95 mẫu máu, đã tiến hành khuếch đại gen bằng phản ứng PCR. Các sản phẩm gen sau đó được giải trình tự. Kết quả cho thấy không phát hiện được đột biến tại 3 vùng 185delAG, 6174delT và 5382insC.

Kết luận: Đột biến BRCA1 và BRCA2 có thể rất hiếm ở phụ nữ Việt Nam.

Từ khóa: đột biến BRCA1, BRCA2, ung thư vú.

SUMMARY

Purpose: To estimate the proportions of BRCA1 and BRCA2 mutations among sporadic cases of breast cancer in Hospital-K.

Methods: 95 cases of incident breast cancer were recruited from Hospital-K. DNA samples were obtained for mutation detection in the exons of BRCA1 and BRCA2. Gene sequencing was performed to detect 185delAG, 6174delT and 5382insC mutations.

Results: DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells. Three regions of BRCA1 and BRCA2 were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Each PCR products were completely sequenced using a PCR sequencing kit but no BRCA1 and BRCA2 mutations were revealed.

Conclusions: BRCA1 and BRCA2 mutations may be very rare in Vietnamese women with breast cancer.

Keywords: BRCA1, BRCA2, breast cancer.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư vú là một trong những nguyên nhân gây tử vong cao ở phụ nữ các quốc gia trên thế giới. Tuy nhiên có sự khác biệt về tỷ lệ mắc bệnh theo tuổi giữa các quốc gia và giữa các chủng tộc. Nguyên nhân sự khác biệt này đến nay chưa rõ mặc dù có yếu tố về gen đóng vai trò quan trọng trong sinh bệnh học ung thư vú. Việc tăng tỷ lệ ung thư vú ở các nước phát triển có thể do tác động của các yếu tố môi trường làm biến đổi một số gen, cũng có thể do thay đổi chế độ ăn.

Việt Nam có tỷ lệ dân số 87 triệu người, là một trong những Quốc gia có tỷ lệ ung thư vú thấp so với Mỹ và Tây Âu. Theo ghi nhận của Phạm Thị Hoàng Anh, tỷ lệ ung thư vú là 27/100.000 dân [1] trong khi đó Canada là 82/100.000 dân [3]. Như vậy một câu hỏi đặt ra liệu các yếu tố nguy cơ ung thư vú ở người Việt Nam có khác biệt gì so với các nước phát triển. Một trong các yếu tố nguy cơ quan trọng gây ung thư vú hiện nay đang được nhiều tác giả nghiên cứu là đột biến gen BRCA1 và BRCA2.

Đột biến gen BRCA1 và BRCA2 liên quan đến ung thư vú có tiền sử gia đình. Ung thư vú có tiền sử gia đình chiếm khoảng 15% các trường hợp. Những nghiên cứu gần đây cho thấy đột biến gen BRCA1 và BRCA2 chiếm khoảng 45% các trường hợp ung thư vú gia đình và 80-90% các trường hợp nếu có cả ung thư vú và ung thư buồng trứng. Những phụ nữ sống trong gia đình mà có quan hệ huyết thống mang gen

đột biến BRCA1 và BRCA2 thì nguy cơ mất ung thư vú là 87% và ung thư buồng trứng là 44% [3]. Do vậy việc phát hiện đột biến BRCA1 và BRCA2 hết sức quan trọng trong phòng ngừa, phát hiện sớm và điều trị dự phòng ung thư vú.

Tại Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu khảo sát tỷ lệ đột biến BRCA1 và BRCA2 trong ung thư vú nói chung cũng như ung thư vú gia đình. Đề tài nghiên cứu của Đái Duy Ban khảo sát 15 mẫu máu bệnh nhân ung thư vú và 36 mẫu máu chị em gái bệnh nhân ung thư vú được đưa vào xác định tỷ lệ đột biến gen BRCA1 và BRCA2. Kết quả cho thấy không phát hiện được đột biến 185delAG và 6174delT [2]. Các tác giả nhận xét, tỷ lệ đột biến gen BRCA1 và BRCA2 ở phụ nữ Việt Nam có thể rất thấp. Một số nghiên cứu tại phụ nữ Châu á bị ung thư vú cũng cho thấy, tỷ lệ đột biến gen BRCA1 và BRCA2 là rất thấp [4].

Để tiếp theo một số nghiên cứu về đột biến gen BRCA1 và BRCA2 ở phụ nữ Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: *Xác định tần suất đột biến gen BRCA1 và BRCA2 ở bệnh nhân ung thư vú người Việt Nam.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng.

Đối tượng nghiên cứu gồm 95 bệnh nhân ung thư vú được điều trị tại Bệnh viện K.

2. Phương pháp.

Nghiên cứu tiến cứu

2.1. Cách lấy máu và bảo quản

- Các bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu được lấy máu trước phẫu thuật.

Máu được lấy từ tĩnh mạch 3 ml được đưa vào ống chống đông. Các typ máu sẽ được ly tâm để lấy phần bạch cầu cho việc tách chiết ADN (Buffy coat).

Các lấy buffy coat:

- Ống máu được ly tâm 10-15 phút với tốc độ 3000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi ly tâm, máu được chia làm 3 lớp: lớp trên cùng là huyết tương; lớp dưới cùng là hồng cầu; lớp buffer coat là lớp rất mỏng nằm ở giữa.

- Sử dụng micropipet lấy bỏ phần huyết tương đảm bảo không làm hỏng lớp buffy coat.

- Dùng micropipet nhẹ nhàng đưa một vòng hút hết lớp buffy coat vào trong ống hút rồi chuyển vào ống nhỏ (Eppendorf tube) bảo quản trong tủ lạnh âm sâu. Phần buffy coat sẽ được lưu trữ tại tủ lạnh âm sâu 70°C. Các mẫu này sẽ được đưa vào tách chiết ADN theo phương pháp của Ausubel sau đó được đưa vào thực hiện kỹ thuật PCR theo phương pháp Hujun. Sản phẩm tạo ra được tinh chế sau đó được đưa vào giải trình tự đoạn ADN. Việc phân tích gen của tất cả các trường hợp ung thư vú được thực hiện bằng phương pháp cắt cụt protein của exon 11 đối với BRCA1 và exon 10 đối với BRCA2. Giải trình tự đầy đủ gen BRCA1 và BRCA2 sẽ được tiến hành.

2.2. Tách chiết DNA.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA của 95 mẫu máu bệnh nhân ung thư vú.

Phương pháp tách chiết DNA hệ gen được tiến hành theo Gorossellar và CS (1972) có cải tiến để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của chúng tôi. Toàn bộ qui trình tách chiết DNA từ các mô ung thư được tiến hành như sau:

- Rửa sạch chày cối sứ, để trong tủ lạnh sâu -70°C hoặc rửa bằng cồn rồi để trong tủ sấy 57°C. Cắt một mẫu mô khoảng 100 mg, thấm khô cồn, nghiền nhỏ trong 600 μ l ng dịch đệm phá tế bào cho đến khi thành dạng bột mịn.

- Thêm 4 μ l ProteaseK (2mg/ml), ủ ở 56°C qua đêm (khoảng 16 giờ) để phá màng tế bào và màng nhân, giải phóng DNA.

- Thêm 400 μ l Phenol Chlorofom Isoamy (tỷ lệ 25:24:1). Sau đó ly tâm lạnh 8000 rpm ở 4°C trong 10 phút, thu lấy dịch trong.

- Thêm 400 μ l Chlorofom Isoamy (tỷ lệ 24:1). Ly tâm lạnh 8000 rpm ở 4°C trong 10 phút, thu lấy dịch trong.

- Thêm 250 μ l Chlorofom Isoamy (tỷ lệ 24:1). Ly tâm lạnh 8000 rpm ở 4°C trong 10 phút, thu lấy dịch trong.

- Thêm 1 ml (1000 μ l) cồn tuyệt đối, để tủ lạnh -30°C trong 3-4 giờ, để tủa DNA.

- Ly tâm lạnh 12000 rpm ở 3°C trong vòng 20 phút. Đổ phần dịch trong đi, thu tủa DNA.

- Thêm 1ml (1000 μ l) cồn 70° để làm tủa và rửa sạch DNA.

- Ly tâm lạnh 12000 rpm ở 3°C trong vòng 20 phút. Đổ phần dịch trong đi, thu tủa DNA.

- Thấm khô cồn, để trong quạt gió cho đến khi khô cồn.

- Thêm 50 μ l nước hoặc TE để làm tan DNA. Bảo quản ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Định lượng DNA.

Sau khi thu nhận DNA ở dạng tinh sạch, tiến hành phân tích định lượng, định tính bằng quang phổ kế ở bước sóng 260 và 280 nm, nó cho phép xác định nồng độ DNA có trong mẫu.

Nguyên tắc của phương pháp này là dựa vào sự hấp thụ mạnh ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260nm của các base. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260nm của các mẫu đo tỉ lệ thuận với hàm lượng DNA trong mẫu và được tính theo công thức sau:

$$C_{DNA} (\mu\text{l/ml}) = OD_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{độ pha loãng}$$

Để kiểm tra độ tinh sạch của DNA trong dung dịch, đo thêm giá trị OD ở 280nm, là bước sóng mà các protein có mức hấp thụ cao nhất, nhưng các protein cũng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260nm như các DNA và do đó làm sai lệch giá trị nồng độ thật của nồng độ DNA. Một dung dịch DNA được xem là sạch, không tạp nhiễm protein khi tỷ số OD_{260}/OD_{280} nằm trong khoảng 1,8 – 2,0. Hút 2 μ l nước khử vô trùng vào một cuvette làm đối chứng. Sau đó lấy 2 μ l DNA để đo OD ở bước sóng 260 và 280nm. Từ các giá trị OD thu được ở hai bước sóng, có thể tính được

nồng độ và độ tinh sạch của DNA theo công thức trên.

2.4. Điện di DNA trên gel agarose

Để phân tích các kết quả tách chiết DNA và kiểm tra sự có mặt của chúng ở các sản phẩm PCR người ta sử dụng phương pháp điện di trên gel agarose. Nguyên tắc của phương pháp điện di này là dựa vào đặc tính của cấu trúc axit nucleic mang điện tích. Đây là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác động của một điện trường có điện thế và cường độ thích hợp, chúng sẽ di chuyển về cực dương của điện trường (DNA di chuyển từ cực âm sang cực dương). Các phân tử DNA khác nhau về kích thước đồng thời khác nhau về điện tích nên chúng di chuyển trên gel agarose cũng với tốc độ khác nhau, do đó có thể phân biệt được chúng.

Bảng 1: Tương quan giữa nồng độ agarose và kích thước đoạn DNA cần phân tích

Agarose (%)	Kích thước DNA (bp)
0,6 – 0,8	1000 – 20000 bp
0,9 – 1,2	500 – 700 bp
1,2 – 1,5	200 – 500 bp

Chuẩn bị gel agarose 1% hoặc 2 %

- Cân 1,0 hoặc 2,0 gr agarose cho vào bình chứa 100 ml dung dịch đệm TBE 1x.

- Đưa vào lò vi sóng đun cho tan hoàn toàn (khoảng 1-2 phút). Hạn chế bay hơi nước bằng cách bịt kín miệng bình bằng giấy bạc để tránh tăng nồng độ agarose. Nếu quá trình đun mất quá nhiều nước thì phải bổ sung cho đủ 100ml.

- Lấy ra, bổ sung khoảng 2,0µl ethidium bromid, lắc đều, để nguội khoảng 50-60 °C, đổ dung dịch vào khay điện di đã cài lược sẵn để tạo giếng. Độ dày của gel 5mm, sau 30 phút gel đông cứng hoàn toàn, rút lược ra. Đưa vào bể điện di, để dung dịch đệm TBE ngập các giếng trên gel, tra mẫu DNA vào giếng điện di.

- Lấy 5 µl DNA tổng số, trộn đều cùng với 1µl dung dịch đệm tra mẫu (Loading Buffer - tỉ lệ v/v là 1/5). Sau đó tra vào mẫu vào các giếng nhỏ trên gel.

- Chạy điện di cùng chỉ thị DNA để ước lượng kích thước phân tử.

Chế độ chạy điện di: U = 80 – 120V; I = 60 – 80 mA.

DNA di chuyển từ cực âm (-) sang cực dương (+). Quan sát sự di chuyển bằng mẫu bromophenol blue để biết DNA di chuyển đến vị trí nào trên gel và lúc nào cần ngừng điện di.

+ Lấy bản gel ra, đưa lên máy soi, DNA bắt màu quang phổ - phát huỳnh quang dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm. DNA sẽ hiện hình dưới dạng những vạch màu đỏ cam, ta xác định được chúng. Sau đó chụp ảnh bản gel. Đối với các sản phẩm cắt, chúng tôi tiến hành kiểm tra trên gel agarose 3%.

2.5. Khuếch đại đoạn DNA-6174delT bằng phản ứng PCR

Bảng 2 : Thành phần phản ứng PCR với cặp mồi 6174delT

Thành phần	Số lượng (µl)
H ₂ O	14,1
Buffer 10x	2
dNTP 10 mM	0,5
Mồi xuôi (F)	1
Mồi ngược (R)	1
Taq – polymerase	0,4
DNA khuôn	1

Chú ý : Thành phần phản ứng được trộn đều bằng máy vortex và được ly tâm nhẹ cho mẫu không bám lên thành ống nghiệm, đặt ngay vào máy PCR để tránh sự biến tính của DNA.

Bảng 3: Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với mồi 6174delT

Các bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian
Biến tính	94	5 phút
Tổng hợp	94	30 giây
	55	30 giây
	72	30 giây
Kết thúc	72	10 phút

Sau khi phản ứng kết thúc, chúng tôi tiến hành kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%. Các băng thu được, được đọc trình tự DNA và đối chiếu với gen bank do ncbi (National Center Biotechnology Information) cung cấp.

- Chẩn hóa phương pháp xác định đột biến 185delAG và 5382insC trên gen BRCA1 và 6174deT trên gen BRCA2 bằng sử dụng mồi oligonucleotide đặc hiệu allele (allele-specific oligonucleotide primer).

- Sử dụng PCR với các cặp mồi đặc hiệu allele để khuếch đại các đoạn gen chứa đột biến trên gen BRCA1 và BRCA2 với kích cỡ khác nhau.

- Phương pháp tách chiết DNA hệ gen từ tế bào máu qua các bước phá hủy tế bào bằng proteinase K và chất xúc tác cơ học, loại protein bằng phenol: chloroform, rửa DNA bằng cồn nồng độ cao.

- Đánh giá sản phẩm DNA hệ gen tách được bằng phương pháp điện di trên gel agarose và quang phổ.

- Phương pháp PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu allele để khuếch đại các đoạn gen chứa và không chứa đột biến. Các mồi ngược thường và đột biến có độ dài khác nhau khoảng 20 bp cho phép dễ dàng phát hiện sản phẩm PCR trên điện di thường.

Trình tự các mồi đặc hiệu allele

Mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Kích cỡ (bp)
<i>BRCA1 185delT</i>		
Mồi xuôi-P1	ggttggcagcaaatatgtgaa	
Mồi ngược-P2	gctgacttaccagatgggactctc	335
Mồi ngược đột biến-P3	cccaaattaatacactctgtcgtgacttaccag atgggacagta	354
<i>BRCA1 5382insC</i>		
Mồi xuôi – P4	gacgggaatccaattacacag	
Mồi ngược – P5	aaagcgagcaagagaatcgca	271
Mồi ngược đột biến-P6	aatcgaagaaccaccaagcttagcgag caagagatcacc	295
<i>BRCA26174delT</i>		
Mồi xuôi – P7	agctgtctgaatgttcttact	
Mồi ngược – P8	gtgggatttttagcacagctagt	151

Mỗi ngược đột biến-P9	cagtctcatctgcaataactcagggatttttagc acagcatgg	171
-----------------------	---	-----

Xác định đột biến gen BRCA1 và BRCA2:

Phân tích đột biến 5382insC bằng phương pháp xác định trình tự gen.

Phân tích đột biến 185delAG và 6174delT bằng phương pháp Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) sử dụng enzyme giới hạn tương ứng là *Hinf I* và *Bbr PI* ở điều kiện 37°C, qua đêm.

Thành phần phản ứng cắt: 10 µl sản phẩm PCR được cắt với 10 U enzyme giới hạn.

Điện di sản phẩm PCR và sản phẩm cắt trên gel polyacrylamide 8%.

Đọc kết quả phân tích RFLP để xác định đột biến 185delAG và 6174delT.

Đọc kết quả giải trình tự để xác định đột biến 5382insC.

Các sản phẩm PCR được chạy trên gel agarose 3% nhuộm ethydiumbromid và sẽ phát huỳnh quang dưới tia UV.

Trường hợp dị hợp tử 185delAG đã phát hiện ra 2 băng 168bp và 150bp; trường hợp dị hợp tử 6174delT phát hiện ra 2 băng 147bp và 127bp, và những băng của 2 đột biến này (168bp ở 185delAG và 147bp ở 6174delT) thì nặng hơn các băng bình thường. Đối chiếu với marker DNA 100bp ta sẽ dễ dàng phát hiện các đột biến trên.

2.6. Phương pháp sử dụng enzyme cắt giới hạn.

Sản phẩm PCR của alen bình thường thu được có một vị trí đặc hiệu cho enzyme cắt mà alen đột biến không có. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng enzyme cắt giới hạn là *BbrPI*. Vị trí giới hạn này cho phép ta xác nhận sự có mặt của các alen đột biến. Trình tự mỗi của đột biến 6174delT là: (F) ...5'- tgg gat ttt tag cac agc ac'g - 3' và (R) ..5' - ctg gtc tga atg ttc gtt ac - 3'. Kích cỡ của sản phẩm PCR là 148 bp cho alen hoang dại và 147 bp cho alen đột biến. Điểm cắt của enzyme *BbrPI* thuộc alen hoang dại.

Trường hợp dị hợp tử ở alen chứa đoạn DNA-6174delT phát hiện ra 2 băng 147bp và 127bp, và những băng của đột biến này (147bp ở 6174delT) thì nặng hơn các băng bình thường. Đối chiếu với marker DNA 100bp ta sẽ dễ dàng phát hiện các đột biến trên.

+ Thành phần của phản ứng cắt: 2 µl H₂O; 2 µl Buffer (10x); 1 µl *BbrPI* (10U/MI); 15 µl sản phẩm PCR. Trộn đều và để ở 37°C qua đêm.

+ Kiểm tra sản phẩm cắt trên gel agarose 3%. Chúng ta dễ dàng phát hiện được kích cỡ của các đoạn gen cần quan tâm.

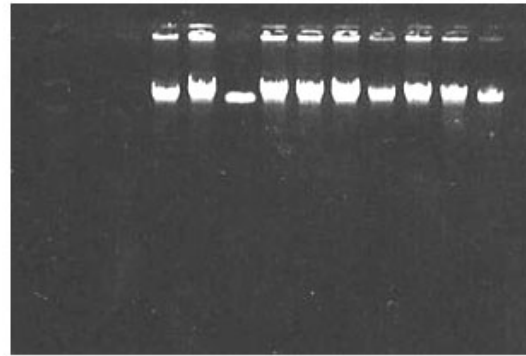
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả tách chiết và tinh sạch DNA.

Chúng tôi tiến hành tách chiết DNA của 150 mẫu bệnh nhân ung thư vú. Sau khi tách xong, tiến hành kiểm tra độ tinh sạch DNA trên gel agarose 1,5%.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Hình 1: Phổ điện di DNA tổng số

Nhận xét: Qua điện di đồ chúng tôi nhận thấy: trên bản gel chỉ xuất hiện một băng DNA, vùng sáng ở cuối giếng gel không còn nữa. Điều này chứng tỏ ARN và tạp chất đã bị loại bỏ hoàn toàn.

2. Kết quả nhân đoạn DNA-6174delT bằng phản ứng PCR.

Sản phẩm PCR nhân đoạn DNA-6174delT được kiểm tra trên gel agarose 1,5%.

Qua điện di đồ chúng tôi nhận thấy: Nếu so sánh với chỉ thị DNA 100bp, sản phẩm PCR xuất hiện một băng DNA tương ứng với vị trí ước đoán là 148 bp, không xuất hiện băng phụ nào khác. Điều đó chứng tỏ đoạn DNA-6174delT đã được nhân lên thành công. Chúng tôi nhận thấy sản phẩm PCR có chất lượng tốt, đủ tiêu chuẩn để thực hiện các phản ứng tiếp theo.

3. Kết quả đọc trình tự DNA-6174delT.

Để khẳng định chắc chắn hơn đoạn DNA vừa nhân lên có đúng là đoạn DNA chứa vị trí 6174delT hay không. Chúng tôi tiến hành đọc trình tự đoạn DNA-6174delT trên máy ABI 3100-Avant Genetic Analyzer của Trung tâm Labo trường Đại học Y Hà Nội. Máy đọc trình tự trên cả 2 mạch đơn, do đó giảm bớt sự nhầm lẫn trong lỗi kỹ thuật. Kết quả này chúng tôi đối chiếu với trình tự DNA trong gen bank do ncbi cung cấp và đã thấy sự trùng khớp giữa 2 kết quả trên. Điều này chứng tỏ đoạn DNA-6174delT đã được nhân lên một cách chính xác.

4. Kết quả sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn với mỗi 6174delT để xác định đột biến 6174delT trên gen BRCA2.

Sản phẩm cắt được kiểm tra trên gel agarose 3%. Qua điện di đồ chúng tôi nhận thấy: Mẫu đối chứng xuất hiện một băng cao hơn (148bp) so với các mẫu thí nghiệm từ 1-8 và các mẫu đều ở dạng đồng hợp tử, vì chỉ xuất hiện một băng tương ứng với kích thước 127bp. Điều này chứng tỏ không có băng đột biến nào xuất hiện trong các mẫu chúng tôi nghiên cứu.

BÀN LUẬN

Trong số 110 bệnh nhân ung thư vú, chúng tôi đã không tìm được đột biến ở vị trí DNA-6174delT. Kết quả nghiên cứu của Đái Duy Ban trên 35 mẫu máu chị em gái bệnh nhân ung thư vú cũng không tìm được đột biến gen BRCA1 và BRCA2 [2]. Một số

nguyên cứu trên thế giới cho thấy tỷ lệ đột biến gen BRCA1 và BRCA2 trong ung thư vú nói chung giao động từ 1-10% và có sự khác biệt giữa các quốc gia và các chủng tộc. Gần đây cũng đã có một số nghiên cứu xác định tỷ lệ đột biến 2 gen này ở phụ nữ châu á. Tuy nhiên hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào các trường hợp có tiền sử gia đình bị ung thư vú hoặc nhóm nguy cơ cao ví dụ tuổi < 35 hoặc 45. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các trường hợp ung thư vú được lựa chọn một cách ngẫu nhiên.

Đã có một số nghiên cứu về đột biến BRCA1 và BRCA2 ung thư vú ở phụ nữ châu á. Nhìn chung các nghiên cứu này đều báo cáo tỷ lệ đột biến gen BRCA thấp hơn phụ nữ Mỹ hoặc châu Âu. Tuy nhiên tỷ lệ này cũng có sự khác biệt giữa các Quốc gia. Một nghiên cứu ở Nhật Bản đối với 1000 trường hợp ung thư vú được chọn ngẫu nhiên, tỷ lệ đột biến gen BRCA1 và BRCA2 chỉ có 0,8% [4]. Suter và CS phát hiện đột biến BRCA1 và BRCA2 chiếm 2,2% trong số 645 trường hợp ung thư vú ở Thượng Hải, trung Quốc [5]. Một nghiên cứu tại Hàn Quốc trên 97 trường hợp ung thư vú rải rác thấy tỷ lệ đột biến gen BRCA1 và BRCA2 là 3,1% [6]. Một nghiên cứu tại Philippin trên 294 bệnh nhân ung thư vú được chọn ngẫu nhiên thấy tỷ lệ đột biến gen BRCA1 và BRCA2 là 5,1% [7]. Hạn chế trong nghiên cứu là ở chỗ do hạn chế về kinh phí, chúng tôi chưa giải trình tự tất cả các vị trí có thể có đột biến trên đoạn DNA ở tất cả các bệnh nhân. Vì vậy có thể chúng tôi chưa tìm được đột biến ở các vị trí khác. Chúng tôi cần phải tiếp tục giải trình tự với hy vọng có thể tìm được một số đột biến ví dụ như vị trí 1081 delG, 3109CT, 185insA, 4706 delAAG vvv...

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 95 mẫu máu bệnh nhân ung thư vú được điều trị tại Bệnh viện K, lấy phần bạch cầu để

tách chiết DNA theo phương pháp Gorossellar có cải tiến, chúng tôi rút ra một số kết luận sau: Đã khuyếch đại tạo dòng và giải trình tự đoạn gen mang vị trí xảy ra đột biến 185delAG thuộc exon 2 và 6174 delT thuộc exon 11. Đã xác định vùng gen tạo dòng không có đột biến 5382insC, 185delAG và 6174delT khi so sánh với các trình tự công bố trong Ngân hàng Dữ liệu gen Quốc tế. Chúng tôi không phát hiện đột biến trong các mẫu DNA từ 1 đến 95.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anh PTH, Duc NB (2002): The situation with cancer control in Vietnam. Jap J Clin Oncol 32 (suppl): S92-S97.
2. Đái Duy Ban (2005): Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật gen trong chẩn đoán ung thư, đề mục 3 thuộc đề tài cấp nhà nước KC10-06: 101-117
3. Curado NP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M (2007): Cancer in Five Continents, Vol IX, IARC Scientific Publications No 160, Lyon IARC.
4. Ikeda N, Mryoshi Y, Yoneda K, Sheba E, et al (2001): Frequency of BRCA1 and BRCA2 Germline Mutation in Japanese Breast Cancer Families. Int.J.Cancer 91: 83-88.
5. Suter NM, Ray PM, Hu YW, Lin MG, Porter P et al (2004): BRCA1 and BRCA2 mutations in women from Shanghai, China, Ca Epidemiol Bio Prev 13:181-189.
6. Seo JH, Cho DY, Ahn SH, Yoon KS, et al (2004): BRCA1 and BRCA2 germline mutation in Korean patients with sporadic breast cancer. Hum Mutat 24: 350.
7. De Leon Matsuda ML, Liede A, Kwan E, Mapua CA, Cutiongco EM, Tan A, Borg A and Narod SA (2002): BRCA1 and BRCA2 mutations among breast cancer patients from the Philippines. Tnt J Cancer 98: 596-603.