

MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA ĐA HÌNH GEN *GSTO1* VÀ METHYL HÓA ARSENIC Ở TRẺ SƠ SINH BỊ PHƠI NHIỄM ARSENIC TRƯỚC SINH

Tạ Thị Bình¹, Trần Phương Thảo², Nguyễn Khắc Hải¹, Nguyễn Huy Hoàng^{2,✉}

¹Viện Sức khỏe nghề nghiệp và Môi trường

²Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nhhoang@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 21.5.2015

Ngày nhận đăng: 25.12.2016

TÓM TẮT

Arsenic (As) là nguyên tố vi lượng tồn tại tự nhiên trong môi trường. As rất cần thiết cho cơ thể người nếu ở hàm lượng thấp, tuy nhiên sự có mặt của chúng với hàm lượng lớn có thể gây ô nhiễm môi trường và có tác hại xấu đến sức khỏe con người cũng như sinh vật. Trong những năm gần đây, tác động của ô nhiễm As lên sức khỏe cộng đồng đặc biệt là sức khỏe của trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ đang ngày càng trở thành vấn đề quan trọng trên thế giới. Glutathione S-transferase omega-1 (*GSTO1*) là enzyme khử độc giai đoạn II, tham gia xúc tác quá trình methyl hóa As. Sự sai khác giữa các As thành phần trong nước tiểu (MMA, DMA, AsB, iAs) ở mỗi cá thể có thể liên quan đến các đa hình di truyền. Để xác định những biến đổi đa hình nucleotide đơn trên gen *GSTO1*, kỹ thuật PCR-RFLP (đa hình độ dài đoạn hạn chế) đã được sử dụng. Kiểu gen của 150 mẫu máu cuống rốn tại các vị trí đa hình *GSTO1* Thr→Asn (rs15032), *GSTO1* Ala→Val (rs11509439) và *GSTO1* Ala→Asp (rs4925) được xác định. Phần mềm SPSS phiên bản 20 và các kiểm định thống kê như t-test, oneway ANOVA được sử dụng để đánh giá mối tương quan giữa đa hình gen *GSTO1* với phơi nhiễm As trước sinh. Kết quả cho thấy điểm đa hình *GSTO1* Ala→Asp (rs4925) có mối tương quan có ý nghĩa thống kê với tỉ lệ MMA/iAs với $p = 0,041$. Kiểu gen của đa hình *GSTO1* Ala→Asp (rs4925) được so sánh từng cặp bằng Anova- Tukey test cho thấy những cá thể mang kiểu gen AA có tỉ lệ MMA/iAs cao hơn cá thể mang kiểu gen CC, mối tương quan có ý nghĩa thống kê ($p = 0,044$), cao hơn hẳn cá thể có kiểu gen AC có ý nghĩa thống kê ($p = 0,046$). Do vậy, có thể những cá thể mang kiểu gen AA ở đa hình này có sự đào thải As cao hơn so với những cá thể mang kiểu gen CC và AC..

Từ khóa: Đa hình nucleotide đơn, *GSTO1*, PCR-RFLP, phân tích thống kê, phơi nhiễm arsenic

TỔNG QUAN

Arsenic (As) là thành phần tự nhiên của lớp trầm tích vỏ trái đất nên nó thường có mặt trong các tầng nước ngầm và nước mặt tuy chỉ ở hàm lượng thấp khoảng vài $\mu\text{g/L}$. Ở một số khu vực trên thế giới, nước ngầm có hàm lượng As rất cao do lớp trầm tích có cấu trúc, thành phần hóa học thuận lợi cho việc hoà tan As từ trầm tích ra tầng chứa nước. Việt Nam là một trong những nước nằm trong bản đồ ô nhiễm As nước ngầm trên thế giới. Theo báo cáo của UNICEF có khoảng 17 triệu người dân ở Việt Nam có nguy cơ bị phơi nhiễm với As trong nguồn nước ngầm (Trang, 2005; UNICEF, 2004). Các tổn thương liên quan đến sử dụng nước nhiễm As để ăn uống chủ yếu là: biến đổi sắc tố da, dày sừng, ung

thư da, ung thư bàng quang, các bệnh về thần kinh, thai sản... Các tổn thương bệnh lý này xuất hiện sớm hay muộn phụ thuộc chủ yếu vào lượng As vào cơ thể hàng ngày (Argos *et al.*, 2006; Rossman *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2004).

Các chỉ điểm sinh học như: As niệu, As tóc, As móng, As máu thường được sử dụng để đánh giá phơi nhiễm cho từng cá thể, trong đó As niệu là chỉ điểm sinh học được sử dụng nhiều nhất trong nghiên cứu dịch tễ học. Hàm lượng As tổng trong tóc, móng là chỉ điểm sinh học đánh giá mức phơi nhiễm As trung bình trong suốt thời gian dài. Hàm lượng As niệu tổng số để đánh giá mức độ phơi nhiễm As hiện tại. As thành phần trong nước tiểu, gồm As^{V} , As^{III} , MMA (monomethylarsenic), DMA (dimethyl arsenic) phản ánh khả năng methyl hóa As vô cơ và khả năng giải độc của cơ thể. Đối với trẻ sơ sinh, chỉ

số As trong máu cuống rốn được sử dụng để đánh giá phơi nhiễm của trẻ thông qua phơi nhiễm của mẹ trong suốt thời kỳ mang thai. Khi sử dụng nguồn nước ô nhiễm As để ăn uống, sinh hoạt, chất hóa học này nhanh chóng qua nhau thai vào máu con làm tăng nguy cơ xảy thai, sinh non, tử vong sơ sinh hoặc gây giảm cân ở trẻ sơ sinh dù chỉ phơi nhiễm ở một lượng rất nhỏ (McCarty *et al.*, 2007). Một nghiên cứu trên 29.134 các bà mẹ có thai ở Bangladesh cho thấy có sự liên quan đáng kể giữa phơi nhiễm As thời kỳ trước sinh và số trẻ còn sống sau sinh. Những đứa trẻ được sinh ra và các bà mẹ phơi nhiễm với As trong nước uống với mức cao hơn 50 µg/L trong thời kỳ thai nghén có sự tăng đáng kể sảy thai và trẻ chết trong năm đầu tiên (Rahman *et al.*, 2010).

Gần đây, những nghiên cứu dịch tễ học cho thấy rằng có sự khác biệt lớn giữa các cá thể trong nhiễm độc As (Pierce *et al.*, 2012). Điều này cho thấy, yếu tố di truyền có vai trò tạo ra sự khác biệt trong đáp ứng nhiễm độc As. Một số nghiên cứu cho thấy vai trò của đa hình di truyền đến nhiễm độc As liên quan đến các gen mã hóa enzyme chuyển hóa As và khử độc, bao gồm các enzyme *AS3MT* (As (III) methyltransferase), *GST* (glutathione S-transferase) và *MTHFR* (metylenetetrahydrofolate reductase) (Chung *et al.*, 2009; Schlawicke Engstrom *et al.*, 2007; Valenzuela *et al.*, 2009). Ngoài ra, một số đa hình di truyền nucleotid đơn có tính đặc hiệu (SNPs) ở các gen tham gia mã hóa yếu tố sửa chữa ADN (ví dụ, gen *hOGGI*, *APE1*, *XRCC1*, *XRCC3*) được chứng minh là giảm khả năng sửa chữa do các tổn thương oxy hóa gây ra bởi As (Fujihara *et al.*, 2011; Kundu *et al.*, 2011).

GST (Glutathione S-transferase) là một enzyme có tác dụng khử các chất độc ngoại lai bằng việc xúc tác các glutathione khử và được mã hoá bởi gen *GST*, nằm trên chromosome 10q25.1, dài khoảng 877bps, gồm 7 intron và 6 exon. Họ enzyme *GST* bao gồm 7 phân lớp α , μ , ω , π , θ , σ , và ζ , trong đó *GSTO1* (Glutathione S-transferase Omega 1) thuộc phân lớp ω . Trong số các đồng phân *GSTO*, *GSTO1* liên quan tới sự khử arsenate (As^V), acid monomethylarsonic (MMA^V), và acid dimethylarsonic (DMA^V) (Mukherjee *et al.*, 2006). Trong nghiên cứu đa hình di truyền các thành viên của họ *GST*, *GSTO1*, *GSTO2*, *GSTM1*, *GSTP1*, và *GSTT1* ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa As trong cư dân đồng bằng sông Hồng, Việt Nam. Ảnh hưởng của đa hình di truyền trong *GSTs* và các yếu tố khác (giới tính, tuổi, chỉ số khối cơ thể, As trong nước uống) cũng liên quan đến quá trình chuyển hóa As trong dân cư Việt Nam. Nhiều nhà nghiên cứu cũng ghi nhận lại sự liên quan của đa

hình kiểu gen trong *GSTO1/O2* tới quá trình trao đổi chất As bằng các phân tích *in vitro* (Agusa *et al.*, 2010; Chiou *et al.*, 1997; Tanaka-Kagawa *et al.*, 2003) và trong nghiên cứu ở người (Agusa *et al.*, 2010; Chiou *et al.*, 1997; Mukherjee *et al.*, 2006; Paiva *et al.*, 2010; Pulliero *et al.*, 2015; Tanaka-Kagawa *et al.*, 2003). Ngoài ra, có nhiều ghi nhận đưa ra sự kết hợp có ý nghĩa sự đa hình đơn (SNPs) trong *GST* π (*GSTP1*) và giữa kiểu gen đại/cảm trong *GST* μ (*GSTM1*) và *GST* θ (*GSTT1*) với chuyển hóa sinh học của As (Marcos *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2006).

Trong nghiên cứu này, những biến đổi đa hình gen *GSTO1* được xác định, tạo cơ sở dữ liệu cho việc đánh giá mối tương quan giữa đa hình gen này với phơi nhiễm As trước sinh bằng các chỉ số As tổng trong máu và tóc con cũng như các As thành phần trong nước tiểu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

Tất cả các đối tượng nghiên cứu hiểu rõ mục đích, ý nghĩa và có bản cam kết tình nguyện tham gia nghiên cứu. Họ có thể rút lui khỏi nghiên cứu bất cứ lúc nào họ muốn.

Nghiên cứu được sự chấp thuận của lãnh đạo địa phương, trung tâm y tế dự phòng tỉnh, các huyện, trạm y tế các xã được chọn vào nghiên cứu.

Vật liệu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu trên 150 phụ nữ mang thai và con của họ chia 2 nhóm:

Nhóm phụ nữ đang mang thai nghiên cứu (Nhóm NC, n=100): Chọn phụ nữ đang mang thai sống trong các xã có nguồn nước bị ô nhiễm As tối thiểu là 1 năm, có độ tuổi từ 18 – 40, nồng độ As trong nước ăn uống của hộ gia đình cao hơn giới hạn tiêu chuẩn cho phép (>10µg/L).

Nhóm phụ nữ mang thai đối chứng (nhóm ĐC, n=50): Chọn các phụ nữ đang mang thai sống trong các xã có nguồn nước không bị ô nhiễm As, nồng độ As trong nước ăn uống nằm trong tiêu chuẩn cho phép (<10µg/L), chưa từng sống tại vùng bị ô nhiễm As, có tuổi, học vấn, kinh tế tương đồng với nhóm nghiên cứu.

Địa điểm nghiên cứu:

Xã có nước ngầm bị ô nhiễm As cao: Chính Lý, Văn Lý (huyện Lý Nhân), Nhật Tân, Hoàng Tây

(huyện Kim Bảng) - tỉnh Hà Nam. Xã có nước ngầm không bị ô nhiễm As: Thi Sơn, Ngọc Sơn (huyện Kim Bảng) – tỉnh Hà Nam.

Kỹ thuật lấy mẫu và bảo quản mẫu

Mẫu nước tiểu: Thu 50ml nước tiểu vào cốc lấy mẫu. Chuyển 1ml nước tiểu vào tuýp có chứa 8 µmol DDDC (Diethylthiocarbamic acid) để phân tích các chất chuyển hóa trong nước tiểu. Chuyển 30 ml nước tiểu vào lọ nhựa để phân tích hàm lượng As tổng số. Tất cả các mẫu nước tiểu được bảo quản lạnh khi vận chuyển và bảo quản ở -20⁰C cho đến khi phân tích.

Mẫu tóc: Cắt 0,5 -1g tóc trẻ ngay sau khi sinh (nếu có đủ tóc) hoặc lúc trẻ từ 1-3 tháng tuổi cho vào túi nilong có khóa kéo, bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Mẫu máu cuống rốn: Lấy mẫu sau khi đã chuyển trẻ mới sinh đi và trước khi sơ rau thai trong vòng 2 – 3 phút. Hứng 10ml máu và tuýp có thể tích 15 ml có chất chống đông EDTA, vận nắp kín, lắc nhẹ vài lần để chống đông hoàn toàn. Bảo quản mẫu ở -20⁰C.

Các hóa chất thông dụng dùng trong sinh học phân tử thuộc các hãng Sigma, Merck, Fermentas. Các cặp mồi đặc hiệu được cung cấp bởi hãng Integrated DNA Technologies. Các enzyme *MseI*, *StuI*, *Cac8I* được nhập của hãng New England Biolabs.

Bảng 1. Điểm đa hình nucleotide đơn, trình tự cặp mồi, enzyme giới hạn và kích thước các đoạn cắt (Agusa *et al.*, 2009).

SNP ID	Thay đổi nucleotit	Thay đổi amino acid	Trình tự mồi (5' → 3')	Enzyme giới hạn	Kích thước các đoạn cắt (bp)
rs15032	C/A	Thr→Asn	F: GACCTAGCTCACACCTTTCAT R: CACCGTTTGGCTGTTGATGTC (G4)	<i>MseI</i>	CC: 333 CA: 114, 219, 333 AA: 114, 219
rs11509439	C/T	Ala→Val	F: CTGTGATGTCATCCTAGTTG R: CATGCAACCTGAACCTTGGT (G5)	<i>StuI</i>	CC: 116, 192 CT: 116, 192, 308 TT: 308
rs4925	C/A	Ala→Asp	F: GAACTTGATGCACCCTTGGT R: TGATAGCTAGGAGAAATAATTAC (G1)	<i>Cac8I</i>	CC: 186, 68 CA: 254, 186, 68 AA: 254

Phương pháp

Kỹ thuật phân tích As

Xét nghiệm As thành phần trong nước tiểu bằng ICP-MS kết nối HPLC: Mẫu nước tiểu được pha loãng từ 5 – 10 lần với đệm pha động, lọc mẫu bằng xylanh có màng lọc 0,45µm. Mẫu chuẩn nước tiểu CRM (NIST 2669) lọc rồi dẫn lên cột lặp lại 3 lần. Mẫu được hút qua hệ thống HPLC với nhiệt độ cột là 50⁰C. Mẫu phân tích sau khi qua cột được tách thành các thành phần được chuyển trực tiếp vào phân tích bằng hệ thống ICP-MS .

Xét nghiệm As trong tóc: Cân khoảng 0,5g mẫu, rửa sạch bằng acetone và dung dịch 1% trixton X-100 nhiều lần cho đến khi sạch. Sau đó mẫu được vô cơ hóa với hỗn hợp acid (HNO₃; H₂SO₄; HClO₄) trong lò vi sóng 15 phút, hoặc đun cách cát cho tới khi các chất hữu cơ bị phân hủy hoàn toàn. Loại axit dư bằng cách tiếp tục đun với dung dịch amoni-oxalat cho tới hết khói trắng. Cặn mẫu được hòa tan trong nước cất rồi thực hiện các bước đo mẫu bằng hệ thống AAS.

Xét nghiệm As máu cuống rốn bằng ICP-MS: Máu cuống rốn sau khi được vô cơ hóa tạo thành dạng dung dịch. Dung dịch mẫu được bơm nhu động đưa vào bộ tạo hơi, khí mang argon đưa hơi vào buồng đốt. Tại buồng đốt dùng dòng cao tần tạo khối plasma. Khối hơi được ion hoá ở nhiệt độ cao (trên 3500⁰C). Chùm ion được đẩy qua lỗ của các lớp lọc vào detector khối phổ. Dưới tác dụng của bộ tứ cực, các chùm ion chuyển động trong điện trường tạo ra độ lệch khác nhau và detector nhận biết theo từng số khối. Tín hiệu đo tích phân theo thời gian được ghi lại bằng phần mềm của thiết bị và tỉ lệ với nồng độ các nguyên tố trong thành phần mẫu đo. Hàm lượng nguyên tố được tính toán dựa theo đồ thị chuẩn.

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu cuống rốn bằng kit GeneJETTM Genomic DNA Purification của hãng Fermentas.

Nhân gen bằng phương pháp PCR

PCR được thực hiện trong tổng thể tích 50 μ l bao gồm 1X Dream Tag Buffer, 10mM dNTP, 10 pmol mỗi mỗi, 2U Dream Taq DNA polymerase và 40 ÷ 100 ng/ μ l DNA khuôn. Với mỗi mỗi đều áp dụng thành phần tương tự như trên để thu được những đoạn DNA mong muốn. Chu trình nhiệt cho mỗi đoạn gen như sau:

+ G1: 95°C/3'; 30 chu kì (95°C/1', 57°C/40'', 72°C/50''); 72°C/7' và giữ mẫu ở 8°C.

+ G4: 95°C/3'; 30 chu kì (95°C/1', 59°C/40'', 72°C/45''); 72°C/7' và giữ mẫu ở 8°C.

+ G5: 95°C/3'; 30 chu kì (95°C/1', 55°C/35'', 72°C/40''); 72°C/7' và giữ mẫu ở 8°C.

Xác định biến đổi đa hình bằng kỹ thuật PCR-RFLP

Phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzyme cắt giới hạn cho 20 μ l gồm các thành phần sau: 2 μ l RE buffer (1X), 10 μ l sản phẩm PCR (cô đặc từ 30 μ l sản phẩm PCR bằng Speedvac, 0,5 μ l (5 U/ μ l) enzyme và 7,5 μ l H₂O. Hỗn hợp được ủ qua đêm ở 37°C. Kết quả sản phẩm cắt enzyme hạn chế được kiểm tra trên gel agarose 3%, nhuộm bằng Ethidium bromide và phát hiện dưới ánh sáng UV. Mô tả về các điểm đa hình, trình tự mỗi, enzyme cắt và kích thước các đoạn cắt được thể hiện ở bảng 1.

Phân tích xử lý số liệu

Nhập và xử lý số liệu bằng phần mềm excel và SPSS version 20.0. Các số liệu sau đó được kiểm định thống kê: Test khi bình phương (so sánh 2 tỷ lệ), t- test (so sánh 2 giá trị trung bình), One way ANOVA: Post- hoc multiple comparision (Tukey) - so sánh nhiều giá trị trung bình, phân tích hồi quy đơn biến (simple linear regression analysis).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích đa hình gen *GSTO1*

Gen *GSTO1* chứa điểm đa hình tại vị trí 28276 (rs4925) mà tại đó base C của thể hoang dại bị thay thế bởi base A dẫn đến sự thay đổi amino acid Ala → Asp. Trình tự cắt của enzyme hạn chế *Cac8I* phù hợp với trường hợp base C tại vị trí đa hình nên thể hoang dại bị cắt bởi enzyme này còn thể đột biến sẽ không bị cắt. Dựa vào trình tự cắt của enzyme hạn chế, kết quả 1 băng thu được từ sản phẩm cắt của 17/146 mẫu (11,64%) với kích thước băng là 254 bp sẽ tương ứng với kiểu gen đồng hợp tử AA, kết quả 3 băng thu được từ sản phẩm cắt của 28/146 mẫu (19,18%) với kích thước lần lượt 254 bp, 186 bp và

68 bp tương ứng với kiểu gen dị hợp tử AC, còn lại kết quả 2 băng của 101/146 mẫu (69,18%) với kích thước các băng lần lượt là 186 bp và 68 bp sẽ tương ứng với kiểu gen đồng hợp tử CC.

Gen *GSTO1* chứa điểm đa hình tại vị trí 33304 (rs15032) mà tại đó base C của thể hoang dại bị thay thế bởi base A dẫn đến sự thay đổi amino acid Thr → Asn. Trình tự cắt của enzyme hạn chế *MseI* phù hợp với trường hợp base A tại vị trí đa hình nên thể hoang dại sẽ không bị cắt bởi enzyme này còn thể đột biến sẽ bị cắt. Sản phẩm PCR từ cặp mỗi G4 khi cắt bằng enzyme *MseI* sẽ thu được 3 kiểu gen CC, CA và AA. Theo lý thuyết kiểu gen CC có 1 băng kích thước khoảng 333 bp, CA thu được 3 băng có kích thước lần lượt là 114 bp, 219 bp, 333 bp, còn kiểu gen AA thu được 2 băng có kích thước 114 bp và 219 bp. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR từ cặp mỗi GST4 sử dụng enzyme giới hạn *MseI* thu được 1 băng có kích thước khoảng 333 bp tương ứng với kích thước của kiểu gen CC theo lý thuyết.

Ở người gen *GSTO1* chứa điểm đa hình SNP rs11509439 tại vị trí 32630 thuộc exon 9, tại điểm này, nucleotide ban đầu C bị chuyển thành T dẫn đến sự thay đổi amino acid Ala → Val. Trình tự cắt của enzyme hạn chế *StuI* phù hợp với trường hợp base C tại vị trí đa hình nên thể thể hoang dại sẽ bị cắt bởi enzyme này còn thể đột biến sẽ không bị cắt. Dựa vào trình tự cắt của enzyme hạn chế, kết quả 1 băng thu được từ sản phẩm cắt của 3/149 mẫu (2,1%) với kích thước băng là 308 bp sẽ tương ứng với kiểu gen đồng hợp tử TT, còn lại kết quả 2 băng của 146/149 mẫu (97,9%) với kích thước các băng lần lượt là 116 bp và 192 bp sẽ tương ứng với kiểu gen đồng hợp tử CC.

Tần xuất phân bố allele/kiểu gen

Tần xuất phân bố kiểu gen/allele của các điểm đa hình trên gen *GSTO1* được tính toán và tổng hợp trong bảng 2. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã không tìm thấy sự thay đổi nucleotide nào tại SNP *GSTO1* rs15032 (G4). Hầu như không có sự thay đổi nucleotide ở SNP rs11509439 (G5) đối với các mẫu trong nghiên cứu. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Agusa và cộng sự (2009), ông đã không tìm được allele đột biến xuất hiện ở SNP rs11509439 trên dân cư sống vùng Đồng bằng Sông Hồng. Tuy nhiên, Baidehi Mukherjee và cộng sự (2006) đã tìm ra được tần số đột biến gen trên SNP rs11509439 ở người Mỹ gốc Mexico là 0,05% nhưng không tìm được đột biến ở người Mỹ gốc Phi và người Mỹ gốc Trung Quốc (Mukherjee *et*

al., 2006). Tại điểm đa hình GSTO1 28279 (G1), tần xuất phân bố allele C là chủ yếu, chiếm 78,77% thấp hơn so với nghiên cứu của Agusa, tần xuất allele này chiếm đến 84%.

Bảng 2. Sự phân bố kiểu gen của các điểm đa hình nghiên cứu trên gen GSTO1.

Điểm đa hình	Phân bố kiểu gen			Phân bố allele		
	Kiểu gen	N	%	Allele	N	%
G5 (rs11509439)	CC	146	97,99	Allele T	6	2,01
	TT	3	2,01	Allele C	292	97,99
	Tổng	149	100	Tổng	298	100
G1 (rs4925)	AA	17	11,64	Allele A	62	21,23
	AC	28	19,18	Allele C	230	78,77
	CC	101	69,18	Tổng	292	100
	Tổng	146	100			
G4 (rs15032)	CC	150	100	Allele C	300	100
				Tổng	300	100

Mối tương quan giữa đa hình gen GSTO1 và phơi nhiễm As trước sinh

Để xác định mối tương quan giữa các đa hình này với phơi nhiễm As, phần mềm SPSS và các kiểm định thống kê như t-test, oneway ANOVA được sử dụng. Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hàm lượng As trong tóc và máu con với các vị trí đa hình nghiên cứu ($p > 0,05$) (Bảng 3).

Nồng độ As thành phần trong nước tiểu được sử dụng để đánh giá mức độ phơi nhiễm As và sự chuyển hóa của nó ở từng cá thể. Thông thường, tỉ lệ nồng độ của MMA/iAs và DMA/MMA trong nước tiểu lần lượt đặc trưng cho khả năng methyl hóa sơ cấp và thứ cấp. Một vài nghiên cứu bệnh học trước đó đã chỉ ra rằng những cá thể có phần trăm DMA (% DMA) cao trong nước tiểu thì có khả năng bài tiết As nhiều hơn bởi những cá thể này có khả năng methyl hóa As cao hơn (Agusa *et al.*, 2011). Ở Mexico những người đã tiếp xúc với As qua nước uống có thành phần các hợp chất trong nước tiểu bất thường; trong nước tiểu của người có gen GSTO1

28279 thay đổi Ala140Asp thì % As^{III} cao và % DMA^V thấp (Agusa *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu gần đây của Fu và cộng sự 2014 (Fu *et al.*, 2014) trên 155 cá thể sống ở khu vực có nồng độ As trong nước uống rất cao (lên đến 969 $\mu\text{g/L}$), dị hợp tử AC (Ala/Asp) ở vị trí đa hình GSTO1 28297 có % DMA thấp hơn đáng kể so với đồng hợp tử Ala/Ala. Kết quả phân tích mối tương quan giữa đa hình gen GSTO1 với các hàm lượng As thành phần cho thấy mối tương quan giữa đa hình gen GSTO1 Ala140Asp với tỷ lệ MMA/iAs ($p=0,041$) tức là đa hình này có ảnh hưởng đến sự methyl hóa As sơ cấp (Bảng 4). Đồng hợp tử AA có tỉ lệ MMA/iAs cao hơn nhiều ($M = 21,42$) so với đồng hợp tử CC ($M = 5,27$) và dị hợp tử AC ($M = 3,46$) nên những cá thể mang kiểu gen đồng hợp tử AA có khả năng methyl hóa sơ cấp cao hơn những cá thể mang các kiểu gen còn lại.

So sánh từng cặp các kiểu gen bằng ANOVA-Tukey test cho thấy mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa kiểu gen AA với CC ($p=0,044$) và AA với AC ($p=0,046$) (Bảng 5).

Bảng 3. Mối liên quan giữa hàm lượng As trong tóc, máu con với các vị trí địa hình.

GSTO132630 (G5)											
Hàm lượng As	CC			TT			TC			Tổng	p
	N	M	SD	N	M	SD	N	M	SD		
Tóc con	97	0,51	0,43	3	0,68	0,72	0			100	0,68
Máu con	97	6,74	2,54	3	0,15	2,05	0			100	0,15

GSTO128279 (G1)											
Hàm lượng As	CC			AC			AA			Tổng	p
	N	M	SD	N	M	SD	N	M	SD		
Tóc con	68	0,46	0,36	22	0,63	0,54	8	0,68	0,65	98	0,16
Máu con	68	6,87	2,57	22	6,96	2,57	8	6,55	2,42	98	0,93

Ghi chú: N: số lượng mẫu, M: giá trị trung bình, SD: độ lệch chuẩn, $p < 0,05$: có ý nghĩa thống kê.

Bảng 4. Mối liên quan giữa As thành phần và kiểu gen.

Điểm địa hình	Kiểu gen	Tỷ lệ As thành phần								DMA/MMA		MMA/iAs	
		Tỷ lệ AsB		%DMA		%MMA		%iAs		n	M	n	M
		n	M	n	M	n	M	n	M				
GST 5 (GSTO1 32630)	CC	97	9,28	97	71,33	97	12,26	97	7,13	95	7,93	87	6,42
	TT	3	2,20	3	81,17	3	12,11	3	4,52	3	8,01	2	1,40
	<i>p</i>	0,396		0,301		0,975		0,639		0,974		0,698	
GST 1 (GSTO1 28279)	CC	68	8,20	68	71,64	68	12,69	68	7,48	67	7,75	61	5,27
	AC	22	13,49	22	70,04	22	10,96	22	5,51	22	8,59	19	3,46
	AA	8	5,34	8	73,08	8	12,42	8	9,16	7	7,16	8	21,42
<i>p</i>	0,236		0,882		0,695		0,581		0,670		0,041		

Bảng 5. So sánh MMA/iAs giữa các kiểu gen bằng ANOVA-Turkey test.

(I) gst1g	(J) gst1g	M Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
CC	AC	1,80897	4,62034	0,919	-9,2126	12,8306
	AA	-16,15061 [*]	6,61279	0,044	-31,9251	-0,3761
AC	CC	-1,80897	4,62034	0,919	-12,8306	9,2126
	AA	-17,95958 [*]	7,41192	0,046	-35,6404	-0,2788
AA	CC	16,15061 [*]	6,61279	0,044	0,3761	31,9251
	AC	17,95958 [*]	7,41192	0,046	0,2788	35,6404

Ghi chú: *. $p < 0,05$: có ý nghĩa thống kê.

KẾT LUẬN

Kiểu gen tại các vị trí đa hình và tần suất phân bố của các kiểu gen/allele của gen *GSTO1* đã được xác định bằng phương pháp PCR-RFLP trên 150 mẫu máu cuống rốn (100 mẫu nghiên cứu và 50 mẫu đối chứng). Xu hướng phân bố các allele ở ba điểm đa hình trong nghiên cứu này ở người Việt Nam giống với các chủng tộc khác trên thế giới đã công bố. Điểm đa hình *GSTO1* 28279 có mối tương quan có ý nghĩa thống kê với tỉ lệ MMA/iAs ($p = 0,041$). Đối với những cá thể mang kiểu gen AA ở đa hình *GSTO1* 28279 có tỉ lệ MMA/iAs cao hơn hẳn so với hai kiểu gen còn lại ($M = 21,42$). Tỉ lệ MMA/iAs đặc trưng cho khả năng methyl hóa sơ cấp, do vậy có thể nói với những cá thể mang kiểu gen AA ở đa hình này có sự bài tiết As cao hơn (quá trình giải độc As tốt hơn) kiểu gen CC và AC.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ cho đề tài “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật tiên tiến để đánh giá sự biến đổi về nhiễm sắc thể và gen ở trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm arsenic trước sinh” mã số: KC.10.04/11-15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agusa T, Fujihara J, Takeshita H, Iwata H (2011) Individual variations in inorganic arsenic metabolism associated with AS3MT genetic polymorphisms. *Int J Mol Sci* 12: 2351-2382.

Agusa T, Iwata H, Fujihara J, Kunito T, Takeshita H, Minh TB, Trang PT, Viet PH, Tanabe S (2009) Genetic polymorphisms in AS3MT and arsenic metabolism in residents of the Red River Delta, Vietnam. *Toxicol Appl Pharmacol* 236: 131-141.

Agusa T, Iwata H, Fujihara J, Kunito T, Takeshita H, Minh TB, Trang PT, Viet PH, Tanabe S (2010) Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase (GST) superfamily and arsenic metabolism in residents of the Red River Delta, Vietnam. *Toxicol Appl Pharmacol* 242: 352-362.

Argos M, Kibriya MG, Parvez F, Jasmine F, Rakibuz-Zaman M, Ahsan H (2006) Gene expression profiles in peripheral lymphocytes by arsenic exposure and skin lesion status in a Bangladeshi population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1367-1375.

Chiou HY, Hsueh YM, Hsieh LL, Hsu LI, Hsu YH, Hsieh FI, Wei ML, Chen HC, Yang HT, Leu LC, et al. (1997) Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among

current arsenic-exposed residents in Taiwan. *Mutat Res* 386: 197-207.

Chung CJ, Hsueh YM, Bai CH, Huang YK, Huang YL, Yang MH, and Chen CJ (2009) Polymorphisms in arsenic metabolism genes, urinary arsenic methylation profile and cancer. *Cancer Causes Control* 20: 1653-1661.

Fu S, Wu J, Li Y, Liu Y, Gao Y, Yao F, Qiu C, Song L, Wu Y, Liao Y, Sun D (2014) Urinary arsenic metabolism in a Western Chinese population exposed to high-dose inorganic arsenic in drinking water: influence of ethnicity and genetic polymorphisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 274: 117-123.

Fujihara J, Soejima M, Yasuda T, Koda Y, Kunito T, Iwata H, Tanabe S, Takeshita H (2011) Polymorphic trial in oxidative damage of arsenic exposed Vietnamese. *Toxicol Appl Pharmacol* 256: 174-178.

Kundu M, Ghosh P, Mitra S, Das JK, Sau TJ, Banerjee S, States JC, Giri AK (2011) Precancerous and non-cancer disease endpoints of chronic arsenic exposure: the level of chromosomal damage and XRCC3 T241M polymorphism. *Mutat Res* 706: 7-12.

Marcos R, Martinez V, Hernandez A, Creus A, Sekaran C, Tokunaga H, Quinteros D (2006) Metabolic profile in workers occupationally exposed to arsenic: role of GST polymorphisms. *J Occup Environ Med* 48: 334-341.

McCarty KM, Chen YC, Quamruzzaman Q, Rahman M, Mahiuddin G, Hsueh YM, Su L, Smith T, Ryan L, Christiani DC (2007) Arsenic methylation, GSTT1, GSTM1, GSTP1 polymorphisms, and skin lesions. *Environ Health Perspect* 115: 341-345.

Mukherjee B, Salavaggione OE, Pelleycounter LL, Moon I, Eckloff BW, Schaid DJ, Wieben ED, Weinsilboum RM (2006) Glutathione S-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos* 34: 1237-1246.

Paiva L, Hernandez A, Martinez V, Creus A, Quinteros D, Marcos R (2010) Association between *GSTO2* polymorphism and the urinary arsenic profile in copper industry workers. *Environ Res* 110: 463-468.

Pierce BL, Kibriya MG, Tong L, Jasmine F, Argos M, Roy S, Paul-Brutus R, Rahaman R, Rakibuz-Zaman M, Parvez F, et al., (2012). Genome-wide association study identifies chromosome 10q24.32 variants associated with arsenic metabolism and toxicity phenotypes in Bangladesh. *PLoS Genet* 8, e1002522.

Pulliero A, Godschalk R, Andreassi MG, Curfs D, Van Schooten FJ, Izzotti A (2015) Environmental carcinogens and mutational pathways in atherosclerosis. *Int J Hyg Environ Health*.

Rahman A, Persson LA, Nermell B, El Arifeen S, Ekstrom EC, Smith AH, Vahter M (2010) Arsenic exposure and risk of spontaneous abortion, stillbirth, and infant mortality. *Epidemiology* 21: 797-804.

- Rossman TG, Uddin AN, Burns FJ (2004) Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 394-404.
- Schlawicke Engstrom K, Broberg K, Concha G, Nermell B, Warholm M, Vahter M (2007) Genetic polymorphisms influencing arsenic metabolism: evidence from Argentina. *Environ Health Perspect* 115: 599-605.
- Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Hasegawa T, Makino Y, Seko Y, Hanioka N, Ando M (2003) Functional characterization of two variant human GSTO 1-1s (Ala140Asp and Thr217Asn). *Biochem Biophys Res Commun* 301: 516-520.
- Trang PTK (2005) Nhiễm độc lâu dài Arsen do dùng nước giếng khoan tại một số khu vực thuộc đồng bằng sông Hồng và sông Mê công. *Y học thực hành* 9/2005: 14-16.
- UNICEF (2004) Ô nhiễm thạch tín trong nguồn nước sinh hoạt ở Việt Nam, khái quát tình hình & các biện pháp giảm thiểu cần thiết. 10/2004.
- Valenzuela OL, Drobna Z, Hernandez-Castellanos E, Sanchez-Pena LC, Garcia-Vargas G G, Borja-Aburto VH, Styblo M, Del Razo LM (2009) Association of AS3MT polymorphisms and the risk of premalignant arsenic skin lesions. *Toxicol Appl Pharmacol* 239: 200-207.
- Yoshida T, Yamauchi H, Fan Sun G (2004) Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 243-252.
- Zhong SL, Zhou SF, Chen X, Chan SY, Chan E, Ng KY, Duan W, Huang M (2006) Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. *Eur J Pharm Sci* 28: 77-85.

THE ASSOCIATION BETWEEN GSTO1 POLYMORPHISMS AND ARSENIC METHYLATION OF PRENATAL ARSENIC EXPOSED INFANTS

Tạ Thị Bình¹, Trần Phương Thảo², Nguyễn Khắc Hải¹, Nguyễn Huy Hoàng²

¹National Institute of Occupational and Environmental health

²Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The trace element arsenic naturally presents in the environment. Arsenic is the essential factor to the human body at low level, however it causes environmental pollution and have negative effects to health at high level. Recently, arsenic contamination as well as its effects on public health, especially infants and children is increasingly becoming important and serious issues in worldwide. Glutathione S-transferase omega-1 (GSTO1) is a phase II enzymatic detoxification of xenobiotics in variety of animals including humans; to catalyze the arsenic methylation. The difference of urinary arsenic component in each individual may relate to the genetic polymorphism. To evaluate the variations of single nucleotide polymorphisms of GSTO1, PCR-RFLP technology was utilized. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotype of 150 cohort blood samples at GSTO1 Thr→Asn (rs15032), GSTO1 Ala→Val (rs11509439) and GSTO1 Ala→Asp (rs4925) were detected. The association between GSTO1 polymorphisms and prenatal arsenic exposure was evaluated by statistical analysis such as SPSS software version 20, t-test and oneway ANOVA. The results showed that GSTO1 Ala→Asp (rs4925) was statistically associated with MMA/iAs ($p = 0.041$). Differences between ratio of MMA/iAs and genotypes were checked by Tukey-Kramer method, along with oneway ANOVA showed that Individuals taking the AA genotype had higher MMA/ iAs ratio than individuals carrying the CC genotype, with a statistically significant association ($p = 0.044$), also clearly higher than the individuals carrying AC genotype, significant at $p = 0.046$. Therefore, it is possible that individuals carrying the AA genotype in the polymorphism have higher arsenic excretion than individuals with CC and AC genotypes

Keywords: Arsenic exposure, GSTO1, PCR-RFLP, single nucleotide polymorphism, statistically analysis