

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/339477910>

# THE DNA METHYLATION STATUS IN PRESENT DAY POPULATIONS LIVING IN AREAS OF VIETNAM SUBJECTED TO AGENT ORANGE SPRAYING DURING THE WAR IN NAM DONG AND A LUOI, THUA THIEN HUE PROVINCE

Article in *Journal of Medicine and Pharmacy* · April 2018

DOI: 10.34071/jmp.2018.2.10

CITATIONS

0

READS

165

6 authors, including:



**Thanh Tin Nguyen**

Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

9 PUBLICATIONS 7 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Triet Phan Minh Le**

Hue College of Medicine and Pharmacy

3 PUBLICATIONS 12 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Cristina Giuliani**

University of Bologna

79 PUBLICATIONS 2,637 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Donata Luiselli**

University of Bologna

431 PUBLICATIONS 5,850 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



The Ethiopian Genome Project [View project](#)



Unilateral labyrinthectomy and galvanic vestibular stimulation [View project](#)

# NGHIÊN CỨU SỰ BIẾN ĐỔI TÌNH TRẠNG METHYL HÓA DNA GENE CYP1A1 CỦA CÁC CƯ DÂN HIỆN ĐANG SỐNG Ở CÁC VÙNG NHIỄM CHẤT ĐỘC MÀU DA CAM ĐƯỢC RẢI TRONG THỜI KỲ CHIẾN TRANH TẠI HUYỆN A LƯỚI VÀ NAM ĐÔNG, THỪA THIÊN HUẾ

Nguyễn Thành Tín<sup>1</sup>, Lê Phan Minh Triết<sup>1</sup>, Nguyễn Việt Nhân<sup>1</sup>,  
Cristina Giuliani<sup>2</sup>, Donata Luiselli<sup>2</sup>, Giovanni Romeo<sup>2</sup>

(1) Trường Đại học Y Dược Huế; (2) Trường Đại học Bologna Ý

## Tóm tắt

**Đặt vấn đề:** Chất độc màu da cam là hóa chất diệt cỏ được sử dụng phổ biến nhất để rải trên lãnh thổ Việt Nam trong chiến tranh. Phụ phẩm của nó, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-paradioxin (Dioxin), là chất cực độc khó phân hủy. Ảnh hưởng của chất diệt cỏ này lên sức khỏe của người Việt Nam và cựu binh Mỹ đã được đề cập trong nhiều nghiên cứu. Tuy nhiên, nghiên cứu về những tác động ở mức độ phân tử của Dioxin tồn lưu trong môi trường trên các cư dân Việt Nam hiện nay sinh sống trong vùng nhiễm vẫn chưa được thực hiện. **Mục tiêu:** Đánh giá mối liên hệ giữa chất độc màu da cam/Dioxin tồn lưu trong môi trường và những sự thay đổi tình trạng methyl hóa DNA (Deoxyribonucleic acid) trong máu ngoại vi của cư dân Việt Nam hiện đang sinh sống ở các vùng bị nhiễm. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang. Đối tượng nghiên cứu là 188 đối tượng đến khám chữa bệnh tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế: 94 đối tượng cho nhóm nghiên cứu từ vùng rải (A Lưới và Nam Đông, Thừa Thiên Huế) và 94 đối tượng cho nhóm đối chứng từ vùng không rải (từ Quảng Bình trở ra Bắc). Sử dụng phương pháp MALDI-TOF MS khảo sát sự biến đổi tình trạng methyl hóa DNA trên gene CYP1A1. **Kết quả:** Với 22 đảo CpG của gene CYP1A1 được khảo sát, có sự giảm methyl hóa tại đảo CpG\_2.3.4, đảo CpG\_5, đảo CpG\_12.13 ở nhóm cư dân sinh sống ở Nam Đông, A Lưới so với nhóm đối chứng ( $p < 0,05$ ). Sự giảm methyl hóa DNA ở phân nhóm CASES\_F\_P so với cả phân nhóm CASES\_NON\_F\_P và nhóm đối chứng xảy ra ở nhiều vị trí: đảo CpG\_2.3.4, đảo CpG\_5, đảo CpG\_9, đảo CpG\_10, đảo CpG\_11, đảo CpG\_12.13, đảo CpG\_17, đảo CpG\_18.19 ( $p < 0,05$ ). **Kết luận:** Nhóm cư dân sinh sống tại A Lưới, Nam Đông - vùng bị nhiễm Dioxin - có sự giảm methyl hóa DNA ở gene CYP1A1. Nhưng sự giảm methyl hóa ở nhóm này dường như không phải do tác động của Dioxin tồn lưu trong môi trường hiện nay mà nhiều khả năng đã được di truyền bằng con đường biểu sinh từ những biến đổi methyl hóa DNA của thế hệ bố mẹ, những người phơi nhiễm trực tiếp với Dioxin trong thời kì rải chất độc hóa học chiến tranh. Giả thiết này cần sự kiểm chứng qua các nghiên cứu mở rộng với thân nhân của phân nhóm CASES\_F\_P và số lượng gene khảo sát nhiều hơn.

**Từ khóa:** Chất độc màu da cam, Dioxin, methyl hóa DNA, CYP1A1

## Abstract

# THE DNA METHYLATION STATUS IN PRESENT DAY POPULATIONS LIVING IN AREAS OF VIETNAM SUBJECTED TO AGENT ORANGE SPRAYING DURING THE WAR IN NAM DONG AND A LUOI, THUA THIEN HUE PROVINCE

Nguyen Thanh Tin<sup>1</sup>, Le Phan Minh Triet<sup>1</sup>, Nguyen Viet Nhan<sup>1</sup>,  
Cristina Giuliani<sup>2</sup>, Donata Luiselli<sup>2</sup>, Giovanni Romeo<sup>2</sup>

(1) Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) University of Bologna, Italia

**Introduction:** Agent Orange was the most extensively used among herbicides sprayed on Vietnam territory during the Vietnam War. Its by-product, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-paradioxin (Dioxin), is an extremely toxic and persistent chemical. The effects of this spraying on both Vietnamese and United States Veterans health has been reported in many publications. However, there wasn't any study of the effects at the molecular level of the residual Dioxin in the environment on present Vietnamese civilians living in contaminated areas. **Objective:** To investigate the

Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Thành Tín, email: thanhtin167@gmail.com

Ngày nhận bài: 6/12/2017, Ngày đồng ý đăng: 20/3/2018; Ngày xuất bản: 27/4/2018

DOI: 10.34071/jmp.2018.2.10

association between residual Agent Orange/Dioxin in the environment and the alterations of DNA methylation in the peripheral blood of the present day Vietnamese population living in spraying areas. **Methods:** Cross-sectional study. The subjects were 188 individuals who came to Hue University Hospital for health care: 94 individuals for case group from sprayed areas (A Luoi and Nam Dong, Thua Thien Hue Province), and 94 individuals for the control group from non-sprayed areas (Quang Binh to North Vietnam). MALDI-TOF MS technique was used to detect the alterations of DNA methylation of CYP1A1 gene. **Results:** Among 22 CpG position of CYP1A1 gene were investigated, there were the DNA hypomethylation at CpG\_2.3.4, CpG\_5, CpG\_12.13 in case group compared to the control ( $p < 0.05$ ). After dividing case group into 2 subgroups, we found the significant DNA hypomethylation at CpG\_2.3.4, CpG\_5, CpG\_9, CpG\_10, CpG\_11, CpG\_12.13, CpG\_17, CpG\_18.19 in subgroup CASES\_F\_P compared to CASES\_NON\_F\_P also control group ( $p < 0.05$ ). **Conclusions:** Individuals living in A Luoi and Nam Dong– the Dioxin contaminated areas– had DNA hypomethylation in CYP1A1 gene. The DNA hypomethylation seem not due to the effects of residual Dioxin in the environment in present day, it was likely to be inherited by epigenetic way from the DNA methylation alterations on their parents who had directly exposure to that spraying. This theory should be verified through extensive studies with CASES\_F\_P family and more genes will be investigated.

**Key words:** Agent Orange, Dioxin, DNA methylation CYP1A1

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong chiến dịch Ranch Hand (1961-1972), 74 triệu lít chất diệt cỏ đã được rải xuống lãnh thổ Việt Nam nhằm làm rụng lá rừng và phá hủy mùa màng. Các chất diệt cỏ được gọi tên theo màu sơn của thùng chứa. Trong số đó, chất độc màu da cam được sử dụng nhiều nhất, chiếm khoảng 58% tổng lượng.

**Bảng 1.** Số lượng ước tính các loại chất độc hóa học được rải xuống Việt Nam (1961-1972)[1]

| Chất diệt cỏ | Thành phần      | Số thùng | Số lít     | Năm sử dụng |
|--------------|-----------------|----------|------------|-------------|
| Xanh lá      | 2,4,5-T         | 365      | 75,920     | 1962        |
| Hồng         | 2,4,5-T         | 1,315    | 273,52     | 1961-63     |
| Tím          | 2,4-D; 2,4,5-T  | 12,475   | 2,594,800  | 1962-65     |
| Xanh dương   | Cacodylic Acid  | 29,330   | 6,100,640  | 1966-72     |
| Trắng        | 2,4-D; Picloram | 104,800  | 21,798,400 | 1966-72     |
| Da cam       | 2,4-D; 2,4,5-T  | 208,330  | 43,332,640 | 1965-70     |
| Tổng         |                 | 356,615  | 74,175,920 | 1961-72     |

Chất độc màu da cam là hỗn hợp 50/50 của 2,4-D và 2,4,5-T. Độc tính nguy hiểm của nó được gây nên bởi phụ phẩm của 2,4,5-T có tên là Dioxin, hóa chất nhân tạo kích độc [2] và tồn lưu rất lâu trong môi trường [3]. Về mặt lâm sàng, các nghiên cứu đã liệt kê hàng loạt các rối loạn/bệnh lý liên quan đến việc phơi nhiễm Dioxin: ung thư mô liên kết, lymphoma, đa u tủy, suy giảm miễn dịch,...[4] [5] [6] [7] và khuyết tật bẩm sinh ở các thế hệ sau [6] [8]. Về mặt sinh học phân tử, sau khi được hấp thu vào cơ thể, Dioxin gắn vào aryl hydrocarbon receptor, qua đó tác động lên hệ thống cytochrome P450 và gây nên hàng loạt tác động sinh học có hại [9] [10] [11]. Về mặt di truyền, sự tác động lên nhiễm sắc thể chưa được chứng minh [12], nhưng đã tìm thấy sự tác động lên sự methyl hóa của DNA [13] [14]. Người ta đã ước tính 10% diện tích miền Nam Việt Nam và khoảng 2,1 - 4,8 triệu người dân [7] phơi nhiễm với thảm họa Dioxin lớn nhất từng được ghi nhận trong lịch sử: khoảng 366 kg [15] đến 680 kg [16]. Huyện A Lưới và Nam Đông lâu nay vẫn là điểm

nóng về Dioxin [16] sẽ là địa điểm lý tưởng cho các nghiên cứu đánh giá tác động của Dioxin lên môi trường, sức khỏe con người.

Methyl hóa DNA, sự gắn nhóm methyl vào Cytosin trong Cytosin-phosphate- Guanin (đảo CpG) là 1 sự biến đổi biểu sinh đóng vai trò quan trọng trong điều hòa sự biểu hiện gen[17]. Các yếu tố môi trường bên ngoài tác động mạnh mẽ lên sự methyl hóa DNA [18], qua đó ảnh hưởng lên sự chuyển hóa, phát triển và sức khỏe của cá thể đó và cả các thế hệ sau [17]. Cùng với ra đời của các kỹ thuật hiện đại, đặc biệt là MALDI-TOF MS, sự methyl hóa DNA đang trở thành công cụ quan trọng để nghiên cứu sự ảnh hưởng của môi trường lên sức khỏe con người [19].

Trong đề tài này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật MALDI-TOF MS để khảo sát sự thay đổi sự methyl hóa DNA 1 đoạn của gene CYP1A1. Qua đó đánh giá những ảnh hưởng của sự phơi nhiễm Dioxin tồn lưu trong môi trường lên người dân sống ở 2 huyện A Lưới và Nam Đông, Thừa Thiên Huế.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

**2.2. Đối tượng nghiên cứu:** Các đối tượng đến khám chữa bệnh tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế từ tháng 6/2016 đến tháng 8/2016.

**Tiêu chuẩn chọn mẫu:** - Đồng ý tham gia nghiên cứu. - Thỏa mãn yêu cầu về địa dư: + Sinh sống tại huyện A Lưới và Nam Đông, tỉnh Thừa Thiên Huế (vùng nhiễm Dioxin) được đưa vào nhóm nghiên cứu. + Sinh sống ở miền Bắc từ Quảng Bình trở ra (vùng không nhiễm) được đưa vào nhóm đối chứng.

**Tiêu chuẩn loại trừ:** - Không đồng ý tham gia nghiên cứu. - Dưới 18 tuổi hoặc thiếu năng lực hành vi dân sự. - Sinh sống ở các vùng ngoài khu vực nghiên cứu. - Nơi sinh sống không cố định. - Thông tin cung cấp không đầy đủ.

**Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu:** chọn tất cả các đối tượng đủ tiêu chuẩn trên trong thời gian nghiên cứu.

**Kết quả:** 94 đối tượng cho nhóm nghiên cứu và 94 đối tượng cho nhóm đối chứng. Thông tin mỗi đối tượng được điền vào mẫu in sẵn và mẫu máu toàn phần được tách chiết DNA tại Khoa Huyết học, Bệnh viện Đại học Y Dược Huế. 188 mẫu DNA này sau đó sẽ được phân tích sự methyl hóa gene CYP1A1 bằng primer được thiết kế riêng.

**Bảng 2.** Phân bố mẫu

| Nhóm | Nghiên cứu (CASE) |                 | Chứng (CTRL) |                 |
|------|-------------------|-----------------|--------------|-----------------|
|      | Số lượng          | Tuổi trung bình | Số lượng     | Tuổi trung bình |
| Nam  | 47                | 41.3            | 47           | 42.8            |
| Nữ   | 47                | 38.4            | 47           | 39.1            |
| Tổng | 94                | 39.9            | 94           | 40.9            |

Nhóm nghiên cứu sau đó được chia làm 2 phân nhóm:

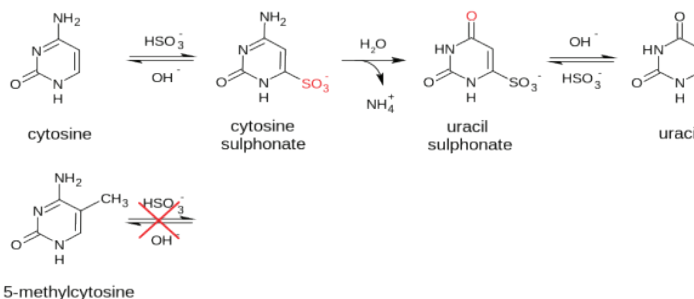
+ Phân nhóm CASES\_F\_P: có bố/mẹ trực tiếp tham gia kháng chiến ở miền Nam giai đoạn 1961-1972

+ Phân nhóm CASES\_NON\_F\_P: các đối tượng còn lại

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Tách chiết DNA từ mẫu máu toàn phần bằng kỹ thuật Salting out.

- Kiểm định DNA tách chiết bằng NanoDrop 2000/2000c spectrophotometer (Thermo Scientific).



- Chuyển đổi DNA với Bisulfit bằng bộ sinh phẩm EZ-96 DNA Methylation KIT® (ZYMO RESEARCH®, Hoa Kỳ): Cytosin đã gắn nhóm methyl không bị thay đổi, cytosine không gắn nhóm methyl sẽ được chuyển hóa thành Uracil.

Hình 1. Sự chuyển đổi DNA với bisulfit

- Thiết kế primer cho gene CYP1A1 được khảo sát bằng phần mềm EpiDesigner, giúp tạo ra các đoạn mồi tương thích cho các thử nghiệm methyl hóa với công nghệ Sequenom®EpiTYPER®.

+ Mồi xuôi: 5' - aggaagagag + trình tự đặc hiệu gen - 3'

(10mer trình tự đuôi)

+ Mồi ngược: 5' - cagtaatacgactcactataggagaaggct + trình tự đặc hiệu gen - 3'

Đuôi T7-promotor

8 cặp base chèn (ngăn các chu kì không hoạt động và hằng định đầu 5' cho phản ứng RNase A)

- Thực hiện kỹ thuật PCR, sau đó cắt đặc hiệu tại vị trí Uracil với enzyme RNase A, phân tích sản phẩm bởi máy Sequenom MassARRAY® MALDI-TOF MS. Từ tỉ số giữa cytosine không methyl hóa với cytosine được methyl hóa sẽ cho ta tỉ lệ phần trăm cytosine được methyl hóa tại mỗi vị trí (0- 100%).

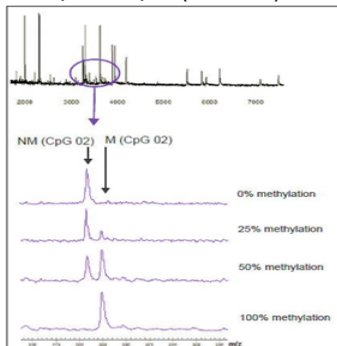


Figure II.8. Ratio of non-methylated to methylated DNA

Hình 2. Cách tính tỉ lệ phần trăm sự methyl hóa

### 3.1. Sự giảm methyl hóa DNA gene CYP1A1

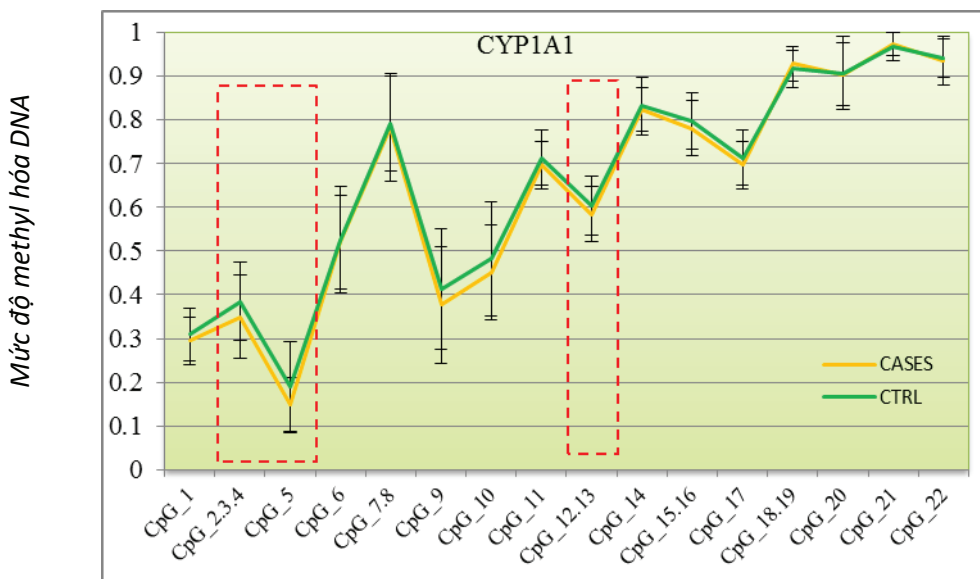
Bảng 3.1. So sánh sự methyl hóa DNA của gene CYP1A1 giữa nhóm nghiên cứu và nhóm chứng

| p     | CTRL    |        | CASE    |        | Đảo CpG |
|-------|---------|--------|---------|--------|---------|
|       | SD      | MEAN   | SD      | MEAN   |         |
| 0.079 | 0.06034 | 0.3098 | 0.05439 | 0.2950 | 1       |
| 0.010 | 0.09009 | 0.3848 | 0.09526 | 0.3498 | 2.3.4   |
| 0.001 | 0.10364 | 0.1902 | 0.06238 | 0.1487 | 5       |
| 0.751 | 0.12233 | 0.5260 | 0.10698 | 0.5206 | 6       |
| 0.631 | 0.10899 | 0.7912 | 0.12380 | 0.7830 | 7.8     |
| 0.067 | 0.13782 | 0.4130 | 0.13323 | 0.3766 | 9       |
| 0.074 | 0.13019 | 0.4831 | 0.10763 | 0.4518 | 10      |
| 0.067 | 0.06307 | 0.7124 | 0.05377 | 0.6967 | 11      |
| 0.043 | 0.06635 | 0.6036 | 0.06166 | 0.5846 | 12.13   |
| 0.322 | 0.06655 | 0.8311 | 0.04977 | 0.8226 | 14      |
| 0.078 | 0.06414 | 0.7974 | 0.06424 | 0.7809 | 15.16   |
| 0.067 | 0.06307 | 0.7124 | 0.05377 | 0.6967 | 17      |
| 0.056 | 0.04171 | 0.9162 | 0.03940 | 0.9276 | 18.19   |
| 0.836 | 0.08280 | 0.9063 | 0.07124 | 0.9039 | 20      |
| 0.278 | 0.03169 | 0.9679 | 0.02568 | 0.9724 | 21      |
| 0.694 | 0.10664 | 0.9316 | 0.11152 | 0.9253 | 22      |

- Việc so sánh sự methyl hóa tại mỗi vị trí đảo CpG của các nhóm và phân nhóm được thực hiện bởi thống kê ANNOVA 1 chiều với phần mềm SPSS Statistics20.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trên đoạn gene CYP1A1 được khảo sát có 22 vị trí đảo CpG, được đánh số lần lượt từ đảo CpG\_1 đến đảo CpG\_22. Trong số đó, có những vị trí đảo CpG quá gần nhau, không thể khảo sát riêng lẻ được, ví dụ: đảo CpG\_2.3.4, đảo CpG\_7.8, đảo CpG\_12.13, đảo CpG\_15.16, đảo CpG\_18.19. Do đó, ta sẽ phân thành 16 vị trí đảo CpG để đánh giá. Qua phân tích, chúng tôi thu được kết quả như sau:



**Biểu đồ 3.1.** So sánh sự methyl hóa DNA gene CYP1A1 giữa nhóm nghiên cứu và nhóm chứng Đường kẻ màu da cam: *nhóm nghiên cứu, sinh sống Nam Đông, A Lưới*; đường kẻ màu xanh lá cây: *nhóm đối chứng*, đường kẻ màu đỏ nét đứt: *vùng khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05)*.

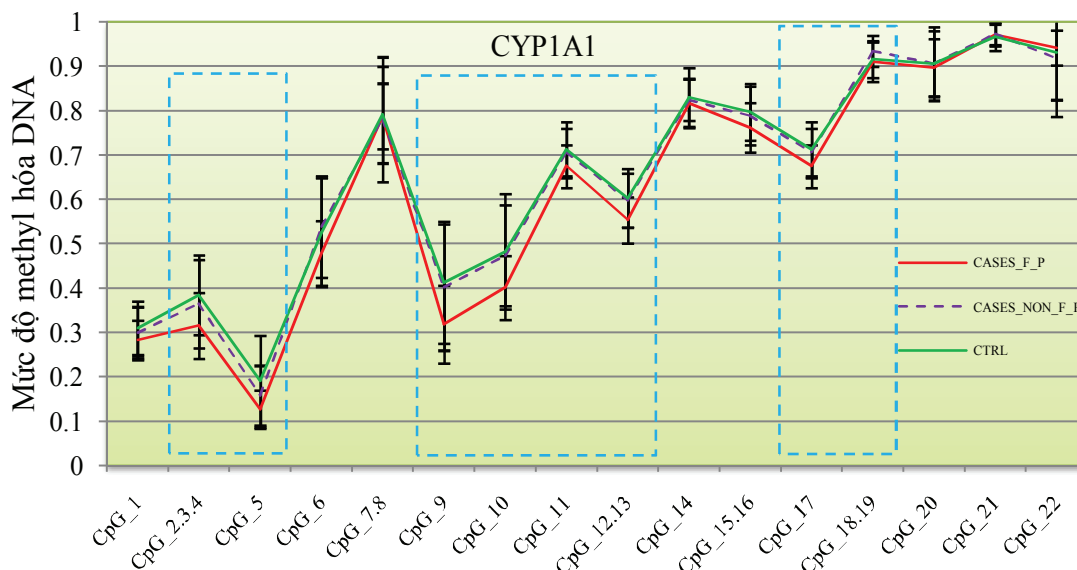
Dựa vào Bảng và Biểu đồ 3.1, ta thấy có sự giảm có ý nghĩa thống kê tỉ lệ methyl hóa DNA tại 3 vị trí là đảo CpG\_2.3.4, đảo CpG\_5 và đảo CpG\_12.13 ở nhóm sinh sống ở Nam Đông và A Lưới (CASE) khi so sánh với nhóm đối chứng (CTRL) ( $p<0,05$ ). Những vị trí như đảo CpG\_9, đảo CpG\_10, đảo CpG\_15.16, đảo CpG\_18.19, sự khác biệt tương đối rõ nhưng không có ý nghĩa thống kê.

**3.2. Sự giảm methyl hóa DNA ở phân nhóm CASES\_F\_P**

**Bảng 3.2.** So sánh sự methyl hóa DNA của gene CYP1A1 giữa CASES\_F\_P, CASES\_NON\_F\_P và nhóm chứng

| p       |         |             | CTRL (3) |        | CASES_NON_F_P(2) |        | CASES_F_P (1) |        | Đảo CpG      |
|---------|---------|-------------|----------|--------|------------------|--------|---------------|--------|--------------|
| (2) (3) | (1) (2) | (1) (2) (3) | SD       | MEAN   | SD               | MEAN   | SD            | MEAN   |              |
| 0.315   | 0.170   | 0.092       | 0.06034  | 0.3098 | 0.05776          | 0.3002 | 0.04474       | 0.2834 | <b>1</b>     |
| 0.190   | 0.022   | 0.002       | 0.09009  | 0.3848 | 0.10014          | 0.3648 | 0.07437       | 0.3162 | <b>2.3.4</b> |
| 0.031   | 0.023   | 0.001       | 0.10364  | 0.1902 | 0.06725          | 0.1585 | 0.04327       | 0.1269 | <b>5</b>     |
| 0.502   | 0.012   | 0.064       | 0.12233  | 0.5260 | 0.11492          | 0.5389 | 0.07287       | 0.4797 | <b>6</b>     |
| 0.601   | 0.797   | 0.858       | 0.10899  | 0.7912 | 0.14086          | 0.7808 | 0.07428       | 0.7879 | <b>7.8</b>   |
| 0.636   | 0.005   | 0.002       | 0.13782  | 0.4130 | 0.14235          | 0.4023 | 0.08752       | 0.3190 | <b>9</b>     |
| 0.655   | 0.002   | 0.001       | 0.13019  | 0.4831 | 0.11365          | 0.4742 | 0.07211       | 0.4017 | <b>10</b>    |
| 0.523   | 0.009   | 0.011       | 0.06307  | 0.7124 | 0.05369          | 0.7063 | 0.04815       | 0.6752 | <b>11</b>    |
| 0.619   | 0.001   | 0.001       | 0.06635  | 0.6036 | 0.06091          | 0.5985 | 0.05191       | 0.5534 | <b>12.13</b> |
| 0.544   | 0.438   | 0.493       | 0.06655  | 0.8311 | 0.04740          | 0.8252 | 0.05512       | 0.8166 | <b>14</b>    |
| 0.426   | 0.063   | 0.037       | 0.06414  | 0.7974 | 0.06640          | 0.7891 | 0.05585       | 0.7624 | <b>15.16</b> |

|       |       |       |         |        |         |        |         |        |              |
|-------|-------|-------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|--------------|
| 0.523 | 0.009 | 0.011 | 0.06307 | 0.7124 | 0.05369 | 0.7063 | 0.04815 | 0.6752 | <b>17</b>    |
| 0.003 | 0.004 | 0.004 | 0.04171 | 0.9162 | 0.03460 | 0.9352 | 0.04444 | 0.9103 | <b>18.19</b> |
| 0.079 | 0.588 | 0.863 | 0.08280 | 0.9063 | 0.07413 | 0.9066 | 0.06516 | 0.8979 | <b>20</b>    |
| 0.311 | 0.857 | 0.549 | 0.03169 | 0.9679 | 0.02696 | 0.9728 | 0.02300 | 0.9717 | <b>21</b>    |
| 0.270 | 0.436 | 0.565 | 0.10664 | 0.9316 | 0.13115 | 0.9178 | 0.03959 | 0.9421 | <b>22</b>    |



**Biểu đồ 3.2.** So sánh sự methyl hóa DNA của gene CYP1A1 giữa CASES\_F\_P, CASES\_NON\_F\_P và nhóm chứng Đường kẻ màu đỏ: phân nhóm CASES\_F\_P; đường kẻ màu tím nét đứt: phân nhóm CASES\_NON\_F\_P; đường kẻ màu xanh lá cây: nhóm đối chứng, đường kẻ màu xanh dương nét đứt: vùng khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Dựa vào Bảng và Biểu đồ 3.2, sự giảm methyl hóa DNA của gene CYP1A1 ở phân nhóm CASES\_F\_P xuất hiện rõ ràng và nhiều vị trí khi so sánh với phân nhóm CASES\_NON\_F\_P và nhóm chứng ( $p < 0,05$ ), đó là các vị trí đảo CpG\_3.4.5, đảo CpG\_5, đảo CpG\_9, đảo CpG\_10, đảo CpG\_11, đảo CpG\_12.13, đảo CpG\_17, đảo CpG\_18.19. Khi so sánh phân nhóm CASES\_NON\_F\_P với nhóm chứng, mức độ methyl hóa gần như tương đồng. Sự khác biệt là rất nhỏ, xảy ra ở vị trí đảo CpG\_5 và đảo CpG\_18.19 ( $p < 0,05$ ).

#### 4. BÀN LUẬN

##### 4.1. Sự giảm methyl hóa DNA gene CYP1A1

Từ những sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ methyl hóa DNA ở 3 vị trí: đảo CpG\_2.3.4, đảo CpG\_5 và đảo CpG\_12.13 và các vị trí tiềm năng (cần các nghiên cứu sau này với cỡ mẫu lớn hơn để khảo sát thêm sự khác biệt) như: đảo CpG\_9, đảo CpG\_10, đảo CpG\_15.16, đảo CpG\_18.19, giữa nhóm nghiên cứu và nhóm chứng, chúng tôi giả thiết rằng Dioxin đã gây nên sự giảm methyl

hóa ở đoạn gene CYP1A1 ở cư dân sinh sống ở các vùng phơi nhiễm. Ở nghiên cứu này chúng tôi chỉ khảo sát đoạn gene có độ dài khoảng 200-600 base trên tổng số 6000 base của gene CYP1A1, nằm ở locus nhiễm sắc thể 15q24 và không đánh giá sự biểu hiện gene. Tuy nhiên, với việc làm giảm methyl hóa DNA, Dioxin có khả năng sẽ làm tăng biểu hiện gene CYP1A1. Điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây [20] [21] [22]. Như đã biết CYP1A1 là một enzyme trong hệ thống Cytochrome 450. Hệ thống này đóng vai trò cực kì quan trọng trong cơ thể: xúc tác cho các phản ứng chuyển hóa thuốc, lipid, cholesterol... cũng như các chất sinh ung thư. Các nghiên cứu đã chỉ ra sự tăng biểu hiện của CYP1A1 liên quan đến nhiều loại ung thư và bệnh lý [21] [22] [23]. Mô hình bệnh tật của nạn nhân chất độc màu da có khả năng liên quan đến sự thay đổi methyl hóa DNA các gene mà CYP1A1 là một trong số đó.

##### 4.2. Sự giảm methyl hóa DNA ở phân nhóm CASES\_F\_P

Với sự giảm methyl hóa DNA của gene CYP1A1 ở

phân nhóm CASES\_F\_P xuất hiện rõ ràng và nhiều vị trí khi so sánh với phân nhóm CASES\_NON\_F\_P và nhóm chứng ( $p < 0,05$ ), trong khi phân nhóm CASES\_NON\_F\_P với nhóm chứng có mức độ methyl hóa gần như tương đồng, đưa đến giả thiết rằng sự giảm methyl hóa DNA ở gene CYP1A1 không xảy ra do phơi nhiễm với Dioxin tồn lưu trong môi trường ngày nay mà do sự phơi nhiễm của bố mẹ của họ với Dioxin trong thời kì rải chất độc hóa học. Sự tác động của Dioxin đó đã tác động lên sự methyl hóa DNA của thể hệ bố mẹ, sau đó những sự thay đổi này được truyền lại cho thể hệ sau thông qua con đường di truyền biểu sinh (epigenetics). Để chứng minh cho giả thiết này đòi hỏi phải tiến hành những thí nghiệm với quy mô lớn hơn với việc mở rộng cỡ mẫu và số lượng gen được phân tích. Tuy nhiên với những nguồn lực hạn chế, chúng tôi mong muốn sẽ chứng minh sự thay đổi đó không phải là hiện tượng ngẫu nhiên bằng cách thực hiện việc lấy mẫu và phân tích cùng đoạn gene đó với anh/chị/em của các cá thể trong phân nhóm CASES\_F\_P. Cùng với đó sẽ là khảo sát xem có hay không sự di truyền các thay đổi methyl hóa đó cho thể hệ tiếp theo bằng cách phân tích mẫu máu của con/cháu của các cá thể trong phân nhóm này.

## 5. KẾT LUẬN

Qua việc khảo sát sự methyl hóa DNA trên 1 đoạn gene CYP1A1 có chứa 22 vị trí đảo CpG bằng kỹ thuật MALDI-TOF MS trong mẫu máu toàn phần 188 đối

tượng đến khám chữa bệnh tại bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế, chúng tôi nhận thấy nhóm sinh sống ở A Lưới và Nam Đông- vùng phơi nhiễm với Dioxin- có sự giảm tình trạng methyl hóa ở 3 vị trí đảo CpG\_2.3.4, đảo CpG\_5, đảo CpG\_12.13 ( $p < 0,05$ ). Sự giảm tình trạng methyl hóa này ở phân nhóm CASES\_F\_P xuất hiện rất rõ ràng và ở nhiều vị trí đảo CpG, trong khi phân nhóm CASES\_NON\_F\_P khá tương đồng với nhóm chứng. Điều đó hình thành nên giả thiết rằng Dioxin tồn lưu trong môi trường ngày nay ở vùng bị nhiễm chất độc màu da cam không gây nên các biến đổi methyl hóa DNA, mà sự biến đổi methyl hóa đó được di truyền qua con đường biểu sinh từ sự phơi nhiễm Dioxin trực tiếp của bố mẹ các đối tượng đó trong thời kì rải chất độc hóa học. Việc chứng minh cho giả thiết này cần đến những nghiên cứu tiếp theo.

### Các từ viết tắt:

2,4-D: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

2,4,5-T: 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid

CpG: Cytosine – phosphate – Guanine dinucleotides

CYP1A1: Cytochrome P450, family 1, subfamily

A, polypeptide 1

DNA : Deoxyribonucleic Acid

MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

Mass Spectrometry

SD: Standard Deviation

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Young, A.L. and P.F. Cecil, *Agent Orange exposure and attributed health effects in Vietnam veterans*. Military medicine, 2011.
2. Schecter, A., et al., *Dioxins: an overview*. Environmental research, 2006. **101**(3): p. 419-428.
3. Gilpin, R.K., D.J. Wagel, and J.G. Solch, *Production, Distribution, and Fate of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins, Dibenzofurans, and Related Organohalogenes in the Environment*. Dioxins and Health, Second Edition, 2003: p. 55-87.
4. Steenland, K., et al., *Cancer, heart disease, and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Journal of the National Cancer Institute, 1999. **91**(9): p. 779-786.
5. Frumkin, H., *Agent Orange and cancer: an overview for clinicians*. CA: a cancer journal for clinicians, 2003. **53**(4): p. 245-255.
6. America, V.V.o., *The VVA self-help guide to service-connected disability compensation for exposure to Agent Orange for veterans and their families*. www.vva.org, 2015.
7. Martin, M.F., *Vietnamese victims of Agent Orange and US-Vietnam relation*. 2010: DIANE Publishing.
8. Ngo, A.D., et al., *Association between Agent Orange and birth defects: systematic review and meta-analysis*. International Journal of Epidemiology, 2006. **35**(5): p. 1220-1230.
9. Bock, K.W. and C. Köhle, *Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions*. Biochemical pharmacology, 2006. **72**(4): p. 393-404.
10. White, S.S. and L.S. Birnbaum, *An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology*. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 2009. **27**(4): p. 197-211.
11. Mandal, P.K., *Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology*. Journal of Comparative Physiology B, 2005. **175**(4): p. 221-230.
12. Giri, A.K., *Mutagenic and genotoxic effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, a review*. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 1986. **168**(3): p. 241-248.
13. McClure, E.A., et al., *Changes in DNA methylation and gene expression during 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced suppression of the*



*lipopolysaccharide (LPS)-stimulated IgM response in splenocytes*. Toxicological Sciences, 2011: p. kfq396.

14. Somm, E., C. Stouder, and A. Paoloni-Giacobino, *Effect of developmental dioxin exposure on methylation and expression of specific imprinted genes in mice*. Reproductive Toxicology, 2013. **35**: p. 150-155.

15. Stellman, J.M., et al., *The extent and patterns of usage of Agent Orange and other herbicides in Vietnam*. Nature, 2003. **422**(6933): p. 681-687.

16. Dwernychuk, L.W., et al., *Dioxin reservoirs in southern Viet Nam—a legacy of Agent Orange*. Chemosphere, 2002. **47**(2): p. 117-137.

17. Moore, L.D., T. Le, and G. Fan, *DNA methylation and its basic function* Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(1): p. 23-38.

18. Feil, R. and M.F. Fraga, *Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications* Nature

Reviews Genetics, 2012. **13**(2): p. 97-109.

19. Sant, K.E., M.S. Nahar, and D.C. Dolinoy, *DNA methylation screening and analysis*. Developmental Toxicology: Methods and Protocols, 2012: p. 385-406.

20. Beedanagari, S.R., et al., *Role of epigenetic mechanisms in differential regulation of the dioxin-inducible human CYP1A1 and CYP1B1 genes*. Molecular pharmacology, 2010. **78**(4): p. 608-616.

21. Whitlock Jr, J.P., *Induction of cytochrome P4501A1*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1999. **39**(1): p. 103-125.

22. Kopf, P.G., et al., *Cytochrome P4501A1 is required for vascular dysfunction and hypertension induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Toxicological Sciences, 2010: p. kfq218.

23. Murray, G., et al., *Cytochrome P450 expression in oesophageal cancer*. Gut, 1994. **35**(5): p. 599-603.