NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP KỸ THUẬT ĐỊNH LƯỢNG CHUYỂN GENE BCR-ABL ỨNG DỤNG ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ BẠCH CẦU TỦY MẠN

Ngô Tất Trung[1], Phan Quốc Hoàn[1], Lê Hữu Song[1]

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: *Điều trị đích là xu thế đang được ứng dụng rộng rãi trong bệnh bạch cầu tủy mạn. Để đánh giá hiệu quả điều trị đích chúng ta cần có các phương tiện chuyên biệt.*

Mục tiêu: *Xây dựng quy trình xét nghiệm xác định và định lượng tỷ lệ bắt cặp gene BCR-ABL/ABL để phục vụ theo dõi kết quả điều trị.*

Vật liệu và phương pháp: *Các dòng tế bào K562, BV-173, HL-60, Hela S3 được nuôi cấy trong các điều kiện chuẩn, sau đó pha trộn với tỷ lệ khác nhau. RNA tổng số được tách chiết, sau đó tổng hợp thành cDNA và định lượng bằng Real Time PCR theo nguyên lý Cybr Green.*

Kết quả: *Ở mức độ RNA có thể phát hiện gene mang đột biến BCR-ABL ở tỷ lệ 0,1%. Ở mức độ tế bào độ nhạy phát hiện là 1 tế bào mang nhiễm sắc thể Philadelphia/10^5 tế bào bình thường. Đường chuẩn để đánh giá có tính ổn định cao với hệ số tương quan là 0,9999.*

Kết luận: *Quy trình định lượng tỷ lệ bắt chéo nhiễm sắc thể số 9 và 22 (Philadelphia) ở mức độ tế bào và mức độ RNA đã được xây dựng thành công.*

Từ khóa: *Bạch cầu tủy mạn, gen BCR-ABL, real time PCR.*

ABSTRACT

APPLICATION OF BIOMOLECULAR METHODOLOGY IN DIAGNOSTICS AND MONITORING CLINICAL OUTCOMES OF CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA (CML)

Ngo Tat Trung, Phan Quoc Hoan, Le Huu Song

Introduction: *Targeted therapy is a prevalent tendancy and widely applied for Chronic myelogenous leukemia (CML) patients. However, in order to evaluate the clinical outcome of the treatment, we need such a suitable approach.*

Objective: *Our goal was to set-up a molecular diagnostic protocol to detect and quantify the expression level of BCR-ABL/ABL ratio amongst Philadelphia chromosome bearing patients (CML).*

Materials and methods: *Cell lines K562, BV-173, HL-60, Hela S3 were cultured by standard conditions and mixed at various ratios. Total RNA was extracted and converted into cDNA, the BCR-ABL/ABL ratios within the cDNA samples were quantified by taqman probe based Real Time PCR techtiques.*

Results: *At the RNA level, we could detect the the fusion BCR-ABL present in 0.1% of the total biospy RNA samples. At the cellular level, our methodo could confirm the presence of one Philadelphia chromosome bearing cell out of 10^5 normal cells with Pearson correlation coefficent is 0.9999.*

Conclusions: *A molecular-biology-based procedure to monitor the t(9;22)-Philadelphia chromosomal translocation at either RNA or cell number level has been successfully established.*

Key words: *chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL gene, RT PCR*

1. Bệnh viện TWQĐ108

- Ngày nhận bài (received): 10/7/2016; Ngày phản biện (revised): 14/8/2016
- Ngày đăng bài (Accepted): 22/8/2016
- Người phản biện: Đồng Sỹ Sằng
- Người phản hồi (Corresponding author): Ngô Tất Trung
- Email: tatrungngo@gmail.com; Điện thoại: 0919119416

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một đặc điểm nổi bật của ung thư bạch cầu tủy mạn là sự dịch chuyển bắt chéo giữa nhiễm sắc thể số 9 và nhiễm sắc thể số 22 (t9;22)(q34;q11), trong quá trình dịch chuyển bắt chéo này gene c-ABL chuyển vị từ nhiễm sắc thể số 9 tới khu vực 5.8 kb, vùng tập trung các điểm gãy (major breakpoint cluster region –BCR) của nhiễm sắc thể số 22 hình thành một gene ghép (fusion gene) BCR-ABL. Gene ghép này nằm trên một nhiễm sắc thể mới ngắn hơn với tên gọi "nhiễm sắc thể philadenphia – Philadelphia chromosome hay Ph1".

Trong số 9 vị trí bắt chéo đã biết trên nhiễm sắc thể Philadelphia, người ta thấy thường gặp nhất là 2 dạng: b2a2 (bắt cặp giữa exon 2 của BCR và exon 2 của ABL) và b3a2 (bắt cặp giữa exon 3 của BCR và exon 2 của ABL). Tổng tần suất 2 dạng này chiếm khoảng 90-95% số ca bạch cầu tủy mạn. Ngoài 2 dạng chủ yếu này, còn có khoảng 4-9% bệnh nhân ung thư bạch cầu tủy mạn mang dạng bắt chéo e1a2 (exon 1 của BCR bắt cắp với exon2 của c-ABL) và khoảng 1% bệnh nhân bạch cầu tủy mạn mang các dạng chéo khác.

Việc chữa trị bệnh bạch cầu tủy mạn được coi là có bước phát triển về chất kể từ khi trên thị trường xuất hiện dược phẩm có tên thương mại là Imatinib hay Glivec (và các dạng cải tiến của nó như Dasatinib, Nilotinib) đây là hợp chất hóa học có khả năng ức chế protein tyrosine kinase BCR-ABL gây nên sự chết tế bào có chương trình (apotosis) cho các tế bào mang BCR-ABL. Dược phẩm này đã được chỉ định điều trị cho các bệnh nhân mang nhiễm sắc thể Philadelphia (bao gồm cả ung thư bạch cầu tủy mạn - CML và ung thư bạch cầu lympho cấp acute lymphoblastic leukemia-ALL mang nhiễm sắc thể Philadelphia).

Trên thực tế với phác đồ điều trị 400mg imatinib mesylate/ngày, đã có khoảng 86% bệnh nhân bạch cầu tủy mạn có đáp ứng thuyên giảm hoàn toàn ở mức tế bào học, tương ứng với tỷ lệ BCR-ABL/ABL ≤ 0,1 và thậm chí có một bộ phận đáng kể bệnh nhân được cho là khỏi hoàn toàn ở mức độ phân tử (tỷ lệ BCR-ABL/ABL < 0,0001) [1]

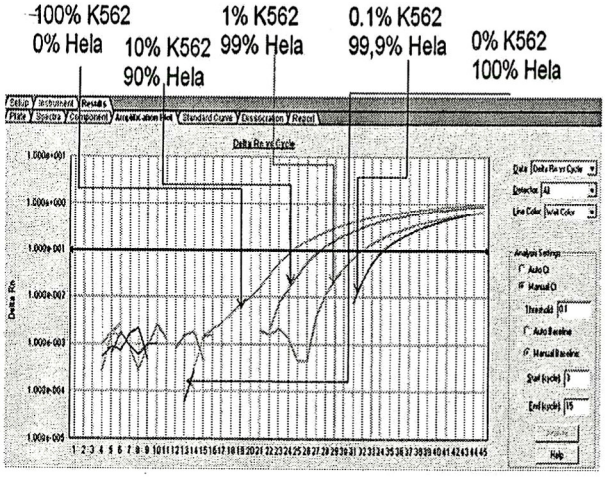
Tỷ lệ BCR-ABL/ABL còn có một tên gọi khác là bệnh tồn dư tối thiểu (minimal residual disease-MRD), đây là chỉ số mô tả trực tiếp hay gián tiếp mật độ tế bào ung thư máu trong cơ thể bệnh nhân. Trong điều trị ung thư máu nói chung và bạch cầu tủy mạn nói riêng chỉ số bệnh tồn dư tối thiểu phản ánh đáp ứng điệu trị của bệnh nhân đối với mỗi phác đồ điều trị cụ thể, nó giúp bác sỹ lâm sàng quyết định tiếp tục hay chấm dứt điều trị cho từng trường hợp bệnh nhân cụ thể. Hơn nữa bệnh tồn dư tối thiểu còn đóng vai trò tiên lượng nguy cơ tái phát bệnh [2-4]. Hiện nay có nhiều chiến lược được dùng để đánh giá bệnh tồn dư tối thiểu cho bệnh nhân bạch cầu tủy mạn, trong đó phương pháp sinh học phân tử dựa trên phản ứng chuỗi (PCR) cho ngưỡng phát hiện tốt hơn cả, đặc biệt thủ tục tiến hành một xét nghiệm định lượng phân tử tỷ lệ BCR-ABL/ABL đã được chuẩn hóa bởi hướng dẫn do mạng lưới ung thư máu châu Âu đề xuất (European leukemia network –ELN). [5].

Để góp phần theo dõi và điều trị bệnh bạch cầu tủy mạn tốt hơn chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình xét nghiệm định lượng bệnh tồn dư tối thiểu qua tỷ lệ biểu hiện BCR-ABL/ABL).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu: Các dòng tế bào mang nhiễm sắc thể Philadelphia chứng dương: K562 (chronic myeloid leukemia), BV-173 (acute lymphoblastic leukemia); các dòng tế bào không mang nhiễm sắc thể Philadelphia: HL-60; Hela S3. Bộ kit Master-Mix Sybr Green - AB Applied Biosystems (Mỹ), máy phân tích real-time PCR (Cycler 7500 Fast-Real-Time-PCR System, Applied Biosystems); buồng đếm hồng cầu, môi trường nuôi cấy tế bào RPMI (invitrogen) có chứa 10% huyết thanh bê, 100mg/ml streptamycine, 100mg/ml ampiciline; dịch tách RNA tổng số - Trizol (invitrogene); enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase) -Fermentas- CHLB Đức; các bộ mồi đặc hiệu cho BCR-ABL được thiết kế theo hướng dẫn của ELN [6].

2.2. Phương pháp nghiên cứu: Để khẳng định đúng sự có mặt của các dạng bắt chéo b3/a2, b2/a2 và e1a2 chúng tôi tiến hành nuôi các dòng tế bào có chứa nhiễm sắc thể Philadelphia (chronic myeloid leukemia K562 hoặc acute lymphoblastic leukemia BV-173) và các dòng tế bào đối chứng âm (tế bào ung thư cổ tử cung [Hela S3] hay tế bào ung thư tiền tủy cấp [HL60]) trong môi trường RPMI, 37°C, 5% CO_2. Chất lượng tế bào được kiểm tra trên kính hiển vi pha đảo Nikon Eclipse TE2000 U, sau 4 - 7 ngày, mật độ tế bào đạt khoảng 5-8x10^5 tế bào/ml, toàn bộ tế bào được thu gom và tiến hành tách chiết toàn bộ RNA tổng số. Toàn bộ RNA tách ra từ tế bào mang nhiễm sắc thể Philadelphia (K562 hoặc BV-173) được trộn với toàn bộ RNA tổng số của tế bào đối chứng âm (Hela S3 hoặc HL60) theo các tỷ lệ 100%; 10%; 1%; 0.1% và 0%. Từ đó sẽ tiến hành tổng hợp cDNA bằng enzyme phiên mã ngược. Các mẫu cDNA lai được dùng làm khuôn cho phản ứng định lượng sử dụng hỗn hợp phản ứng thương mại Master-mix Sybr Green (Applied Biosystems, Mỹ) với cặp mồi đặc hiệu cho 3 dạng b3/a2, b2/a2, e1a2 đã được khuyến cáo sử dụng bởi ELN [6]



Hình 1: Hình biểu diễn đường cong tín hiệu mô tả sự nhân lên của gene BCR-ABL từ các mẫu hỗn hợp mang tỷ lệ % toàn bộ RNA tổng số tách chiết từ 2 dòng tế bào bạch cầu tủy mạn(K562) và tế bào đối chứng âm (Hela).

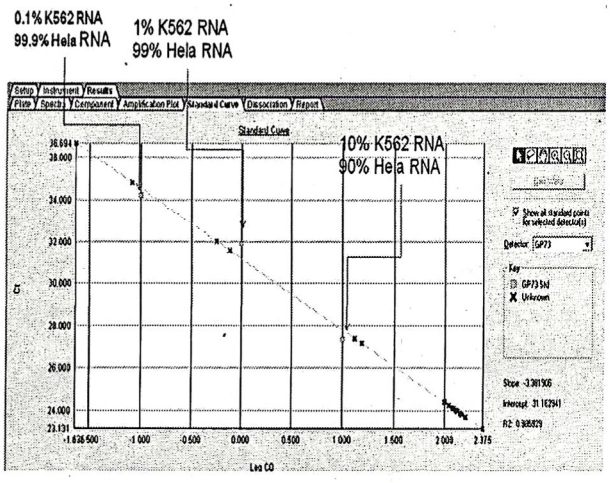
3.2. Xây dựng đường chuẩn đánh giá sự có mặt của hai dạng bắt chéo b3/a2, b2/a (M-BCR-ABL)

Bằng phương pháp hòa loãng theo tỷ lệ 100%, 10%, 1%, 0,1% và 0% chúng tôi thu được đường chuẩn với độ tương quan RR=0,9999. Như vậy, dựa vào đường chuẩn này chúng ta có thể biết chính xác tỷ lệ RNA mang đột biến gene trong lượng mẫu cần đánh giá (Hình 2).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp phát hiện bệnh tồn dư tối thiểu ở mức độ RNA bằng kỹ thuật taqman probe RT-PCR

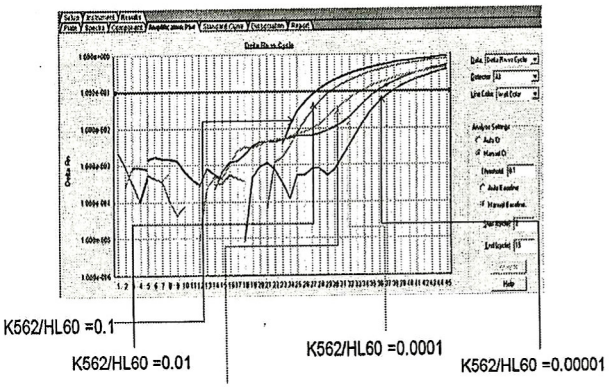
Để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp ở mức độ RNA chúng tôi tiến hành pha loãng toàn bộ RNA của chứng dương theo các tỷ lệ 100%, 10%, 1%, 0.1% và 0%. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. Kết quả cho thấy ở tỷ lệ 0,1% cũng có thể phát hiện được gene đột biến b3/a2 và b2/a2. Trong khi đó không có mẫu nào trong số 3 mẫu RNA tách từ tế bào đối chứng âm (không mang nhiễm sắc thể Philadelphia) cho kết quả dương tính. Như vậy, chúng tôi xác định độ nhạy kỹ thuật (ngưỡng phát hiện) ở mức RNA là 0,1% (Hình 1).



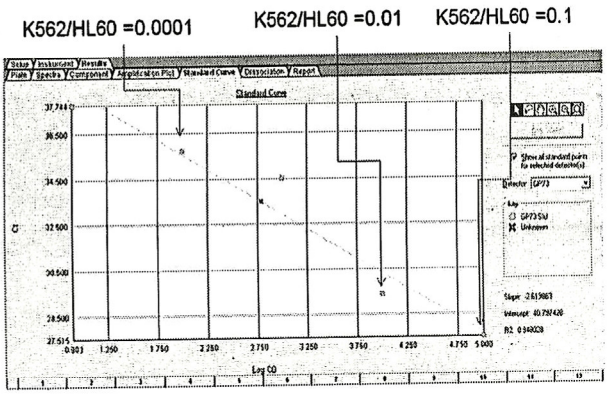
Hình 2. Hình biểu diễn đường chuẩn để xác định tỷ lệ RNA mang gene đột biến BCR-ABL. RR=0.9999

3.3. Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp ở mức độ tế bào

Trong thực hành lâm sàng chúng ta cần trả lời câu hỏi rằng có bao nhiêu tế bào mang nhiễm sắc thể Philadelphia trong tổng số bạch cầu của bệnh nhân. Vì vậy, sau khi khẳng định được độ nhạy và độ đặc



Hình 3: Hình biểu diễn đường cong tín hiệu mô tả sự nhân lên của gene BCR-ABL từ các mẫu hỗn hợp tế bào với tỷ lệ bạch cầu tủy mạn tương ứng là 10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}; 10^{-4}; 10^{-5}



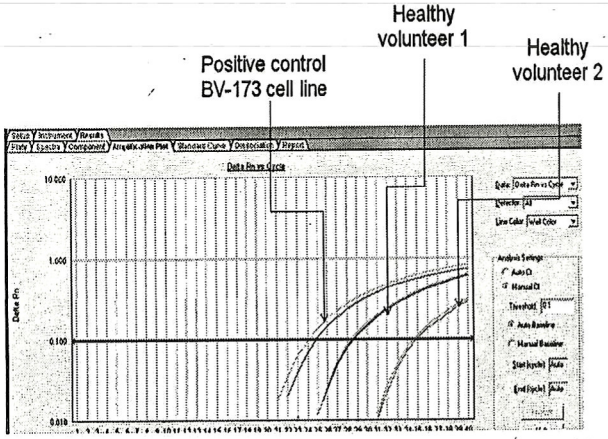
Hình 4: Hình biểu diễn đường chuẩn mô tả tỷ lệ BCR-ABL trong các mẫu tế bào tương ứng. RR=0,99999.

hiệu của phương pháp ở mức RNA chúng tôi tiến hành xác định độ nhạy và độ đặc hiệu ở mức độ tế bào. Chúng tôi đã tiến hành trộn lẫn tế bào bạch cầu tủy mạn K562 (mang nhiễm sắc thể Philadelphia) vào tế bào kiểm chứng âm HL60 với các tỷ lệ 10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}; 10^{-4}; 10^{-5}; các mẫu RNA tương ứng được tách chiết và tổng hợp cDNA làm khuôn cho phản ứng định lượng BCR-ABL. Kết quả cho thấy bằng phương pháp này chúng tôi có thể phát hiện được tế bào mang nhiễm sắc thể Philadelphia ở mức độ tối thiểu là 10^{-5}, tức là trong tổng số 100 000 tế bào chỉ cần có 1 tế bào mang nhiễm sắc thể Philadelphia là có thể phát hiện được (Hình 3).

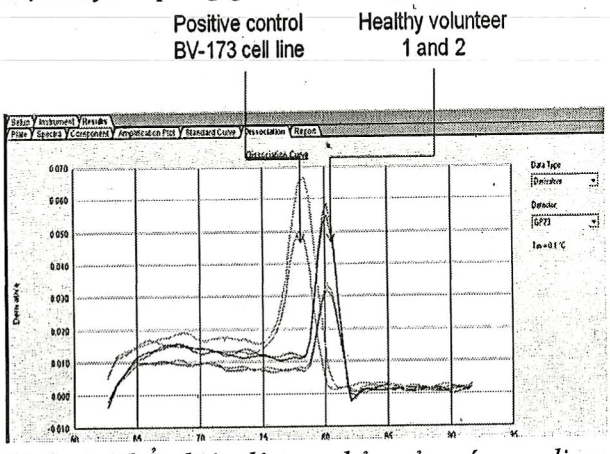
3.4. Xây dựng đường chuẩn để định lượng tỷ lệ tế bào mang nhiễm sắc thể Philadelphia

Bằng phương pháp hòa loãng tế bào theo bội số 10 sau đó tách chiết RNA, tổng hợp cDNA và chạy Real Time PCR chúng tôi thu được đường chuẩn với hệ số tương quan RR=0,99999 (Hình 4).

3.5. So sánh nhiệt độ tan của sản phẩm nhân gene: Do mồi (primers) dùng trong chẩn đoán ngoài khả năng bắt cặp với khu vực DNA khuôn đích chúng còn có thể bắt cặp không đặc hiệu với các phân tử DNA khác có trong hỗn hợp phản ứng, nên một khi trong hỗn hợp phản ứng không có phân tử DNA đích, chúng ta vẫn có thể quan sát được tín hiệu huỳnh quang phát ra bởi sự bắt mồi không đặc hiệu. Nếu xét nghiệm được tiến hành bằng Sybr Green (không sử dụng đầu dò phân tử taqman probe), tín hiệu huỳnh quang phát ra không thật sự đặc hiệu



Hình 5: Tín hiệu huỳnh quang giả được tạo ra khi dò tìm dạng lai ghép BCR-ABL trong máu người khỏe mạnh bằng phương pháp qPCR sử dụng Cybr Green.



Hình 6: Phổ nhiệt độ tan chảy của các amplicon được tạo ra trong phản ứng qPCR trên khuôn cDNA chuẩn dương –BV-173 và cDNA người khỏe mạnh là khác nhau.

cho amplicon mà ta quan tâm, vì thế quá trình làm xét nghiệm (tại các phòng xét nghiệm không đủ điều kiện triển khai taqman probe) cần có chế độ ghi lại nhiệt độ tan (Melting point) của amplicon, và chỉ khi đỉnh của amplicon trong mẫu bệnh phẩm trùng với đỉnh của amplicon chuẩn dương, lúc đó mới được phép kết luận bệnh nhân dương tính với sự có mặt của bắt chéo M-BCR-ABL. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành trên 2 mẫu người khỏe mạnh chạy song song với mẫu chứng dương. Kết quả cho thấy nếu khi nhìn trên hình biểu diễn tín hiệu của phản ứng Real Time PCR thì chúng ta có thể nhầm là dương tính với người khỏe mạnh (Hình 5). Nhưng khi phân tích dựa trên điểm nóng chảy thì chúng ta thấy rõ sự khác biệt giữa 2 mẫu chứng âm với mẫu chứng dương (Hình 6).

IV. BÀN LUẬN

Bạch cầu tủy mạn là một trong những bệnh máu ác tính với tần suất không quá cao (khoảng 1-2 ca/100000 dân/năm) tuy nhiên đây lại là bệnh mà người ta biết khá rõ về cơ chế bệnh học phân tử. Nhờ đó phác đồ điều trị bệnh này đã được chuẩn hóa bởi Tổ chức Y tế thế giới (WHO); Hội ung thư châu Âu (ESMO); và Mạng lưới bệnh bạch cầu châu Âu (ELN). Điểm chung trong các hướng dẫn điều trị của các tổ chức nói trên là việc đưa các thuốc như Imatinib, Dasatinib, hay Nilotinib vào điều trị. Đây là các đồng đẳng nucleotide; chúng ức chế hoạt tính tyrosine kinase của BCR-ABL gây chết các tế bào mang nhiễm sắc thể Philadelphia [1], [5], [7].

Theo các hướng dẫn và khuyến cáo đó bệnh nhân bạch cầu tủy mạn được coi là có đáp ứng điều trị tối ưu nếu: (i) thuyên giảm ở mức độ huyết học đạt được sau 3 tháng điều trị; (ii) thuyên giảm mức độ tế bào học đạt được sau 12 tháng điều trị; (iii) thuyên giảm ở mức độ phân tử đạt được sau 18 tháng điều trị. Cũng theo các hướng dẫn này, bệnh nhân bạch cầu tủy mạn cần được kiểm tra các thông số huyết học 2 tuần một lần trong 3 tháng đầu nhằm quan sát thuyên giảm bạch cầu ở mức độ huyết học, sau 3 tháng điều trị nếu đạt đến mức thuyên giảm huyết học bác sỹ lâm sàng cần chỉ định xét nghiệm phân tử đánh giá tỷ lệ BCR-ABL/ABL 3 tháng một lần, xét nghiệm này bắt buộc phải tiến hành ngay cả sau khi kết thúc điều trị nhằm đánh giá nguy cơ tái phát [5].

Cho đến hiện nay ở nước ta việc áp dụng các khuyến cáo và hướng dẫn nêu trên vẫn còn hạn chế. Nguyên nhân có thể: (i) do kinh phí điều trị bằng các thuốc đặc hiệu còn cao; (ii) chưa có phương tiện để đánh giá, theo dõi điều trị. Do đó, để làm cơ sở cho việc chỉ định, đánh giá theo dõi điều trị bệnh bạch cầu tủy mạn chúng tôi triển khai nghiên cứu này. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy phương pháp định lượng bệnh tồn dư tối thiểu (tỷ lệ bắt chéo BCR-ABL/ABL) sử dụng nguyên lý Real Time PCR Sybr Green với 2 cặp mồi thông dụng có độ nhạy đáp ứng được theo khuyến cáo của các Hội nghề nghiệp trên thế giới.

Để quan sát sự thuyên giảm của bệnh bạch cầu tủy mạn, bác sỹ lâm sàng có thể chỉ định các xét nghiệm như lai hóa huỳnh quang tại chỗ (flourescent in situ hybridization-Fish), đếm hình thái miễn dịch tế bào (flow cytometry) và định lượng sinh học phân tử (real time quantitative PCR- qPCR). Trong 3 phương pháp nói trên thì định lượng sinh học phân tử có ngưỡng phát hiện tốt nhất (bằng phương pháp này đa số các phòng thí nghiệm trên thế giới có thể phát hiện được 1 tế bào bạch cầu tủy mạn trong 10^5 tế bào thường) [8]. Đây là phương pháp duy nhất có thể quan sát được mức độ thuyên giảm của bệnh bạch cầu tủy mạn ở mức độ sinh học phân tử (tỷ số BCR-ABL/ABL $\leq$ 0,0001 và cũng là phương pháp duy nhất được WHO; ESMO; ELN khuyến cáo đưa vào quan sát đáp ứng điều trị cho bệnh nhân bạch cầu tủy mạn [1], [5], [8].

Một yếu điểm của nguyên lý Real Time PCR Sybr Green trong định lượng biểu hiện gene là hiện tượng dương tính giả do chất nhuộm Sybr Green có khả năng bắt mầu không đặc hiệu với bất kỳ sản phẩm PCR nào. Yếu điểm này đã được hạn chế tối đa nhờ việc kết hợp thực hiện phản chuẩn dương song song với bệnh phẩm cần phân tích do đó trong những trường hợp người khỏe mạnh, tín hiệu Sybr Green có thể xuất hiện (hình 5) nhưng nhờ so sánh sự khác biệt phổ tan chảy giữa mẫu chuẩn dương và bệnh phẩm mà ta có thể loại bỏ được tín hiệu Sybr Green tương dương tính giả (hình 6).

Như vậy, tại Bệnh viện TƯQĐ 108 chúng tôi có thể chẩn đoán chính xác sự bắt cặp của 3 dạng lai ghép chính b2a2; b3a2; e1a2 ở mức độ tối thiểu với mật độ 1 tế bào bạch cầu tủy mạn trong 10^5 tế bào thường. Kết quả này tương đương với các kết quả khác đang được ứng dụng trên thế giới (Baccarani and Dreyling 2010).

V. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc xây dựng quy trình xác định bệnh tồn dư tối thiểu và định lượng tỷ lệ bắt chéo nhiễm sắc thể số 9 và 22 (Philadelphia) ở mức độ tế bào và mức độ RNA. Đây là công cụ rất có ích để theo dõi điều trị bệnh CML theo phác đồ điều trị đích (Target Therapy).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baccarani, M. and M. Dreyling, *Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* Ann Oncol, 2010. 21 Suppl 5: pp. 165-7.
2. Hochhaus, A., *Minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia patients.* Best Pract Res Clin Haematol, 2002. 15(1): pp. 159-78.
3. Kern, W., et al., *Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia.* Crit Rev Oncol Hematol, 2005. 56(2): pp. 283-309.
4. Yin, J.A. and D. Grimwade, *Minimal residual disease evaluation in acute myeloid leukaemia.* Lancet, 2002. 360(9327): pp. 160-2.
5. Baccarani, M., et al., *Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet.* J Clin Oncol, 2009. 27(35): pp. 6041-51.
6. Gabert, J., et al., *Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program.* Leukemia, 2003. 17(12): pp. 2318-57.
7. Baccarani, M. and M. Dreyling, *Chronic myelogenous leukemia: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up.* Ann Oncol, 2009. 20 Suppl 4: pp. 105-7.
8. Baccarani, M., et al., *Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.* Blood, 2006. 108(6): pp. 1809-20.