

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GENE EGFR Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ

Ngô Tất Trung¹, Nguyễn Trọng Chính¹, Nguyễn Văn Sơn¹,
Nguyễn Việt Long, Regine Dahse², Dương Hồng Quân³, Lê Hữu Song¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Xác định đột biến gene EGFR là một yêu cầu cần thiết trước khi điều trị đích cho bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Mục tiêu: Xây dựng quy trình xét nghiệm chẩn đoán các trạng thái đột biến mất đoạn trên exon 19 {Del19 (746-750)} và đột biến điểm trên Exon 21 (L858R).

Vật liệu và phương pháp: Các dòng tế bào H1975, PC9, NCI-1650 và HCC-827 được nuôi cấy trong các điều kiện chuẩn. Bệnh phẩm ung thư phổi được thu nhận, xử lý và tách chiết DNA tổng số. Đột biến gene EGFR được xác định bằng Real Time PCR đặc hiệu alen, PCR đặc hiệu hai hướng alen và so sánh với giải trình tự gene.

Kết quả: Đã thiết lập được phương pháp xác định đột biến mất đoạn trên exon 19 (delE746-A750) của EGFR theo Dahse và cộng sự tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TƯQĐ 108. Phương pháp này có độ nhạy kỹ thuật cao hơn rõ rệt so với phương pháp đọc trình trực tiếp (0,1% so với 25%). Bằng Real Time PCR đặc hiệu alen chúng tôi có thể phát hiện đột biến gene trên Exon 21 (L858R) ở nồng độ 1%.

Kết luận: Quy trình chẩn đoán các thể đột biến của EGFR đã được xây dựng thành công và có giá trị cao hơn so với giải trình tự gene.

Từ khóa: Ung thư phổi không tế bào nhỏ, đột biến gen EGFR.

ABSTRACT

ESTABLISHMENT OF EPITHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR MUTATION ANALYSIS PROTOCOL FOR NON SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS

Ngo Tat Trung¹, Nguyen Trong Chinh¹, Nguyen Van Son¹,
Nguyen Viet Long¹, Regine Dahse², Duong Hong Quan³ và Le Huu Song¹

Introduction: It is indispensable to screen for EGFR mutations before indicating tyrosine – kinase – inhibitor – based – targeted therapeutic regimens to non-small-cell-lung-cancer patients.

Objectives: To set-up a molecular diagnostic protocol for detecting exon 19 Del19(746-750) and exon 21 point mutation (L858R) of epithelial growth factor receptor (EGFR) gene.

Materials and methods: Cell lines H1975, PC9, NCI-1650 (positive for exon 19 Del19(746-750), HCC-827 (positive for exon 21 point mutation - L858R) were cultured under standard conditions. Genomics DNA was

1. Bệnh viện TWQĐ108

2. HELIOS Clinic Erfurt, Institute of Pathology, Erfurt, Germany

3. Yonsei University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea

- Ngày nhận bài (received): 17/7/2013; Ngày phản biện (revised): 25/7/2013

- Ngày đăng bài (accepted): 26/8/2013

- Người phản biện: PGS.TS Phạm Như Hiệp, TS. Nguyễn Đình Tùng

- Người phản hồi (corresponding author): Ngô Tất Trung

- Email: ntatrung@yahoo.com ĐT: 0919119416

extracted and tread as template for bidirectional PCR amplification of specific alens – Bi-PASA[1] (exon 19 Del19(746-750) or allelic specific qPCR for exon 21 L858R detection.

Results: *Two allele specific PCR based assays for (exon 19 Del19 (746-750) and 21 L858R point mutation have been successfully established, which are applicable to detect the present of less than 1% mutated DNA in the clinical samples.*

Conclusion: *An income relevant molecular tool for EGFR mutation screening has been set up, which, technically, is more sensitive than the conventional Sanger sequencing approach.*

Key words: *Non small cell lung cancer, epithelial growth factor receptor mutation.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là bệnh gây tử vong cao nhất trong số các bệnh ung thư mà con người biết đến, theo báo cáo “Globocan-2008” do Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) công bố, bệnh này chiếm 16,5% trong tổng số ca ung thư và chiếm 22,5% ca tử vong trong số các bệnh có liên quan đến ung thư, riêng năm 2008 trên thế giới có khoảng 1,4 triệu người chết vì ung thư phổi [2]. Theo một số thống kê chưa đầy đủ tại Việt Nam, tỷ lệ mắc ung thư phổi là 31/100.000 dân ở nam giới và 7/100.000 dân ở nữ giới, còn theo số liệu công bố từ các chương trình điều tra ung thư do Tổ chức Y tế Thế giới tiến hành (Globocan): năm 2008 Việt nam có 20.659 bệnh nhân ung thư phổi mắc mới.

Dựa trên hình thái tế bào người ta chia ung thư phổi thành ung thư phổi tế bào nhỏ (small cell lung cancer- SCLC) và ung thư phổi không tế bào nhỏ (non small cell lung cancer- NSCLC). Ung thư phổi tế bào nhỏ chiếm 15-20% ca ung thư, còn lại 80-85% số ca ung thư phổi là ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN = NSCLC). Do phác đồ hóa trị hoặc xạ trị tương đối có hiệu quả trong việc tiêu diệt các khối hạch ung thư phổi tế bào nhỏ nên các nghiên cứu lâm sàng tập trung nhiều vào việc chữa trị cho các bệnh nhân UTPKTBN.

Một đặc điểm nổi bật của ung thư phổi không tế bào nhỏ là sự gia tăng mức độ biểu hiện của thụ thể biểu mô (epithelial growth factor receptor-EGFR). Thụ thể này có liên quan đến cơ chế điều trị đích.

Hiện nay trên thị trường dược phẩm tồn tại hai hợp chất có khả năng ức chế EGFR đã được cơ quan quản

lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cho phép sử dụng trong điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn muộn là Gefitinib và Erlotinib. Việc chỉ định sử dụng các dược phẩm này không chỉ phụ thuộc vào mức độ biểu hiện của thụ thể EGFR, mà bản thân trạng thái đột biến của gene EGFR cũng đóng vai trò quyết định sự thành công của các phác đồ điều trị đích sử dụng tyrosine kinase inhibitors. Nghiên cứu cho thấy các cộng đồng dân cư khác nhau có tần suất xuất hiện các đột biến EGFR khác nhau: trong khi chỉ có 10-15% bệnh nhân UTPKTBN người Âu, Phi (Caucasian ethnics) mang đột biến EGFR, thì tỷ lệ này ở châu Á là khoảng 40-60% [3, 4]. Đa số các trường hợp đột biến gene EGFR xảy ra ở các exon 18 (3%), exon 19 (45-53%), exon 20 (4%), và exon 21 (45%) [5]. Ngoài ra, các vị trí đột biến tại các exon khác nhau quyết định các tính chất sinh hóa khác nhau của EGFR, đồng thời quyết định khả năng đáp ứng điều trị khác nhau của bệnh nhân UTPKTBN với Gefitinib hoặc Erlotinib [5, 6].

Vì vậy, Hiệp hội ung thư lâm sàng Mỹ và Hiệp hội ung thư lâm sàng châu Âu [7-10] đã khuyến cáo chỉ định xét nghiệm trạng thái đột biến tại các exon 19, 21 của gene EGFR trước khi đưa ra quyết định lựa chọn liệu pháp điều trị. Tuy nhiên, hiện nay ở Việt Nam chưa có cơ sở nào tiến hành thực hiện các xét nghiệm xác định đột biến EGFR một cách thường quy. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình phát hiện đột biến gene EGFR có giá trị trong thực hành lâm sàng với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, giá thành thấp.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng: Các dòng tế bào UTPKTBN mang đột biến EGFR: PC9, NCI-1650, HCC827 (delE746-A750), H1975 (L858R), được nuôi cấy trong các điều kiện chuẩn. Bệnh phẩm ung thư phổi (dịch màng phổi, dịch rửa phế quản, đờm, sinh thiết phổi) được thu nhận và bảo quản trong dung dịch lưu giữ DNA.

2.2. Phương pháp: Các dòng tế bào được nuôi cấy theo phương pháp chuẩn, sau 4 - 7 ngày kiểm tra đạt mật độ đạt khoảng $5-8 \times 10^5$ tế bào/ml. Toàn bộ tế bào, DNA tổng số được tách chiết và dùng làm khuôn cho phản ứng multiplex-PCR với bộ mồi đặc hiệu cho các thể hoang dại hoặc đột biến cắt đoạn trên exon 19 (delE746-A750). Trong khi đó đột biến điểm trên exon 21 được phát hiện bằng phương pháp allelic specific Sybr green real time PCR với bộ mồi đặc hiệu cho cả thể hoang dại và thể đột biến L858R.

2.2.1 Thiết kế bộ mồi cho chẩn đoán đột biến L858R exon21: Để phân biệt đột biến (L858R) của exon 21, 2 bộ mồi đặc hiệu cho từng alen được chúng tôi thiết kế sao cho đầu 3' của mỗi xuôi (forward primer) bắt cặp chính xác với hai alen riêng biệt tại vị trí nghi ngờ có đột biến, trong khi đó mồi ngược (reverse primer) sẽ được dùng chung cho cả alen wild type và alen mutant. (hình 1 A – trình tự mồi

cụ thể sẽ được cung cấp khi người đọc quan tâm và liên hệ với nhóm tác giả).

2.2.2. Thiết kế bộ mồi cho chẩn đoán đột biến mất đoạn exon 19 (delE746-A750)

Do các đột biến trên thụ thể EGFR xảy ra rải rác tại các exon khác nhau [11] nên cần phải thiết kế các bộ mồi thích hợp cho từng khu vực đột biến. Riêng với đột biến mất đoạn trên exon 19 (delE746-A750) chúng tôi sử dụng phương pháp PCR đặc hiệu hai hướng alen do Dahse và cộng sự đề xuất (bidirectional PCR amplification of specific alens – Bi-PASA [1]) với bộ mồi được thiết kế như bảng 1 [1].

Cặp mồi outer 19P/19Q nhận đặc hiệu bằng 444bp, khu vực có thể chứa đột biến mất đoạn (delE746-A750). Mồi đơn 19B bắt đặc hiệu vào vị trí đột biến mất đoạn (delE746-A750). Mồi đơn 19A bắt vào vị trí wild type của exon19.

Trong một phản ứng PCR có chứa đồng thời các mồi 19P/19Q/19B/19A sẽ có thể khuếch đại tạo ra 3 sản phẩm PCR: PQ (444 bp), AQ (325 bp) và PB (134 bp). Trong đó băng PQ là “ngoại nội chuẩn”, AQ là băng đặc hiệu cho thể hoang dại của exon19 đồng thời đóng vai trò là nội chuẩn trong cho phản ứng PCR đặc hiệu hai hướng (bidirectional PCR amplification of specific alens – Bi-PASA) và băng PB là tín hiệu khẳng định sự có mặt của đột biến mất đoạn (delE746-A750).

Bảng 1: Trình tự mồi sử dụng trong phản ứng PCR đặc hiệu hai hướng alen chẩn đoán đột biến mất đoạn exon 19 (delE746-A750).

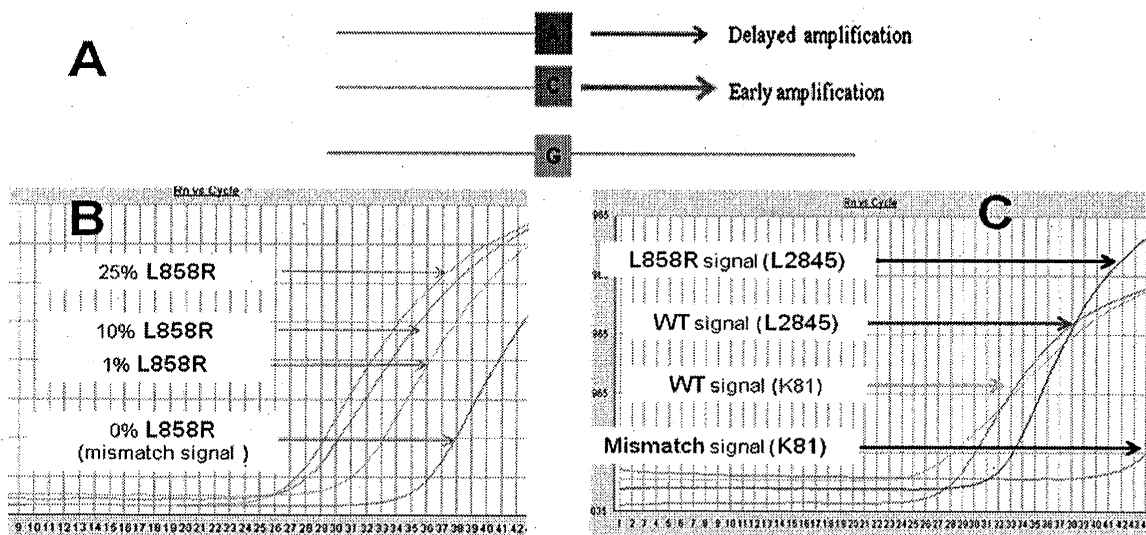
19 P1	GTAACATCCACCCAGATCACTG
19Q1	GTGTCAAGAACTAGTGCTGGG
19A4	CCCGTCGCTATCAAGGAATTAA
19B4	GTTGGCTT-TCGGAGATGTT-TTGATAG

III. KẾT QUẢ

3.1. Alleic specific real-time PCR và độ nhạy kỹ thuật cho chẩn đoán đột biến exon21

Khi tiến hành chẩn đoán đột biến (L858R), ta tiến hành đồng thời 2 phản ứng real time PCR (sử dụng Sybr green I để nhận biết sản phẩm PCR) bắt cặp tương ứng với cả alen wild type và alen mutant. Lúc đó sẽ xảy ra 2 khả năng: i) nếu mẫu

DNA không chứa đột biến L858R, tín hiệu huỳnh quang (trên lý thuyết) chỉ được ghi nhận ở phản ứng qPCR sử dụng mồi xuôi đặc hiệu cho alen wild type. Ngược lại nếu mẫu DNA có chứa cả thể hoang dại và đột biến (L858R), ta sẽ ghi nhận được tín hiệu huỳnh quang ở cả 2 phản ứng qPCR sử dụng mồi đặc hiệu cho alen wild type và alen mutant (L858R) tương ứng.



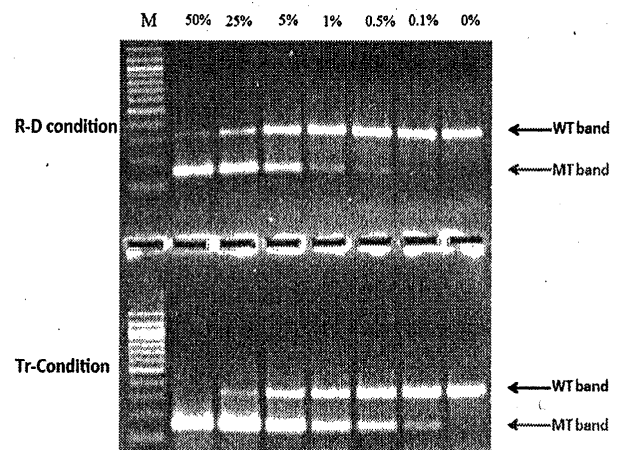
Hình 1: A) Cơ sở lý thuyết của kỹ thuật Allele specific real-time PCR chẩn đoán đột biến exon 21(L858R), B) mô hình pha loãng xác định độ nhạy của kỹ thuật chẩn đoán đột biến (L858R). Kết quả cho thấy khi chỉ có 1% mẫu DNA có đột biến thì phương pháp này cũng có thể phát hiện được. C) tín hiệu huỳnh quang được nhân lên ở cả phản ứng nội chuẩn (sử dụng bộ môi WT) và phản ứng chẩn đoán đột biến (L858R) trên mẫu bệnh phẩm L2845. Tuy nhiên mẫu bệnh phẩm K81 chỉ cho tín hiệu môi WT.

Trong thực hành sẽ xảy ra hiện tượng bắt cặp lệch (mismatch) của primer, do đó ngay cả khi mẫu DNA không chứa đột biến (L858R), tín hiệu huỳnh quang vẫn xuất hiện ở cả 2 alen. Phân tích sẽ thấy tín hiệu giả trễ hơn tín hiệu thật khoảng từ 5 đến 15 chu kỳ và tín hiệu này chỉ xuất hiện ở chu kỳ trên 35 (hình 1 B). Trong trường hợp mẫu DNA bệnh phẩm có khối lượng khoảng vài trăm nano gram, chúng tôi gần như không ghi nhận được tín hiệu bắt cặp lệch nào (hình 1 C).

3.2. Độ nhạy kỹ thuật cho chẩn đoán exon19 (delE746-A750)

Để xác định tỷ lệ DNA tối thiểu mang đột biến mất đoạn exon19 (delE746-A750) có trong mẫu bệnh phẩm mà kỹ thuật có thể phát hiện, chúng tôi tiến hành pha loãng mẫu DNA mang đột biến exon19 (delE746-A750) vào mẫu DNA người khỏe mạnh ở các tỷ lệ khác nhau, sau đó tiến hành phản ứng PCR đặc hiệu hai hướng alen [1]) ở các điều kiện khác nhau. Kết quả được thể hiện trên hình 2 cho thấy kỹ thuật của chúng tôi có thể phát hiện được đột biến exon19 (delE746-A750) khi tỷ lệ các phân tử DNA mang đột biến này xuất hiện dưới 0.1% trong mẫu bệnh phẩm (hình 2 – panel dưới). Nhạy hơn 10 lần so với phương pháp nguyên thủy

do tác giả Regine Dahse công bố (Hình 2 – panel trên) [1, 12, 13]



Hình 2: Độ nhạy kỹ thuật của xét nghiệm chẩn đoán exon19 (delE746-A750): các điều kiện của phản ứng được thiết kế sao cho nó có thứ tự ưu tiên cho sự nhân lên của băng đột biến (MT band) (137bp), hoang dại (WT band) và băng ngoại nội chuẩn (outer internal control band). Vì thế ít trường hợp ta quan sát được băng ngoại nội chuẩn.

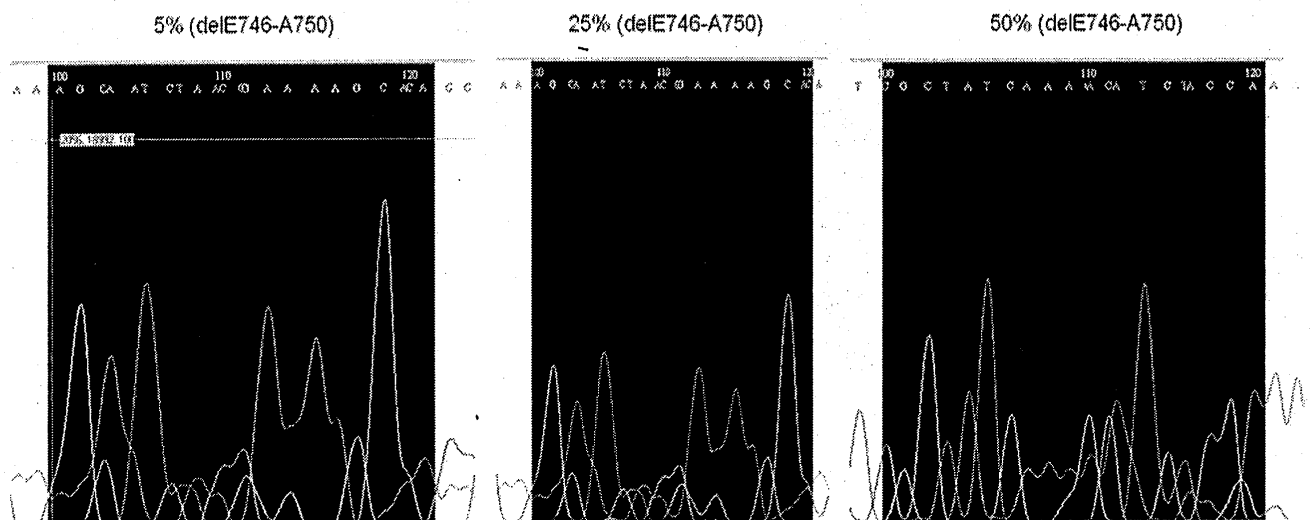
3.3. So sánh độ nhạy kỹ thuật giữa phương pháp PCR đặc hiệu hai hướng alen (bidirectional PCR amplification of specific alens – Bi-PASA) và phương pháp đọc trình tự truyền thống (Sanger sequencing): một ưu điểm của phương

pháp giải trình tự trực tiếp trong chẩn đoán đột biến gene, trong đó có đột biến EGFR là độ đặc hiệu cao, đồng thời có thể tìm ra được các vị trí đột biến mới mà các phương pháp khác không làm được nhưng yếu điểm nổi bật của giải trình tự gene là độ nhạy kỹ thuật (nếu ta quan tâm đến một vị trí đột biến cụ thể) không cao: thông thường phải cần ít nhất 25% số phân tử DNA mang đột biến có mặt trong mẫu phân tích mới cho kết quả dương tính, điều này vô tình làm tăng tỷ lệ âm tính giả.

Để chứng minh luận điểm này trong các xét

nghiệm chẩn đoán đột biến EGFR, chúng tôi tiến hành đọc trình tự các mẫu pha loãng có chứa 5%, 25% và 50% đột biến mất đoạn exon 19 (delE746-A750), kết quả hình 3 (panel trái) cho thấy mặc dù có đến 5% quần thể DNA mang đột biến mất đoạn nhưng tín hiệu sequencing chỉ cho trình tự của thể wildtype (AAGGAATTAAGAGAAGCAA).

Khi quần thể đột biến ở mức 25% (delE746-A750), (hình 3 - panel giữa), tín hiệu sequencing là sự đan xen giữa các nucleotide của cả thể wild type và thể mutant. (AAAGCAATCTAACCGAAAAGCA).



Hình 3. Kết quả đọc trình tự (Sanger sequencing) chỉ ra rằng phương pháp này chỉ có thể phát hiện được đột biến EGFR Del19 (delE746-A750) khi quần thể DNA mang đột biến lớn hơn 25% tổng số phân tử DNA trong mẫu phân tích.

Và khi quần thể đột biến đạt đến ngưỡng 50% ta mới thu được tín hiệu trình tự đặc trưng cho thể đột biến (CGCTATCAAAGACATCTACCAA).

Như vậy với một mục tiêu là tìm đột biến ở một vị trí cụ thể, phương pháp PCR đặc hiệu hai hướng alen có độ nhạy kỹ thuật cao hơn nhiều so với phương pháp đọc trình tự trực tiếp (0,1% so với 25%).

IV. BÀN LUẬN

Ung thư phổi là một trong những bệnh ác tính có thời gian tiến triển bệnh nhanh nhất và gây tử vong cao nhất trong số nhóm bệnh ung thư. Nếu chấp nhận điều trị theo phác đồ truyền thống sử dụng carboplatin- paclitaxel thời gian sống không bệnh và thời gian sống thêm của bệnh nhân UTPKTBN tương ứng là 5,4 tháng và 23,6 tháng trong khi đó con số này ở bệnh nhân chấp nhận điều trị bằng

được phẩm tyrosine kinase inhibitor (Gefitinib và Erlotinib) ức chế thụ thể biểu mô tương ứng là 10,8 và 30,5 tháng [5, 6]. Tuy nhiên đáp ứng điều trị của bệnh nhân UTPKTBN với các dược phẩm điều trị đích là hoàn toàn khác nhau: i) Chỉ có các cá thể mang đột biến (delE746-A750) hoặc (L858R) trên exon 18 và 21 mới có đáp ứng tốt với phác đồ này. ii) Các bệnh nhân khác hoặc không đáp ứng điều trị (nếu mang thụ thể EGFR hoang dại) iii) hoặc bệnh sẽ trở nên nặng nề hơn (đối với các cá thể mang đột biến trên exon 18 hoặc 20). Chính vì vậy, việc sàng lọc đột biến EGFR là một bước rất có ý nghĩa trong điều trị UTPKTBN. Trên thực tế văn bản mới nhất hướng dẫn điều trị ung thư phổi do mạng lưới ung thư quốc gia Mỹ ban hành năm 2011 cũng khuyến cáo thực hiện xét nghiệm sàng lọc đột biến (delE746-A750) và (L858R) trước khi cân

nhắc các phác đồ điều trị thích hợp cho bệnh nhân UTPKTBN.

Tuy nhiên xét nghiệm này có giá thành rất cao nếu sử dụng các kit thương mại (mặc dù độ nhạy của các kit này cũng chỉ cho phép phát hiện các phân tử DNA đột biến khi tỷ lệ mang gene đột biến đạt ngưỡng trên 1%).

Chỉ tính riêng vật tư tiêu hao, mỗi bệnh nhân có thể phải trả ít nhất 50 USD/lần xét nghiệm. Chi phí trọn vẹn cho một lần xét nghiệm có thể lên đến 5 triệu đồng/bệnh nhân như tại một số cơ sở có triển khai xét nghiệm này ở nước ta. Đây là mức giá quá cao, quá sức chịu đựng của đa số bệnh nhân do đó

rất khó phổ biến đại trà trong cộng đồng người bệnh.

Xuất phát từ những ý nghĩa đó, Khoa sinh học phân tử, BV TUQĐ 108 đã xây dựng thành công xét nghiệm chẩn đoán 2 dạng đột biến chính (delE746-A750) và (L858R) trên thụ thể EGFR với độ nhạy kỹ thuật cho phép phát hiện đột biến khi quần thể các phân tử DNA mang đột biến có mặt dưới 1% trong mẫu bệnh phẩm.

V. KẾT LUẬN

Quy trình chẩn đoán đột biến gene EGFR đã được xây dựng thành công với độ nhạy cao và có giá trị cao hơn so với giải trình tự gene trực tiếp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Có 13 tài liệu tham khảo, nếu có nhu cầu xin độc giả liên hệ với tác giả