

NGHIÊN CỨU NHIỄM SẮC THỂ PHILADELPHIA TRÊN BỆNH NHÂN BẠCH CẦU KINH DÒNG HẠT

Bùi Thị Thu Thanh¹, Nguyễn Duy Thăng¹, Nguyễn Thị Hồng Hạnh¹,
Nguyễn Văn Tránh¹, Ngô Tứ Cường¹, Hồ Thành¹,
Nguyễn Văn Sơn¹, Nguyễn Thị Thu Hiền¹

TÓM TẮT

Từ tháng 5/2011 đến tháng 8/2012, với 30 bệnh nhân được chẩn đoán bạch cầu kinh dòng hạt (CML) dựa trên hình thái học tế bào đến điều trị tại khoa Huyết học Lâm sàng-Bệnh viện Trung ương Huế, chúng tôi tiến hành đồng thời 2 kỹ thuật: nuôi cấy tế bào tìm NST Ph1 và kỹ thuật khuếch đại chuỗi gen (PCR) tìm tổ hợp gen BCR/ABL. Tỷ lệ NST Ph1 bằng phương pháp nuôi cấy tế bào là 70%, tỷ lệ BCR/ABL bằng phương pháp PCR là 96,7%. Khi khảo sát tỷ lệ NST Ph1 và tỷ lệ tổ hợp gen BCR/ABL, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai phương pháp nuôi cấy tế bào và phương pháp PCR với $p < 0,05$. Độ phù hợp K giữa kỹ thuật nuôi cấy tế bào với kỹ thuật PCR: $K = 0,18$.

Từ khóa: bạch cầu kinh dòng hạt, nhiễm sắc thể Philadelphia.

SUMMARY

PHILADELPHIA CHROMOSOME STUDIES IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOGENEOUS LEUKEMIA

Bui Thi Thu Thanh, Nguyen Duy Thang, Nguyen Thi Hong Hanh,
Nguyen Van Tranh, Ngo Tu Cuong, Ho Thanh,
Nguyen Van Son, Nguyen Thi Thu Hien

From May 2011 to August 2012, with 30 patients diagnosed of Chronic Myelogenous Leukemia (CML) based on cell morphology and were treated at the Department of Clinical Hematology-Hue Central Hospital, we also conducted two techniques: cell culture to find Ph1 chromosome and Polymerase Chain Reaction (PCR) to find the complex gene BCR/ABL. The rate of Ph1 chromosome in the cell culture method was 70%, the percentage of BCR/ABL by PCR was 96.7%. When surveyed rate Ph1 chromosome or BCR gene ratio gene BCR/ABL, the difference was statistically significant between the two methods of cell culture method and PCR method with $p < 0.05$. The match between the Kappa cell culture techniques with PCR techniques: $K = 0.18$.

Key words: Chronic Myelogenous Leukemia, Philadelphia Chromosome.

1. TT Huyết học- Truyền máu,
Bệnh viện đa khoa TW Huế

- Ngày nhận bài (received): 16/6/2013; Ngày phản biện (revised): 25/7/2013;
Ngày đăng bài (accepted): 26/8/2013
- Người phản biện: PGS.TS Phạm Như Hiệp; TS. Nguyễn Văn Bằng
- Người phản hồi (corresponding author): Bùi Thị Thu Thanh
- Email: suonguon107@gmail.com ĐT: 0905032055

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch cầu kinh dòng hạt (CML) là bệnh lý hay gặp nhất trong hội chứng rối loạn sinh tủy, đặc trưng bởi sự tăng sinh nổi trội dòng bạch cầu hạt và sự xuất hiện NST Ph1, do chuyển đoạn t (9;22) tạo ra gen BCR/ABL. Trong CML, NST Ph1 có mặt ở hơn 90% bệnh nhân, được xem là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán bệnh [2], [9]. Sự hiểu biết rõ ràng về cơ chế bệnh sinh của bệnh đã mở ra thời đại của các thuốc ức chế tyrosine kinase, chúng tác động trực tiếp và chính xác lên sự hình thành gen đột biến [3], [6]. Ở BVTW Huế, việc khảo sát NST Ph1 bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào mang lại hiệu quả không cao, tỷ lệ phát hiện NST Ph1 còn thấp. PCR là kỹ thuật sinh học phân tử có thể phát hiện chính xác tổ hợp gen BCR/ABL trên bạch cầu hạt của bệnh nhân CML. PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, tiết kiệm thời gian, giúp cho việc chẩn đoán bệnh CML nhanh chóng và chính xác hơn, nhờ đó bệnh nhân CML được điều trị sớm và điều trị đích. Trên cơ sở đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với 2 mục tiêu:

1. Xác định tỷ lệ gen tổ hợp BCR/ABL trên bệnh nhân CML bằng kỹ thuật PCR.

2. So sánh tỷ lệ gen tổ hợp BCR/ABL (dùng kỹ thuật PCR) với tỷ lệ nhiễm sắc thể Philadelphia (dùng phương pháp nuôi cấy tế bào) ở bệnh nhân CML.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

- *Chọn bệnh:* 30 bệnh nhân CML đến điều trị tại khoa Huyết học Lâm sàng – Bệnh viện Trung ương Huế từ 5/2011 đến 8/2012.

- *Tiêu chuẩn loại trừ:* các BN thuộc hội chứng tăng sinh tủy ác tính khác; phản ứng giả Loxêmi; bệnh nhân CML giai đoạn chuyển cấp; bệnh nhân CML đã qua điều trị bằng thuốc ức chế tyrosine kinase.

2.2. Phương pháp

2.2.1. *Thiết kế nghiên cứu:* Mô tả cắt ngang.

2.2.2. *Phương pháp nuôi cấy tế bào*

- Cho 1ml tủy xương đã được điều chỉnh lượng bạch cầu trong mẫu về 5-10 x 10⁹/lít vào ống môi trường nuôi cấy chứa 5ml RPMI 1640, 1ml FBS.

Ủ trong tủ ấm 37°C trong 24 giờ. Ngừng quá trình phân chia NST ở giờ 23.

- Cho 1ml máu ngoại vi đã được điều chỉnh lượng bạch cầu trong mẫu về 5-10 x 10⁹/lít vào ống môi trường nuôi cấy chứa 5ml RPMI 1640, 1ml FBS, 80ml PHA và 40μl kháng sinh. Ủ trong tủ ấm 37°C trong 72 giờ. Ngừng quá trình phân chia NST ở giờ 71.

- Thu hoạch NST bằng phương pháp sốc nhuộm trương.

- Dàn cận tế bào lên lam kính.

- Nhuộm băng G.

- Kết quả nuôi cấy tế bào lập công thức NST được đọc và phân tích theo ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) 2005 và phần mềm Epo 4.5.

2.2.3. Phương pháp khuếch đại chuỗi gen

- Ly trích RNA từ máu ngoại vi bằng bộ kit QIAamp[®]RNA Blood Mini Kit (Qiagen).

- Tổng hợp cDNA bằng bộ kit HV04-RM (Bio-rad).

- Khuếch đại cDNA bằng bộ kit HemaVision[®] 9;22 (DNA-technology A/S).

- Phát hiện gen tổ hợp BCR/ABL bằng điện di trên thạch agarose.

2.2.4. Xử lý số liệu

Các kết quả được xử lý theo phương pháp thống kê y học thông thường.

Kết quả được thể hiện dưới dạng trị trung bình và độ lệch chuẩn.

Dùng test χ^2 so sánh kết quả thu được, có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Đánh giá mức độ phù hợp giữa 2 phương pháp xét nghiệm theo hệ số Kappa.

III. KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm lâm sàng và đặc điểm huyết tủy đồ của mẫu nghiên cứu

Bảng 3.1. Đặc điểm lâm sàng

Lâm sàng	n	%
Lách to	20	66,7
Gan to	7	23,3
Thiếu máu	27	90,0

Bảng 3.2. Đặc điểm máu ngoại vi

Chỉ số		$\bar{X} \pm SD$
SLHC ($\times 10^{12}$)		3,20 $\pm$ 0,80
Hb (g/l)		92,41 $\pm$ 19,87
SLBC ($\times 10^9/l$)		116,12 $\pm$ 93,21
SLTC ($\times 10^9/l$)		477,13 $\pm$ 347,60
Tỷ lệ % các giai đoạn chưa trưởng thành của BC hạt	NTB	2,37 $\pm$ 3,07
	TTB	3,17 $\pm$ 3,13
	TB	8,03 $\pm$ 5,50
	HTB	9,47 $\pm$ 5,53
	Stab	13,00 $\pm$ 6,75
BCTT (%)		46,30 $\pm$ 18,27
BC ưa acid (%)		3,13 $\pm$ 3,33
BC ưa base (%)		3,80 $\pm$ 6,37
Mono (%)		2,47 $\pm$ 3,88
Lympho (%)		8,03 $\pm$ 9,53

Bảng 3.3. Đặc điểm tủy

Chỉ số		$\bar{X} \pm SD$
SLTB tủy ($\times 10^9/l$)		188,58 $\pm$ 120,02
Tỷ lệ % các giai đoạn của bạch cầu hạt	NTB	3,50 $\pm$ 3,10
	TTB	4,17 $\pm$ 2,91
	TB	10,10 $\pm$ 4,12
	HTB	12,10 $\pm$ 4,62
	Stab	14,17 $\pm$ 4,98
	BCTT	29,53 $\pm$ 13,87
	BC ưa acid	2,33 $\pm$ 2,58
	BC ưa base	2,60 $\pm$ 4,32
	Mono	1,13 $\pm$ 1,14
	Lympho	5,90 $\pm$ 11,61

Dấu chứng thiếu máu gặp ở 90,0%, lách to chiếm tỷ lệ 66,7%, gan to gặp ở 23,3% bệnh nhân.

Dấu hiệu thiếu máu khá rõ ràng với SLHC trung bình, Hb trung bình giảm. SLBC tăng cao, BC hạt chiếm ưu thế, với đầy đủ các giai đoạn từ non đến

già. Lympho, mono trong máu ngoại vi giảm rõ rệt. SLTC trong máu ngoại vi tăng.

SLTB tủy tăng. Các TBBC dòng hạt chiếm ưu thế với đầy đủ các giai đoạn. Mono và lympho giảm mạnh.

Tỷ lệ nam, nữ: 43,3% nam và 56,7% nữ.

Tuổi trung bình của mẫu: $50,43 \pm 18,21$.

3.2. Tỷ lệ nhiễm sắc thể Ph1 trên bệnh nhân bạch cầu kinh dòng hạt

Bảng 3.4. Tỷ lệ thành công của các phương pháp

	Nuôi cấy TB tủy	Nuôi cấy TB máu	PCR
Thành công (%)	76,7	90	100
Thất bại (%)	23,3	10	0

Bảng 3.5. Kết quả thu được của các phương pháp

Ph1 hoặc BCR/ABL	Nuôi cấy tế bào	PCR	p	K
Dương tính (%)	70	96,7	< 0,05	0,18
Âm tính (%)	30	3,3		

Có sự khác biệt giữa tỷ lệ Ph1 (+) và BCR/ABL(+).

Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Độ phù hợp Kappa giữa hai phương pháp là $K = 0,18$.

IV. BÀN LUẬN

Với CML, thiếu máu và lách to là 2 dấu chứng chủ yếu. Trong mẫu nghiên cứu của chúng tôi, thiếu máu: 90%, lách to: 66,7%. Tỷ lệ bệnh nhân thiếu máu trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn Nguyễn Ngọc Dũng. Về tình trạng lách to, nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ gần với nghiên cứu của Peruta [1], [7].

Bảng 4.1. So sánh các chỉ số tế bào tủy xương

Chỉ số	Nguyễn Ngọc Dũng [1] ($\bar{X} \pm SD$)	Nghiên cứu của chúng tôi ($\bar{X} \pm SD$)
Số lượng tế bào tủy ($\times 10^9/l$)	$404,7 \pm 144,3$	$188,58 \pm 120,02$
Tế bào Blast (%)	$4,6 \pm 1,2$	$7,67 \pm 6,01$
Tủy bào (%)	$14,2 \pm 1,7$	$10,10 \pm 4,12$
Hạ tủy bào (%)	$13,9 \pm 1,7$	$12,10 \pm 4,62$
Bạch cầu đĩa (%)	$7,6 \pm 2,4$	$14,17 \pm 4,98$
Bạch cầu đoạn trung tính (%)	$43,7 \pm 3,1$	$29,53 \pm 13,87$
Bạch cầu ưa acid (%)	$3,1 \pm 1,3$	$2,33 \pm 2,58$
Bạch cầu ưa base (%)	$4,6 \pm 2,2$	$2,60 \pm 4,32$
Lympho (%)	$1,9 \pm 0,6$	$5,90 \pm 11,61$
Mono (%)	$0,2 \pm 0,1$	$1,13 \pm 1,14$

Qua bảng trên chúng tôi nhận thấy: mặc dù có một số nét khác biệt giữa 2 nghiên cứu (có lẽ do thời điểm làm tủy đồ khác nhau) nhưng nhìn chung, công thức bạch cầu ở tủy cho thấy, tủy tăng sinh mạnh mẽ với sự giàu quá mức các tế bào tủy, các tế bào dòng hạt chiếm ưu thế và có đầy đủ các giai đoạn trưởng thành, không có khoảng trống bạch cầu.

Bảng 4.2. So sánh kết quả nuôi cấy tế bào

Thông số	Nc của chúng tôi (n=30)	Nc của Fitzgerald [4] (n=12)	p
% Nuôi cấy TB tùy thành công	76,7	83	> 0,05
% Nuôi cấy TB máu thành công	90	91,6	> 0,05
% Ph1 (+)	70	100	> 0,05

Bảng so sánh trên cho thấy: tỷ lệ thành công của các phương pháp NCTB giữa nghiên cứu của chúng tôi và của Fitzgerald tương đồng nhau [4]. Tỷ lệ Ph1 (+) của chúng tôi thấp hơn của Fitzgerald nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Với kỹ thuật RT-PCR phát hiện tổ hợp gen BCR/ABL, 100% các mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi đều thành công. Điều này khẳng định sự ưu việt của phương pháp PCR so với phương pháp nuôi cấy tế bào cổ điển. PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, nên đã góp phần chẩn đoán sớm và chính xác bệnh lý CML, đồng thời là tiêu chuẩn vàng để điều trị nhắm đích (ức chế tyrosine kinase) nhằm mục đích điều trị khỏi bệnh cho bệnh nhân.

Khi kết hợp cả hai phương pháp cấy tủy xương và cấy máu, kết quả nghiên cứu của chúng tôi là 70% số mẫu cấy có Ph1 (+). Bằng phương pháp RT-PCR, chúng tôi tìm ra được tỷ lệ BCR/ABL trên tổng số 30 bệnh nhân CML là 96,7%. So với kỹ thuật nuôi cấy tế bào để tìm NST Ph1, kỹ thuật này mang lại kết quả cao hơn rất nhiều, gần hơn với kết quả của các nghiên cứu khác: Fitzgerald (100%), T. Tomiyasu (95,3%) [4], [8]. Như vậy, một số trường hợp CML không thể phát hiện được đột biến t(9;22) khi phân tích bộ NST, lại có mặt tổ hợp gen BCR/ABL khi tiến hành với kỹ thuật RT-PCR (26,7%).

Công thức NST là xét nghiệm đầu tay nhằm phát hiện NST Ph1 khi chẩn đoán xác định CML, đánh giá mức độ lui bệnh về tế bào di truyền và tình trạng bệnh tồn lưu tương ứng. Tuy nhiên, đây là xét nghiệm có độ nhạy thấp (10^{-2}) và phụ thuộc vào việc nuôi cấy tế bào và kỹ thuật nhuộm băng nên dẫn tới khả năng thành công không cao [5].

Do vậy, khi so sánh sự phù hợp giữa phương pháp nuôi cấy tế bào và phương pháp RT-PCR tìm tổ hợp gen BCR/ABL, độ phù hợp Kappa rất thấp ($K = 0,18$).

Tuy nhiên, cũng không thể phủ nhận giá trị của di truyền học tế bào. Đây là phương pháp cổ điển được sử dụng rất rộng rãi trên thế giới. Khi lập công thức NST, ngoài xác định NST Ph1, nó còn cho phép phát hiện các dạng đột biến không được tiên liệu trước, mà các tổn thương bổ sung này có thể là dấu hiệu CML đang chuyển từ pha mạn sang pha tăng tốc hoặc pha chuyển cấp [5].

Tiếp thu những thành tựu hiện đại phối hợp với các phương pháp cổ điển là cần thiết. Định tính tổ hợp gen BCR/ABL bằng kỹ thuật PCR giúp bệnh nhân sớm tiếp cận với phác đồ điều trị đích. Bên cạnh đó, lập công thức NST để củng cố thêm cũng như để xác định các bất thường khác trên bộ NST của bệnh nhân. Phối hợp 2 phương pháp này sẽ đạt được độ chính xác cao hơn.

V. KẾT LUẬN

Tỷ lệ NST Ph1 dương tính trên bệnh nhân CML nếu dùng kỹ thuật nuôi cấy tế bào là 70%. Tỷ lệ dương tính của tổ hợp gen BCR/ABL ở bệnh nhân CML khi sử dụng kỹ thuật PCR là 96,7%. Như vậy, khi tiến hành song song hai xét nghiệm nuôi cấy tế bào và RT-PCR, tỷ lệ dương tính của BCR/ABL (dùng PCR) cao hơn tỷ lệ dương tính của NST Ph1 (NCTB) một cách có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Sự phù hợp giữa 2 phương pháp xét nghiệm nuôi cấy tế bào tìm NST Ph1 và PCR tìm tổ hợp gen BCR/ABL qua chỉ số Kappa: $K = 0,18$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Ngọc Dũng, Nguyễn Anh Trí (2008), "Nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng và huyết học bệnh Loxêmi kinh dòng hạt giai đoạn tăng tốc", *Tạp chí Y học Việt Nam*, 344, tr. 450-456.
2. Nguyễn Ngọc Minh (2007), "Loxêmi kinh dòng hạt", *Bài giảng Huyết học-Truyền máu sau đại học*, Nhà xuất bản Y học, tr. 243-251.
3. Clarkson B., Strife A., Wisniewski D., Lambek C. L., Liu C. (2003), "Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies", *Leukemia*, 17, pp. 1211-1262.
4. Fitzgerald P. H., Adams A., Gunz F. W. (1963), "Chronic Granulocytic Leukemia and the Philadelphia Chromosome", *Blood*, 21, pp. 183-196.
5. Kantarjian H., Schiffer C., Jones D., Cortes J. (2008), "Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods", *Blood*, 111, pp. 1774-1780.
6. Kenealy L. K., Christenson C. B., Williams C. B. (2008), "Current Therapies for Chronic Myeloid Leukemia", *Journal of Pharmacy Practice*, 21(2), pp. 116-125.
7. Peruta M. D., Martinelli G., Moratti E. (2010), "Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type γ Is a Functional Tumor Suppressor Gene Specifically Downregulated in Chronic Myeloid Leukemia", *Cancer Research*, 70(21), pp. 8896-8906.
8. Tomiyasu T., Sasaki M., Kondo K., Okada M. (1982), "Chromosome Banding Studies in 106 cases of Chronic Myelogenous Leukemia", *Jpn. J. Human Genet*, 27, pp. 243-258.
9. Vardiman J. W., Harris N. L., Brunning R. D. (2009), "The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes", *Blood*, 114, pp. 937-951.