

## CHẨN ĐOÁN KHUẾCH ĐẠI GEN MYCN VÀ MYCC TRÊN CÁC KHỐI U NGUYÊN BÀO TỦY BẰNG KỸ THUẬT LAI HUỲNH QUANG TẠI CHỖ

Vũ Đình Quang<sup>1</sup>, Nguyễn Xuân Huy<sup>1</sup>, An Thùy Lan<sup>1</sup>, Ngô Diễm Ngọc<sup>1</sup>, Bùi Ngọc Lan<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thu Hà<sup>2</sup>, Trần Văn Học<sup>3</sup>, Cao Vũ Hùng<sup>3</sup>, Lê Nam Thắng<sup>4</sup>, Lê Đình Công<sup>5</sup>,  
Lê Thị Kim Ngọc<sup>5</sup>, Hoàng Ngọc Thạch<sup>6</sup>, Lê Thanh Hải<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Khoa Di truyền và Sinh học phân tử, <sup>2</sup>Khoa Ung bướu, <sup>3</sup>Khoa Thần kinh,  
<sup>4</sup>Khoa Ngoại Thần kinh, <sup>5</sup>Khoa Chẩn đoán hình ảnh, <sup>6</sup>Khoa Giải phẫu bệnh,  
<sup>7</sup>Khoa Cấp cứu chống độc, Bệnh viện Nhi Trung ương

### TÓM TẮT

U nguyên tủy bào là một khối u não ác tính phổ biến ở trẻ em. Hiện nay, cùng với các đặc điểm lâm sàng khác, thông tin về bộ máy di truyền của tế bào u tham gia vào việc phân nhóm chính xác cho bệnh nhân, từ đó đưa ra phác đồ điều trị thích hợp. Ở đó, xác định sự khuếch đại 2 gen MYCN và MYCC là yêu cầu đầu tiên của các bác sĩ lâm sàng. Mục tiêu: Chẩn đoán khuếch đại gen MYCN và MYCC bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) trên 23 bệnh nhân nguyên tủy bào từ tháng 11/2017 đến tháng 7/2018. Phương pháp: Kỹ thuật FISH được thực hiện trên tiêu bản u nén đã qua xử lý tủy nén. Đầu dò cho gen MYCC đánh dấu vào 2 đầu gen này; còn đầu dò cho gen MYCN đánh dấu vào vị trí gen này và tâm động nhiễm sắc thể số 2. Kết quả: 1/23 bệnh nhân phát hiện khuếch đại gen MYCC và 1/17 bệnh nhân xác định có khuếch đại gen MYCN. Bàn luận: Các tín hiệu FISH trong nghiên cứu này đều rõ ràng, và có thể phân biệt được với các tế bào bình thường. Tuy nhiên, mẫu bệnh phẩm u tươi vẫn là yêu cầu hàng đầu cho các xét nghiệm di truyền ung thư vì khả năng sử dụng cho các xét nghiệm khác. Kết luận: Chẩn đoán khuếch đại gen MYCN và MYCC bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ đã được triển khai thành công tại khoa Di truyền và Sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương đáp ứng các yêu cầu của lâm sàng.

**Từ khóa:** U nguyên tủy bào, kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ, MYCN, MYCC.

### ABSTRACT

#### DIAGNOSIS OF MYCN AND MYCC AMPLIFICATION ON MEDULLOBLASTOMA BY FLUORESCENT IN-SITU HYBRIDIZATION TECHNIQUE

Vũ Đình Quang<sup>1</sup>, Nguyễn Xuân Huy<sup>1</sup>, An Thùy Lan<sup>1</sup>, Ngô Diễm Ngọc<sup>1</sup>,  
Bùi Ngọc Lan<sup>2</sup>, Nguyễn Thu Hà<sup>2</sup>, Trần Văn Học<sup>3</sup>, Cao Vũ Hùng<sup>3</sup>, Lê Nam Thắng<sup>4</sup>,  
Lê Đình Công<sup>5</sup>, Lê Thị Kim Ngọc<sup>5</sup>, Hoàng Ngọc Thạch<sup>6</sup>, Lê Thanh Hải<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Human Genetics Department, <sup>2</sup>Oncology Department, <sup>3</sup>Neurology Department,  
<sup>4</sup>Neurosurgery Department, <sup>5</sup>Radiology Department,  
<sup>6</sup>Pathology Department, <sup>7</sup>Emergency Department, National Children's Hospital

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant brain tumor of children. Genetic information and other clinical characteristics play the role in stratification of MB, in which the amplification of MYCC and MYCN genes is the first clinical demand. Aim: Diagnosis of MYCN and MYCC amplification by fluorescent in-situ hybridization (FISH) technique on medulloblastoma

Nhận bài: 5-10-2018; Thẩm định: 15-10-2018; Chấp nhận: 15-1-2019

Người chịu trách nhiệm chính: Vũ Đình Quang

Địa chỉ: Khoa Di truyền và Sinh học phân tử - Bệnh viện Nhi Trung ương

patients from November 2017 to July 2018. **Method:** FISH is performed on the paraffin section after the paraffin removal procedure. Probe for MYCC marks on 5' and 3' of gene; probe for MYCN marks on MYCN gene and centromere of chromosome 2. **Results:** 1 in 23 MB patients found the MYCC amplification and 1 in 17 patients had the amplified MYCN. **Discussion:** The signals of FISH in this study are clearly distinguishable from normal cells. However the fresh tumor materials are still high recommended for genetic test, because of the ability of usage in other techniques. **Conclusion:** The diagnosis of MYCN and MYCC amplification by FISH is well established in Human Genetics Department, National Children's Hospital.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

U nguyên tủy bào (medulloblastoma) là khối u ác tính của hệ thần kinh trung ương, bắt nguồn từ tiểu não và hố sau. Khối u này chiếm khoảng 10-20% các khối u não trẻ em và khoảng 40% các khối u ở hố sọ sau. Đây là một loại ung thư biểu mô thần kinh, có tốc độ tăng trưởng nhanh chóng và khả năng xâm lấn sang các khu vực khác của hệ thống thần kinh trung ương trong dịch não tủy từ rất sớm [1]. U nguyên tủy bào hay gặp ở tiểu não, là vùng kiểm soát thăng bằng và một số chức năng vận động phức tạp. Do vậy, bệnh nhân thường có các triệu chứng của tăng áp lực sọ não

(đau đầu, buồn nôn, mệt mỏi), mắt thăng bằng và giảm phối hợp các động tác. Trẻ đôi khi thấy đau lưng và giảm trương lực, giảm vận động chi dưới. Tuổi chẩn đoán trung bình từ 3 đến 8 tuổi (40% ở trẻ dưới 5 tuổi) [2]. Phác đồ điều trị cơ bản nhất là phối hợp phẫu thuật, xạ trị và hóa trị. Thời gian sống bình quân ở các nhóm tuổi là 60%, 52% và 47% tương ứng với 5 năm, 10 năm và 20 năm [1].

Hiện nay, u nguyên tủy bào được chia thành 4 phân nhóm là WNT (wingless), SHH (Sonic Hedgehog), nhóm 3 và nhóm 4, căn cứ vào các đặc điểm mô bệnh học và biến đổi di truyền [3, 4]. Mỗi phân nhóm lại có các phân bố tuổi, biến đổi di truyền và tỷ lệ sống riêng biệt (Bảng 1).

**Bảng 1. Đặc điểm 4 phân nhóm trong u nguyên tủy bào**

	Nhóm WNT	Nhóm SHH	Nhóm 3	Nhóm 4
<b>Thống kê</b>				
Tỷ lệ	~10%	~30%	~25%	~35%
Phân bố theo giới tính (nam:nữ)	1:1	1,5:1	2:1	3:1
Phân bố theo tuổi	Trẻ lớn	Nhũ nhi, trẻ em và người lớn	Phần lớn nhũ nhi	Trẻ lớn và thiếu niên
<b>Đặc điểm lâm sàng</b>				
Mô bệnh học	Cổ điển, hiếm tế bào lớn/bất thực sản	Sinh sợi/nốt, cổ điển, tế bào lớn/bất thực sản	Cổ điển, tế bào lớn/bất thực sản	Cổ điển, tế bào lớn/bất thực sản
Di căn tại thời điểm chẩn đoán	5%-10%	15%-20%	40%-45%	35%-40%
Tiên lượng	Rất tốt	Tốt với nhũ nhi, trung bình với các nhóm tuổi khác	Xấu	Trung bình
<b>Đặc điểm di truyền (-: mất; +: thêm; p: cánh ngắn; q: cánh dài)</b>				
Biến đổi NST	6-	3q+, 9p+, 9q-, 10q-, 14q-, 17p-	1q+, 7+, 17q+, 18+, 8-, 10q-, 11-, 16q-, 17p-	4+, 7+, 17q+, 18+, 8-, 10-, 11-, 17p-, X-
Đột biến gen chính	CTNNB1 (90.6%)	- PTCH1 (28%) - Khuếch đại gen MYCN (8,2%)	Khuếch đại gen MYCC (16,7%)	- KDM6A (13%) - Khuếch đại gen MYCN (6,3%)

Hai gen MYCN (2p24) và MYCC (8q24) đều là những gen tiền ung thư, góp phần quan trọng vào hình thành các khối u ác tính khi bị đột biến khuếch đại. Việc xác định khuếch đại gen MYCN và MYCC có ý nghĩa quan trọng trong việc phân nhóm bệnh nhân u nguyên tủy bào. Đặc điểm di truyền này xuất hiện ở 3/4 phân nhóm (SHH, nhóm 3 và nhóm 4) và có giá trị loại trừ cho phân nhóm còn lại (WNT). Một trong những kỹ thuật di truyền hiện nay đang được sử dụng rộng rãi để xác định khuếch đại họ gen MYC là kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) [5].

Lai huỳnh quang tại chỗ là một kỹ thuật di truyền tế bào, sử dụng đầu dò huỳnh quang đặc hiệu gắn vào vùng gen/nhiễm sắc thể nghiên cứu để từ đó đánh giá trạng thái của gen/vùng nhiễm sắc thể này. Ưu điểm của kỹ thuật chính là độ chính xác cao, thực hiện trên nhiều mẫu bệnh phẩm khác nhau và thời gian trả kết quả nhanh chóng.

Tại Bệnh viện Nhi Trung ương, có khoảng 20 bệnh nhân mới đến chẩn đoán hàng năm. Việc phân nhóm chính xác các bệnh nhân này có ý nghĩa quan trọng trong tối ưu hóa phương pháp điều trị và tăng tỷ lệ điều trị thành công [2]. Từ nhu cầu của các bác sĩ lâm sàng như vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu “Chẩn đoán khuếch đại gen MYCN và MYCC trên các khối u nguyên bào tủy bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ” với mục tiêu *triển khai thành công xét nghiệm này tại khoa Di truyền và sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương.*

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

23 bệnh nhân u nguyên tủy bào được chỉ định làm xét nghiệm di truyền từ tháng 11 năm 2017 đến hết tháng 7 năm 2018.

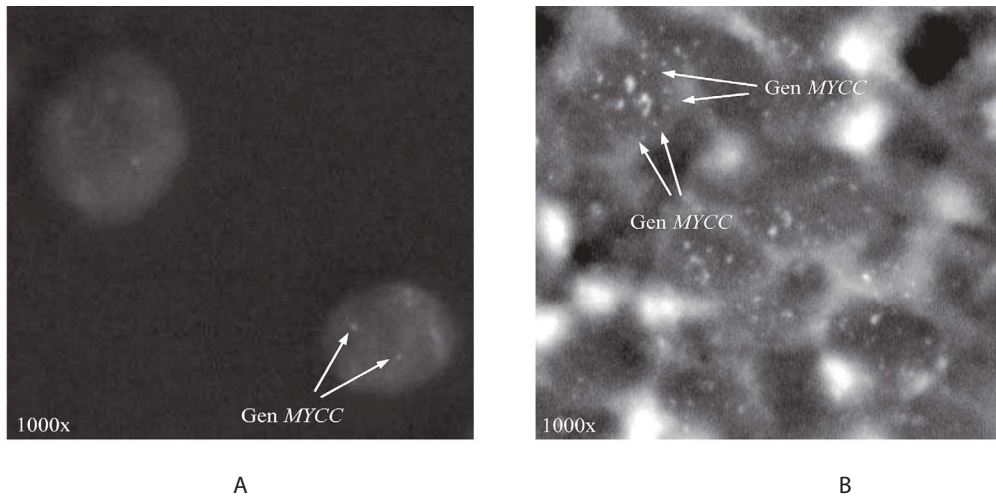
### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ được thực hiện trên tiêu bản u nén. Tiêu bản u nén trải qua quá trình tẩy nén để bộc lộ tế bào u bằng kit SPOT-Light Tissue Pretreatment (Invitrogen) với thời gian xử lý bằng enzym là 25 phút. Đầu dò đặc hiệu đánh giá trạng thái gen MYCC là LSI MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis), đầu dò 2 màu đánh dấu vào 2 đầu của gen MYCC trên cánh dài nhiễm sắc thể số 8. Đầu dò đặc hiệu đánh giá trạng thái gen MYCN là LSI N-MYC (2p24) SpectrumGreen/ CEP 2 SpectrumOrange Probe (Vysis), đầu dò 2 màu đánh dấu vào vùng gen MYCN trên cánh ngắn nhiễm sắc thể số 2 và vùng tâm động nhiễm sắc thể số 2 (đối chứng).

Đầu dò đặc hiệu được phủ lên mảnh u, biến tính ở 80°C trong 4 phút và lai ở 37°C qua đêm. Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang để đánh giá trạng thái gen MYCN/MYCC thông qua số lượng tín hiệu quan sát được.

## 3. KẾT QUẢ

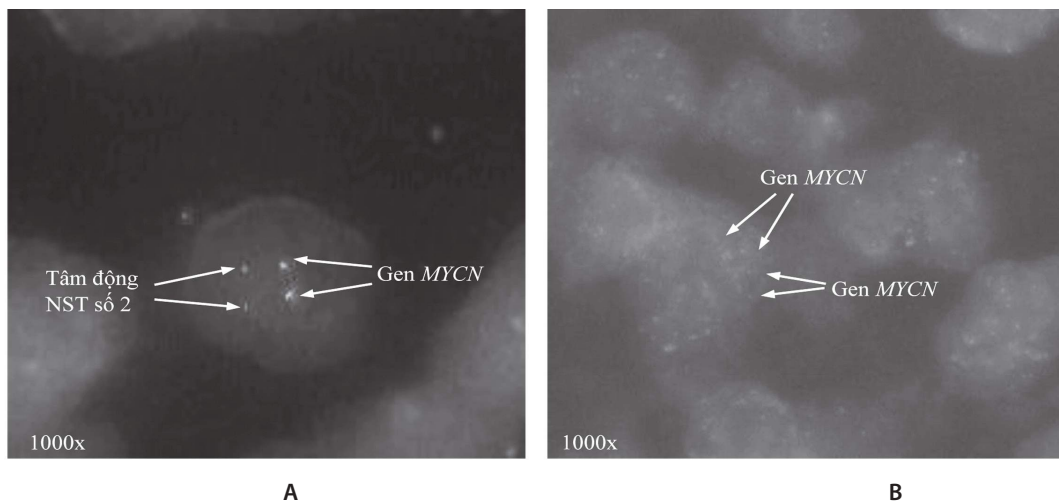
Cả 23 bệnh nhân u nguyên tủy bào đều được chỉ định xét nghiệm đánh giá khuếch đại gen MYCC. Trong số đó, có 1 bệnh nhân phát hiện khuếch đại gen MYCC.



**Hình 1. Hình ảnh lai huỳnh quang tại chỗ cho gen MYCC**

A. Không khuếch đại gen; B. Khuếch đại gen

Có 17/23 bệnh nhân u nguyên tủy bào được xác định khuếch đại gen MYCN bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ, do 6 bệnh nhân đầu tiên chỉ được sàng lọc gen MYCC. Có 1/17 bệnh nhân phát hiện khuếch đại gen MYCN.



**Hình 2. Hình ảnh lai huỳnh quang tại chỗ cho gen MYCN**

A. Không khuếch đại gen; B. Khuếch đại gen

#### 4. BÀN LUẬN

U nguyên tủy bào là một khối u ác tính phổ biến ở tiểu não. Kết quả điều trị của nhóm u này phụ thuộc vào việc phân nhóm chính xác bệnh nhân, từ đó đưa ra phác đồ điều trị thích hợp. Kết quả điều trị thành công có thể lên tới 90% ở phân nhóm WNT. Cũng như nhiều khối u khác như u nguyên bào thần kinh..., các biến đổi di truyền được sử dụng rộng rãi và góp phần quan

trọng vào việc phân nhóm bệnh nhân và đưa ra tiên lượng điều trị. Một trong những biến đổi di truyền được quan tâm trên các khối u nguyên tủy bào là trạng thái của hai gen MYCN và MYCC.

Phương pháp thường được sử dụng để phát hiện đột biến khuếch đại 2 gen này là lai huỳnh quang tại chỗ. Đây là một kỹ thuật đã được tối ưu hóa và ổn định tại khoa Di truyền và Sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương. Vì vậy, khi

sử dụng trên các khối u nguyên thủy bào trong nghiên cứu này, các kết quả thu được đều rõ ràng và chính xác. Đối với gen MYCC trên nhiễm sắc thể số 8 (8q24), đầu dò 2 màu đánh dấu vào 2 đầu (5' và 3') của gen này. Do vậy, khi gen khuếch đại, cả 2 tín hiệu đều sẽ tăng số lượng giống nhau. Điều này đã được thể hiện qua hình ảnh khuếch đại gen MYCC (Hình 1B). Đối với gen MYCN trên nhiễm sắc thể số 2 (2p24), đầu dò 2 màu đánh dấu màu xanh vào vị trí gen, và màu đỏ vào tâm động. Khi gen khuếch đại, chỉ tín hiệu màu xanh mới có tăng số lượng. Hình ảnh kết quả khuếch đại gen MYCN (Hình 2B) cho thấy số lượng lớn tín hiệu màu xanh so với tín hiệu đỏ. Như vậy, kết quả lai huỳnh quang tại chỗ trong nghiên cứu này đều rõ ràng, cho thấy chính xác trạng thái của gen MYCN và MYCC. Tuy nhiên, chỉ có số ít bệnh nhân phát hiện bất thường (1/23 bệnh nhân có khuếch đại gen MYCC và 1/17 bệnh nhân có khuếch đại gen MYCN) do số lượng mẫu thu thập được không nhiều.

Mặt khác, qua kết quả nghiên cứu này, việc sử dụng u nén cho các xét nghiệm di truyền cho thấy nhiều hạn chế. Đầu tiên, việc đưa ra kết luận lai huỳnh quang tại chỗ gặp nhiều khó khăn trong một số trường hợp. Các tín hiệu huỳnh quang đôi khi có độ sáng kém và không thực sự rõ ràng khi phân tích bước đầu. Nguyên nhân là vì các tiêu bản u nén cần phải trải qua quá trình loại bỏ nén ra khỏi tế bào u. Đây là bước xử lý quan trọng, có tính quyết định đến thành bại của một xét nghiệm di truyền. Việc tối ưu thời gian xử lý với enzym cần nhiều thời gian và phụ thuộc vào đặc điểm mô tế bào. Bên cạnh đó, việc thực hiện các xét nghiệm chuyên sâu hơn với mẫu u nén là không khả thi khi tỷ lệ thành công chỉ khoảng 50%. Ví dụ trên các khối u nguyên thủy bào, các biến đổi di truyền không chỉ liên quan đến đột biến gen mà còn có nhiều thay đổi ở mức độ nhiễm sắc thể như mất nhiễm sắc thể số 6 ở phân nhóm WNT hay mất

cánh dài các nhiễm sắc thể số 9, 10, 14 ở phân nhóm SHH... Các biến đổi này có thể được phát hiện chỉ với một lần xét nghiệm với kỹ thuật lai so sánh hệ gen. Tuy nhiên, yêu cầu về mẫu cho xét nghiệm này là mẫu u không cố định trong nén. Như vậy, mẫu bệnh phẩm u tươi thu thập ngay sau cuộc sinh thiết luôn là mẫu bệnh phẩm tối ưu cho các xét nghiệm di truyền ung thư.

## 5. KẾT LUẬN

Chẩn đoán khuếch đại gen MYCN và MYCC trên các khối u nguyên thủy bào bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ đã được thực hiện thành công tại khoa Di truyền và Sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương, đáp ứng nhu cầu của lâm sàng trong việc phân nhóm bệnh nhân ngay từ trước khi điều trị.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kumar L. P. et al., "Medulloblastoma: A common pediatric tumor: Prognostic factors and predictors of outcome", *Asian Journal of Neurosurgery* 10(1), 50.
2. Trần Văn Học (2016), "Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học và đánh giá kết quả điều trị u tiểu não trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương", Luận án tiến sĩ Y học, Đại học Y Hà Nội.
3. Parsons W. et al (2011), "The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma", *Science* 311 (6016), 435-439.
4. Northcott P.A., Buchhalter I. et al., (2017) "The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes", *Nature* 547, 311-317.
5. Skowron P., Ramaswamy V. and Taylor M. D. (2015) "Genetic and Molecular Alterations Across Medulloblastoma Subgroups", *Journal of Molecular Medicine* 93(10), 1075-1084.