

ĐÁNH GIÁ SỰ KHUẾCH ĐẠI GEN MYCN TRÊN BỆNH NHÂN U NGUYÊN BÀO THẦN KINH

Vũ Đình Quang¹, Nguyễn Xuân Huy¹, Nguyễn Thị Phương Mai¹,
Phùng Tuyết Lan², Trần Đức Hậu², Trần Ngọc Sơn³, Hoàng Ngọc Thạch⁴, Bùi Khắc Hiếu⁵,
Ngô Diễm Ngọc¹, Nguyễn Thanh Liêm³

¹ Khoa Di truyền và Sinh học phân tử - Bệnh viện Nhi TW

² Khoa Ung bướu - Bệnh viện Nhi TW

³ Khoa Ngoại - Bệnh viện Nhi TW

⁴ Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Nhi TW

⁵ Khoa Chẩn đoán hình ảnh - Bệnh viện Nhi TW

TÓM TẮT

U nguyên bào thần kinh (NBTK) là loại u ác tính thường gặp nhất ở trẻ nhỏ, tỷ lệ mắc là 10,2/1.000.000 trẻ dưới 15 tuổi. Một số biến đổi di truyền trong u NBTK có ý nghĩa quan trọng trong việc lựa chọn phác đồ điều trị và tiên lượng bệnh, trong đó sự khuếch đại gen MYCN được xem là yếu tố quan trọng nhất. **Mục tiêu:** Phát hiện sự khuếch đại gen MYCN trên các bệnh nhân u NBTK bằng kỹ thuật FISH (Fluorescence insitu Hybridization) và kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Bệnh nhân u NBTK tại BV Nhi TW được phẫu thuật cắt u hoặc sinh thiết u, kèm theo chọc hút dịch tủy xương trong trường hợp có di căn tủy, được tiến hành kỹ thuật FISH và PCR cho MYCN. **Kết quả:** Trong tổng số 100 mẫu bệnh phẩm (từ 2010 đến 2012), có 18 mẫu u và 03 mẫu tủy phát hiện thấy có khuếch đại MYCN bằng kỹ thuật FISH, 01 mẫu u phát hiện thấy có khuếch đại MYCN bằng kỹ thuật PCR. **Kết luận:** Đánh giá sự khuếch đại gen MYCN bằng kỹ thuật FISH và PCR đã được thực hiện thành công tại khoa Di truyền và SHPT Bệnh viện Nhi TW, có ý nghĩa quan trọng hỗ trợ cho các bác sĩ lâm sàng trong việc phân nhóm bệnh nhân và lựa chọn phác đồ điều trị thích hợp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

U nguyên bào thần kinh (*Neuroblastoma*) là một khối u phôi thai của hệ thần kinh giao cảm, ở đó tế bào khởi đầu là nguyên bào thần kinh đang phát triển và chưa biệt hóa xuất phát từ mào thần kinh. Do vậy, u nguyên bào thần kinh (NBTK) thường xảy ra ở trẻ nhỏ, là loại ung thư ngoài sọ phổ biến nhất ở trẻ em dưới 1 tuổi (7-10%), với độ tuổi chẩn đoán trung bình khoảng 18 tháng. Tỷ lệ mắc mới của u NBTK là 1/7.000 trẻ để sống [1,2,3].

Nhiều đặc điểm biến đổi di truyền của u NBTK đã được ghi nhận, và được xác định có quan hệ với lâm sàng như: trạng thái bội thể, sự khuếch đại gen

tiền ung thư MYCN, các mất đoạn dị hợp tử. Các biến đổi di truyền này được chia thành hai nhóm lớn: biến đổi về số lượng (*numerical chromosome alterations - NCAs*) và biến đổi về cấu trúc nhiễm sắc thể (*segmental chromosome alterations - SCAs*). Trong đó, khuếch đại gen MYCN là một trong các biến đổi về cấu trúc nhiễm sắc thể (NST) có giá trị tiên lượng quan trọng nhất [4,5].

MYCN là một gen tiền ung thư (*proto-oncogene*) nằm trên cánh ngắn NST số 2 (2p24). Tuy nhiên, sự khuếch đại gen MYCN thường được tìm thấy ở ngoài vị trí này. Sự khuếch đại MYCN thường gặp ở giai đoạn muộn (III, IV) của u NBTK tiên

phát trên các bệnh nhân chưa được điều trị, hoặc đôi khi được phát hiện ở các u NBTK có độ ác tính cao, với tỷ lệ gặp khoảng 20-25%. Đối với u NBTK có khuếch đại gen MYCN, thì dù ở lứa tuổi hay giai đoạn bệnh nào, đều có tiên lượng xấu, tỷ lệ sống trên 5 năm của bệnh nhân chỉ khoảng 30%.

Ngoài ra, có một số biến đổi về cấu trúc NST khác, tồn tại độc lập hoặc có mối liên quan chặt chẽ với sự khuếch đại gen MYCN cũng có ý nghĩa quan trọng trong tiên lượng bệnh u NBTK như: mất đoạn ở cánh ngắn NST số 1 (1p36) gặp ở khoảng 35% trường hợp, mất đoạn ở cánh dài NST 11 (11q23) gặp 43% trường hợp, thêm đoạn cánh dài NST 17 (17q21-qter) gặp khoảng 50-75% trường hợp. Những biến đổi di truyền này đều có tiên lượng xấu, hoặc tiên lượng tái phát đối với việc điều trị trong u NBTK [6].

Hiện nay, có một số kỹ thuật di truyền hiện đại được ứng dụng để phát hiện sự khuếch đại gen MYCN như: kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) [7], PCR, Real-time PCR. Mỗi kỹ thuật đều có ưu nhược điểm riêng, trong đó FISH được coi là kỹ thuật cho phép đánh giá sự khuếch đại MYCN toàn diện hơn cả, so với kỹ thuật PCR và Real-time PCR. Tại bệnh viện Nhi Trung Ương, hàng năm có khoảng 60 trường hợp được chẩn đoán mắc mới u NBTK ở các giai đoạn và độ tuổi khác nhau. Do vậy, việc đánh giá sự khuếch đại gen MYCN là một nhu cầu cần thiết trong lựa chọn phác đồ điều trị, theo dõi đáp ứng và tiên lượng kết quả. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu:

Phát hiện sự khuếch đại gen MYCN trên các bệnh nhân u NBTK bằng kỹ thuật FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) và kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction).

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Các bệnh nhân đến khám và chẩn đoán mắc mới u NBTK tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 2010 đến năm 2012. Các bệnh nhân này được phẫu thuật để sinh thiết hoặc cắt u, hoặc/và được chọc dịch tủy xương để đánh giá sự di căn vào tủy để thực hiện các xét nghiệm liên quan, trong đó

có xét nghiệm di truyền đánh giá sự khuếch đại MYCN.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Mẫu bệnh phẩm

- Mẫu u đặc sinh thiết được thu thập qua phẫu thuật, hay block nén đã cố định

- Dịch tủy xương trên các bệnh nhân có di căn tủy (>10% tế bào di căn)

Mẫu bệnh phẩm u và dịch tủy xương sẽ sử dụng để đánh giá sự khuếch đại gen MYCN bằng kỹ thuật FISH hoặc PCR.

2.2.2. Kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH)

Kỹ thuật FISH được sử dụng để xác định sự khuếch đại hay không khuếch đại gen MYCN thông qua việc gắn một cặp mồi DNA đã được đánh dấu huỳnh quang vào vùng gen MYCN trên NST số 2 (2p24). FISH có thể được sử dụng cho cả mẫu bệnh phẩm u và tủy xương.

- Chuẩn bị tiêu bản: Mẫu bệnh phẩm u không cố định (thu thập ngay sau khi phẫu thuật) được cắt lạnh và cố định trên lam kính bằng dung dịch methanol tuyệt đối. Với mẫu bệnh phẩm u nén, tiêu bản gắn lát cắt u sẽ được xử lý để loại bỏ nén và các chất thừa trước khi lai với đầu dò đặc hiệu. Đối với tủy xương, cặn tế bào tủy đã qua nuôi cấy 24 giờ được phun trên lam kính sạch, để khô trên hotplate (Thermo) 60°C. Cả hai loại tiêu bản này đều được kiểm tra trên kính hiển vi soi ngược đánh giá mật độ tế bào trên vùng tiêu bản được tiếp xúc với đầu dò. Số lượng yêu cầu khoảng 10-15 tế bào/vi trường, hoặc 1-2 cụm nhiễm sắc thể/vi trường.

- Lai đầu dò đặc hiệu: Sử dụng đầu dò hai màu LSI N-MYC (2p24) Spectrum Green/ CEP 2 Spectrum Orange (Vysis) để đánh dấu vào hai vị trí trên nhiễm sắc thể số 2: màu xanh đánh dấu vào vị trí gen MYCN (2p24) và tín hiệu đối chứng màu đỏ đánh dấu vào tâm động nhiễm sắc thể số 2.

- Phân tích: Sử dụng hệ thống kính hiển vi huỳnh quang với phần mềm ISIS (Metasystem). Tiêu chuẩn phát hiện dựa vào các tín hiệu của đầu dò: số lượng tín hiệu xanh và đỏ sẽ cho biết số lượng bản sao của gen MYCN và số lượng NST số 2. Không có khuếch đại MYCN: 2 tín hiệu xanh. Có khuếch đại gen MYCN: số tín hiệu xanh (nằm rải rác hay tập trung thành cụm lớn) tăng lên tủy

theo số bản sao của gen MYCN. Số lượng tín hiệu đồ có thể thay đổi từ 1 đến nhiều hơn 2 tín hiệu tùy theo mức độ khuếch đại gen MYCN.

2.2.3. Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)

Chỉ sử dụng cho mẫu bệnh phẩm u đặc thu thập qua phẫu thuật

- Tách chiết ADN từ khối u: 25mg khối u được tách ADN bằng kit tách ADN (QIAamp DNA mini kit)

- Kỹ thuật PCR: ADN u của mỗi bệnh nhân được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR nhờ các cặp mồi đặc hiệu đã được thiết kế sẵn. Trình tự cặp mồi và chu trình nhiệt cho gen MYCN được thiết kế theo Elizabeth Alga và cs.

- Điện di: Sản phẩm PCR của gen MYCN được điện di trên thạch agarose 1%, cùng với mẫu chứng bình thường và mẫu chứng khuếch đại để nhận biết sự khuếch đại gen MYCN.

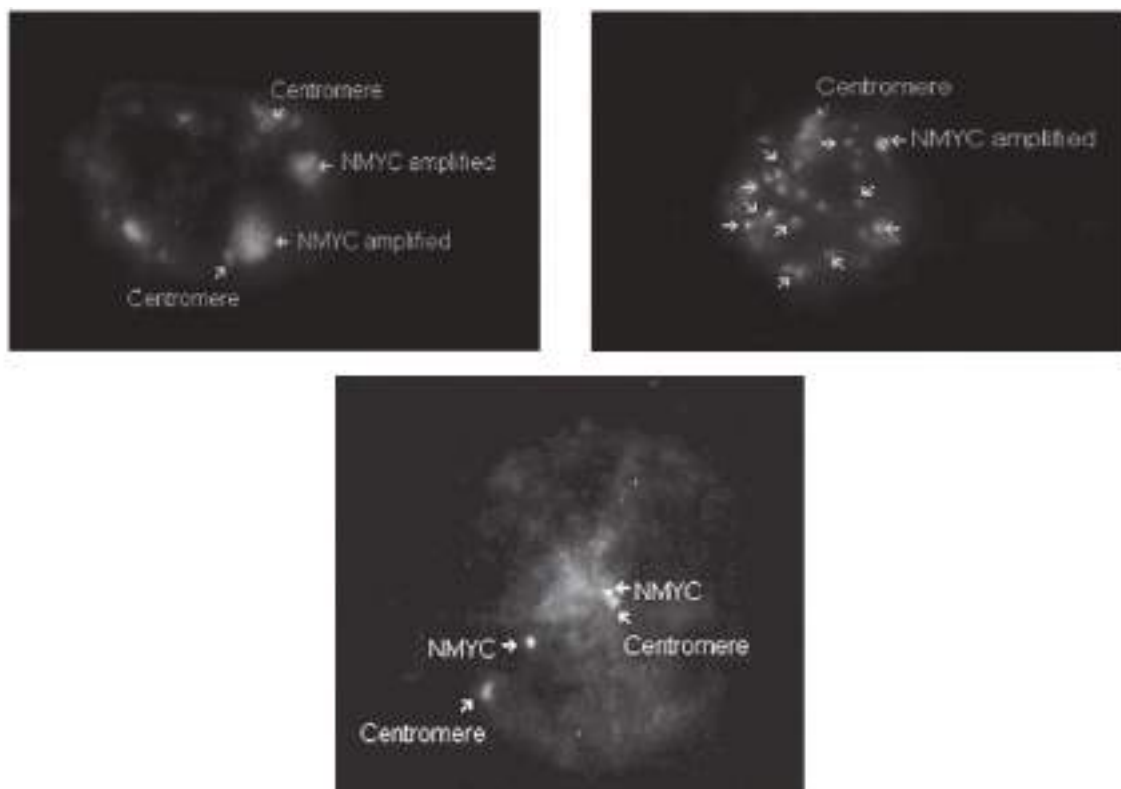
3. KẾT QUẢ

Từ năm 2010 đến năm 2012, có tất cả 100 mẫu bệnh phẩm được thu thập tại khoa Di truyền và SHPT để làm các xét nghiệm di truyền đánh giá khuếch đại gen MYCN. Trong đó có 93 mẫu bệnh phẩm u và 7 mẫu bệnh phẩm tủy xương. Trong 93 mẫu bệnh phẩm u, có 88 mẫu bệnh phẩm u được thu thập ngay sau cuộc phẫu thuật và 5 mẫu bệnh phẩm u nén.

3.1. Đánh giá sự khuếch đại gen MYCN bằng kỹ thuật FISH

3.1.1. Trên mẫu bệnh phẩm u

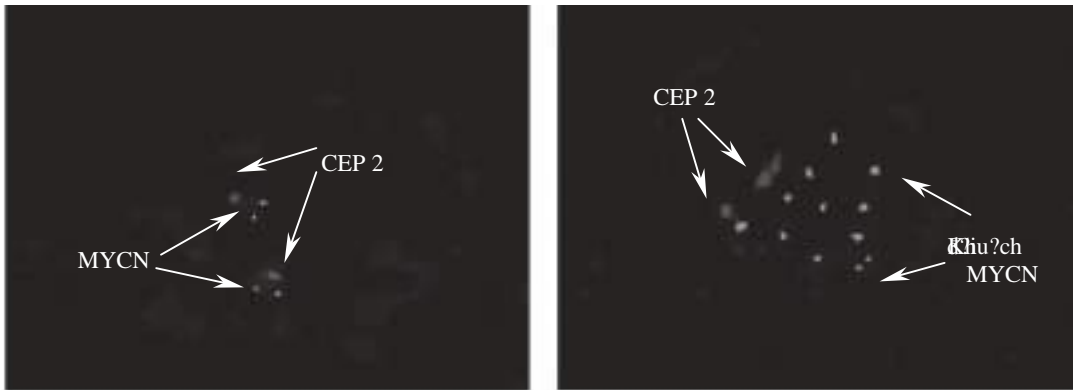
Tổng số có 82 mẫu bệnh phẩm u của các bệnh nhân u NBTK được ứng dụng kỹ thuật FISH để phát hiện sự khuếch đại gen MYCN. Trong đó, phát hiện được 18 trường hợp có sự khuếch đại gen MYCN và 64 trường hợp không có khuếch đại MYCN.



Hình 1. FISH đánh giá khuếch đại MYCN trên tế bào u đặc

3.1.2. Trên mẫu bệnh phẩm tủy xương

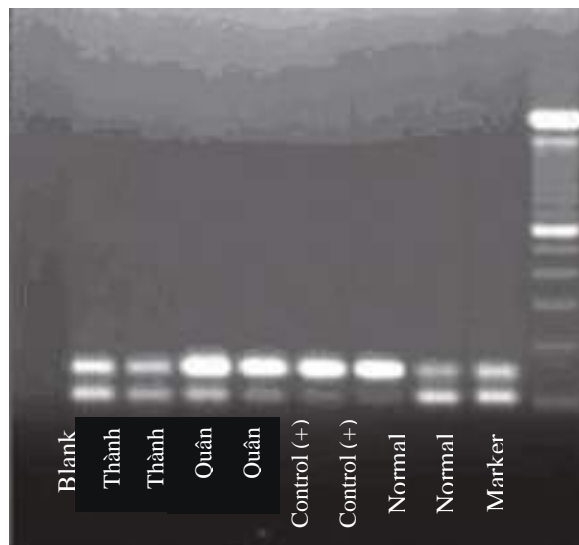
Có 7 trường hợp u NBTK được kết luận có di căn tủy xương, được thực hiện kỹ thuật FISH để đánh giá khuếch đại MYCN. Trong đó, có 3 trường hợp phát hiện thấy có khuếch đại MYCN.



Hình 2. FISH đánh giá khuếch đại MYCN trên tế bào tủy xương

2. Đánh giá sự khuếch đại gen MYCN bằng kỹ thuật PCR

Song song với kỹ thuật FISH, chúng tôi xây dựng và ứng dụng kỹ thuật PCR trong việc đánh giá sự khuếch đại gen MYCN ở mức độ phân tử. Có 11 trường hợp u NBTK được áp dụng kỹ thuật PCR này, trong đó có 01 trường hợp có khuếch đại MYCN.



Hình 3. PCR đánh giá khuếch đại MYCN trên bệnh phẩm u đặc

4. BÀN LUẬN

Trong 3 năm, 100 trường hợp u NBTK đã được chúng tôi thu thập và ứng dụng các kỹ thuật di truyền (FISH và PCR) để đánh giá sự khuếch đại MYCN.

Bệnh nhân N	Bệnh phẩm u				Tủy (FISH)	
	FISH		PCR		Khuếch đại NMYC	Khuếch đại NMYC
	Khuếch đại NMYC	Khuếch đại NMYC	Khuếch đại NMYC	Khuếch đại NMYC		
2	0		0			+
1		+	0			+
4	—		0		—	
16		+	0		0	
60	—		0		0	
9	0		—		0	
1		+		+	0	
1	±		—		0	
N=94		18				2
<i>Chú thích:</i>						
0	<i>không làm</i>		+	<i>dương tính</i>		
—	<i>âm tính</i>		±	<i>không đọc được kết quả</i>		

- Có 93 mẫu bệnh phẩm u và 07 mẫu bệnh phẩm dịch tủy xương được thu thập. Có 05 trường hợp đã được đánh giá khuếch đại MYCN trên cùng một lúc đối với cả hai mẫu bệnh phẩm.

- Trong 93 mẫu bệnh phẩm u, có 82 trường hợp chỉ được làm FISH, 09 trường hợp chỉ được làm PCR, và 02 trường hợp được làm đồng thời cả FISH và PCR để đánh giá sự khuếch đại MYCN.

- Chúng tôi đã phát hiện được sự khuếch đại gen MYCN trên 21 trường hợp (cả mẫu bệnh phẩm u và tủy xương) trong tổng số 94 bệnh nhân. Như vậy tỷ lệ phát hiện sự khuếch đại gen MYCN trên các bệnh nhân u NBTK của chúng tôi là khoảng 21%. Tỷ lệ này hoàn toàn tương ứng với các công bố của các tài liệu trước đó trên thế giới. Như vậy có thể nói, chúng tôi đã thành công trong việc xây dựng các kỹ thuật di truyền để phát hiện khuếch đại gen MYCN trên các bệnh nhân u NBTK tại bệnh viện Nhi Trung Ương.

Đối với kỹ thuật FISH, đã có 82 mẫu bệnh phẩm u được áp dụng kỹ thuật này để đánh giá sự khuếch đại MYCN. Trong đó, có 18 mẫu được phát hiện có khuếch đại gen MYCN (Hình 1a,b) trên tất cả các tế bào u được phân tích. 64 mẫu không có khuếch đại MYCN.

07 mẫu tủy xương của bệnh nhân u NBTK có di căn tủy trên 10% được làm FISH để đánh giá khuếch đại MYCN. Trong đó 03 mẫu được phát

hiện có sự khuếch đại MYCN ở 20% cụm tế bào tủy được phân tích. 04 mẫu còn lại không phát hiện thấy sự khuếch đại.

Rõ ràng số lượng tế bào u trong dịch tủy xương là rất hạn chế. Vì vậy, để khẳng định tính chính xác của các kết quả FISH trên dịch tủy xương của các bệnh nhân u NBTK có di căn trên 10%, chúng tôi tiến hành song song kỹ thuật FISH trên cả 2 mẫu bệnh phẩm ở 3 bệnh nhân. Các bệnh nhân này được tiến hành chọc hút dịch tủy xương trước, và sau đó được phẫu thuật để sinh thiết khối u. Cả hai mẫu bệnh phẩm này được thu thập, xử lý và làm xét nghiệm ngay sau khi thu thập. Kết quả thu được trên cả hai mẫu bệnh phẩm này là hoàn toàn giống nhau, có 01 bệnh nhân phát hiện khuếch đại và 02 bệnh nhân không có khuếch đại gen MYCN.

Về mặt kỹ thuật FISH, tín hiệu huỳnh quang sau khi lai đầu dò được phân tích trên kính hiển vi huỳnh quang với chất lượng rõ ràng, không có tín hiệu nhiễu. Điều này khẳng định quy trình kỹ thuật FISH đã được áp dụng là ổn định và phù hợp trong điều kiện của chúng tôi.

Đối với kỹ thuật PCR, đã có 11 trường hợp u NBTK được ứng dụng kỹ thuật này để đánh giá sự khuếch đại MYCN ở mức độ phân tử. Các khối u sau khi thu thập được tách chiết để thu được DNA tổng số, nhân đoạn gen MYCN bằng cặp mồi thiết kế đặc hiệu cho vùng gen này. Kết quả có 2 trường hợp

được phát hiện có khuếch đại MYCN, so với mẫu chứng chuẩn được xác định có khuếch đại MYCN ở mức độ 20 bản sao do trung tâm nghiên cứu ung thư nhi tại MCRI Melbourne cung cấp. Mỗi mẫu bệnh phẩm thường được chạy hai phản ứng song song ở cùng một điều kiện, để có thể so sánh chính xác hơn về mức độ khuếch đại so với mẫu kiểm chứng.

Cũng tương tự việc so sánh kết quả trên 2 mẫu bệnh phẩm khác nhau, chúng tôi cũng tiến hành cùng lúc kỹ thuật FISH và PCR trên 2 bệnh nhân khác nhau. Kết quả của việc đánh giá khuếch đại gen MYCN là giống nhau đối với cả 2 kỹ thuật.

Qua quá trình sử dụng hai kỹ thuật FISH và PCR để đánh giá sự khuếch đại MYCN trên các bệnh nhân u NBTK chúng tôi nhận thấy kỹ thuật FISH có nhiều ưu điểm hơn so với kỹ thuật PCR. Thứ nhất là kỹ thuật FISH có thể áp dụng với nhiều loại mẫu bệnh phẩm khác nhau (mảnh u ngay sau cuộc sinh thiết, đã bảo quản hay đã cố định trong khối nền; và dịch tủy xương có tế bào di căn); trong khi kỹ thuật PCR tại thời điểm này mới chỉ áp dụng cho mảnh u thu thập ngay sau cuộc sinh thiết. Thứ hai là việc thực hiện kỹ thuật FISH nhanh và tốn ít thời gian hơn so với kỹ thuật PCR. Thứ ba, việc phân tích kết quả khuếch đại gen MYCN bằng kỹ thuật FISH (bằng cách quan sát trực tiếp tín hiệu của gen MYCN trong từng tế bào) cũng trực quan và rõ ràng hơn so với kỹ thuật PCR (so sánh một cách tương đối với các mẫu đối chứng). Chính vì thế, sau một thời gian ngắn thực hiện song song hai kỹ thuật này, chúng tôi đã quyết định sử dụng kỹ thuật FISH như là kỹ thuật đầu tiên cho việc phát hiện khuếch đại gen MYCN trên các bệnh nhân u NBTK. Kỹ thuật PCR sẽ là một công cụ dự phòng khi cần thiết.

5. KẾT LUẬN

Đánh giá sự khuếch đại gen MYCN bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ FISH và PCR đã được thực hiện thành công tại khoa Di truyền và SHPT bệnh viện Nhi TW. Trong tương lai, bên cạnh việc tiếp tục duy trì kỹ thuật FISH (và PCR) trong chẩn đoán khuếch đại gen MYCN, chúng tôi sẽ triển khai việc đánh giá các biến đổi di truyền khác, có nhiều ý nghĩa trên các bệnh nhân u NBTK, hỗ trợ cho các bác sỹ lâm sàng trong việc phân nhóm bệnh nhân và lựa chọn phác đồ điều trị thích hợp nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **John M. Maris**, *Recent Advances in Neuroblastoma*, The new England Journal of Medicine 2010;362:2202-11
2. **N Bown**, *Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects*, J Clin Pathol 2001; 54: 897–910
3. **Garrett M. Brodeur**, *Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma*, Nature Reviews/Cancer, Vol 3, March 2003
4. **Schell M and Bergeron C.**, *Neuroblastoma*, Orphanet Encyclopedia. October 2003
5. **Isabelle Janoueix-Lerosey et al**, *Overall Genomic Pattern Is a Predictor of Outcome in Neuroblastoma*, J Clin Oncol 27:1026-1033
6. **Nai-Kong V. Cheung**, *Neuroblastoma*, Springer 2005
7. **Prasad Mathew et al**, *Detection of MYCN Amplification in Neuroblastoma by Fluorescent In Situ Hybridization: A Pediatric Oncology Group Study*, Neoplasia Vol 3, No 2, 2001, pp.105 – 109.

ABSTRACT

Neuroblastoma is a malignant tumour which is common cancer diagnosed in children. The incidence is 10.2 cases per million children under 15 years of age. Some genetic changes in neuroblastoma have the important significances for the therapy and the prognosis of patient, in which the amplification of MYCN gene is the most important. Aim: Detection of the amplification of MYCN gene in the neuroblastoma by Fluorescence insitu Hybridization (FISH) and Polymerase Chain Reaction (PCR). Methods: The tumour's biopsy or the metastasis bone marrow is taken from the neuroblastoma tumour is used for the FISH and PCR technique. Result: In 100 samples (from 2010 to 2012), there are 18 sample of tumour and 03 sample of bone marrow show the MYCN amplified by FISH; 01 samples of tumour is detected the amplification of MYCN by PCR. Conclusion: The amplification of MYCN gene is detected successfully by FISH and PCR technique in Genetics lab, National Hospital of Pediatrics. This have a great significance to help the clinical doctor in grouping the patients and choosing the adequate therapy.