

Xây dựng quy trình phân tích đa hình vùng promoter của gen *UGT1A1* ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng

Phạm Thị Hồng Nhung^{1,*}, Trần Quốc Hùng², Nguyễn Văn Hồng²,
Bùi Sơn Nhật¹, Nguyễn Huy Hoàng¹, Đinh Đoàn Long¹

¹Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Bệnh viện 198, 9 Trần Bình, Mai Dịch, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Đa hình di truyền vùng promoter (TA)_nTAA của uridine diphosphate glucuronyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) liên quan đến đáp ứng của nhiều thuốc và bệnh lý. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích đa hình di truyền vùng promoter *UGT1A1* trên nhóm bệnh nhân ung thư đại trực tràng người Việt Nam. Phương pháp nghiên cứu chính được sử dụng bao gồm tách DNA tổng số từ mẫu máu và mẫu mô ung thư cố định trong formalin và đúc trong paraffin, khuếch đại gen bằng PCR, xác định kiểu gen bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Kết quả nghiên cứu cho thấy chúng tôi đã xây dựng được quy trình xác định đa hình di truyền vùng promoter của gen *UGT1A1*. Tổng số có 38 bệnh nhân được xác định kiểu gen *UGT1A1*: 21% có kiểu gen (TA)₅/(TA)₆, 63.2% có kiểu gen kiểu đại (TA)₆/(TA)₆ và 15.8% có kiểu gen (TA)₆/(TA)₇. Trong lâm sàng, kết quả của phân tích này sẽ giúp bác sĩ dự đoán được đáp ứng của bệnh nhân ung thư được điều trị với các thuốc là cơ chất của *UGT1A1* như irinotecan.

Nhận ngày 17 tháng 03 năm 2016, Chỉnh sửa ngày 10 tháng 4 năm 2016, Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 6 năm 2016
Từ khóa: *UGT1A1*, đa hình di truyền vùng promoter, irinotecan, ung thư đại trực tràng.

1. Đặt vấn đề

Gen *UGT1A1* là gen mã hóa cho polypeptide A1 của protein uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1. Enzyme này có mặt ở gan, có vai trò xúc tác cho phản ứng gắn glucuronic acid vào các cơ chất khác nhau. Nhiều thuốc đã được xác định là cơ chất của *UGT1A1* như irinotecan (điều trị ung thư), raloxifene (điều trị loãng xương), raltegravir (ức chế virus, sử dụng trong điều trị HIV)... Một số thuốc khác đã được xác định là chất ức chế hoạt động của enzyme *UGT1A1* như indinavir (kháng retrovirus, sử dụng trong điều

trị HIV), atazanavir (điều trị HIV), sorafenib (điều trị ung thư gan và thận)... [1, 2]. Đa hình trình tự lặp lại (TA) trong vùng (TA)_nTAA của promoter ảnh hưởng đến sự biểu hiện của enzyme *UGT1A1*. Ở allen kiểu đại, vùng promoter có (TA)₆ trong khi allen dạng đột biến số đơn vị lặp lại có thể là 5, 7 hoặc 8 [2].

Trong khi ý nghĩa lâm sàng của các dạng đột biến với 5 hoặc 8 lần lặp lại trình tự (TA) chưa được làm rõ thì dạng đột biến với 7 đơn vị lặp lại (được xác định là allen *UGT1A1**28) đã được chứng minh liên quan đến điều trị và chẩn đoán bệnh. Người mang 1 allen *UGT1A1**28 có hoạt tính enzyme *UGT1A1* giảm 25% và giảm đến 70% ở người có kiểu gen đồng hợp *UGT1A1**28 [3]. Năm 2005, Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (Food and Drug

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-904833155
Email: nhungpham_smp@vnu.edu.vn

Administration, viết tắt là FDA) đã đưa ra khuyến cáo nên xét nghiệm đa hình *UGT1A1**28 khi điều trị với irinotecan [3, 4]. Trong điều trị ung thư đặc biệt là ung thư đại trực tràng, irinotecan kết hợp với oxaliplatin và các thuốc khác đang dần được sử dụng như lựa chọn đầu tiên khi muốn ngăn chặn sự tăng trưởng của những tế bào ung thư bằng cách ức chế hoạt động của enzyme topoisomerase [3]. Tuy nhiên, hóa trị liệu với irinotecan gây nhiều tác dụng phụ không mong muốn có thể dẫn đến tử vong như tiêu chảy nặng, suy tủy, dễ chảy máu... do tích tụ sản phẩm chuyển hóa của irinotecan là SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin). Dưới sự xúc tác của enzyme *UGT1A1*, SN-38 biến đổi không còn hoạt tính gây độc và có khả năng đào thải qua đường mật, do đó những bệnh nhân mang allele *UGT1A1**28 có nguy cơ xuất hiện các tác dụng phụ ở mức độ nặng khi điều trị irinotecan. Chính vì vậy, việc xác định được đa hình *UGT1A1**28 ở vùng promoter sẽ giúp đưa ra định hướng điều trị phù hợp và hạn chế tác dụng phụ của thuốc đối với bệnh nhân ung thư. Ngoài ra, *UGT1A1**28 đã được ghi nhận là dấu hiệu của hội chứng Gilbert. Việc xét nghiệm sự có mặt của *UGT1A1**28 sẽ cung cấp bằng chứng di truyền trong quá trình chẩn đoán bệnh nhân mắc hội chứng Gilbert [5][6]. Hiện nay ở Việt Nam chưa có công bố nào về tần số các allele của *UGT1A1* cũng như quy trình phân tích gen này. Từ nhu cầu lâm sàng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này để thiết lập quy trình xác định được các dạng đa hình promoter trên *UGT1A1*.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Thu thập và bảo quản mẫu sinh phẩm:

38 mẫu mô ung thư đại trực tràng thu được sau phẫu thuật tại Bệnh viện 198 được cố định trong formalin và đúc trong paraffin, có thể bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong thời gian dài. 8/38 bệnh nhân trên cung cấp thêm mẫu máu (1ml) bảo quản trong EDTA lưu ở -20°C đến khi sử dụng.

Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách từ mẫu mô đúc trong paraffin sử dụng kit ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega) theo quy trình khuyến cáo của hãng. Với mẫu máu, chúng tôi sử dụng E.Z.N.A blood DNA Mini kit (Omega-Biotek) theo quy trình khuyến cáo của hãng

Thiết kế môi đặc hiệu nhân vùng promoter của *UGT1A1*: Cặp môi được thiết kế và đánh giá các thông số với phần mềm PerlPrimer version 1.1.14. Cặp môi tự thiết kế được đặt tổng hợp tại hãng IDT (Mỹ) với trình tự môi xuôi: 5' GCTCCACCTTCTTTATCTCTG 3' và môi ngược: 5' ATC AAC AGT ATC TTC CCA GCA 3 nhân dòng đoạn gen dài 266 bp.

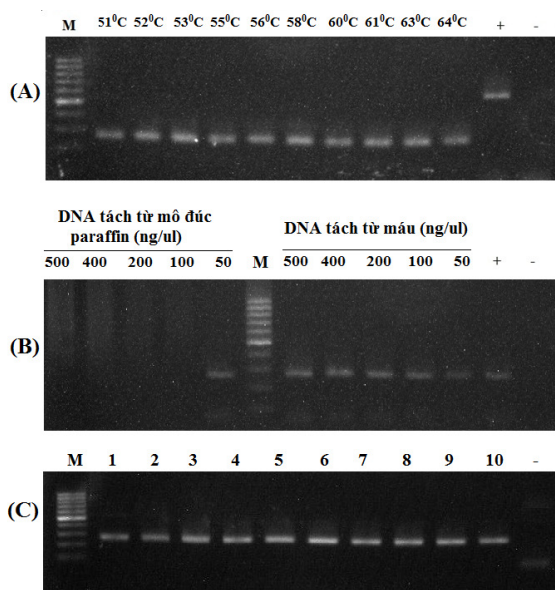
Nhân dòng vùng promoter của *UGT1A1* bằng PCR: Để có quy trình nhân dòng đặc hiệu và ổn định, chúng tôi xác định nhiệt độ gắn môi, nồng độ hoạt động tối ưu của các thành phần trong phản ứng PCR sử dụng Q5® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1.5%, dùng thang chuẩn Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (SM0321, Thermo Scientific).

Xác định kiểu gen *UGT1A128 bằng phương pháp giải trình tự:** 20 µl sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit (Omega-biotek) và giải trình tự sử dụng máy phân tích phân đoạn DNA tự động 3500 (Applied Biosystems) và kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems). Kết quả giải trình tự được mở bằng phần mềm BioEdit version 7.1.9, qua đó xác định kiểu gen của bệnh nhân. Tần số các allele sẽ được tính toán và so sánh với tần số lý thuyết theo định luật Hardy-Weinberg sử dụng chi-square test.

3. Kết quả nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số: 38 mẫu mô đúc trong paraffin đều tách được DNA tổng số nhờ sử dụng kit ReliaPrep™ FFPE gDNA. Nồng độ DNA dao động từ 20 - 500 ng/µl phụ thuộc vào loại tế bào và lượng mẫu đúc trong paraffin. Mẫu có độ tinh sạch cao, 34/38 (89%) mẫu có chỉ số A260/280 trong khoảng 1.7-2.0.

Nhân dòng vùng promoter của UGT1A1 bằng PCR: Như kết quả điện di trình bày ở hình 1, nồng độ tối ưu của các thành phần trong phản ứng PCR là: 0.2 mM dNTP Mix, 0,02 u/μl Q5 High-Fidelity DNA polymerase, 0.5 μM mỗi môi, 50 ng/μl DNA tách từ mô đúc trong paraffin. Trong quá trình nhân dòng 38 mẫu, chúng tôi thấy rằng nồng độ DNA sử dụng cho phản ứng PCR có thể dao động từ 20-60 ng/μl. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gồm 3 giai đoạn: biến tính ban đầu 98°C trong 3 phút; 35 chu kì: 98°C trong 10 giây, gắn môi ở 58°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây; thời gian kéo dài cuối 72°C trong 2 phút. Chúng tôi cũng kiểm chứng quy trình nhân dòng trên mẫu DNA tách từ máu của bệnh nhân, kết quả cho thấy quy trình có thể tiến hành với DNA tách từ máu có ở nồng độ hoạt động từ 50-500 ng/μl.



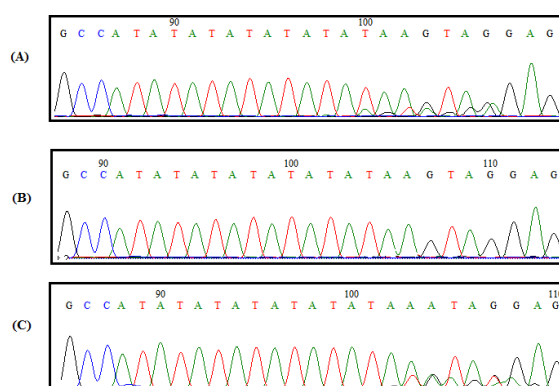
Hình 1. Ảnh điện di trên gel agarose 1.5% của thí nghiệm tối ưu PCR nhân vùng promoter của UGT1A1. A: tối ưu nhiệt độ gắn môi. B: tối ưu nồng độ DNA. C: sử dụng quy trình tối ưu chạy với 10 mẫu bệnh nhân.

Xác định kiểu gen UGT1A1*28 bằng phương pháp giải trình tự: Dựa vào kết quả giải trình tự, chúng tôi xác định được các kiểu gen có số đơn vị (TA) lặp lại ở vùng promoter khác nhau (Hình 2). 32 bệnh nhân chia thành 3

nhóm kiểu gen là (TA)₅/(TA)₆, (TA)₆/(TA)₆ và (TA)₆/(TA)₇. Số lượng mỗi nhóm kiểu gen được trình bày ở bảng 1. Ở 8 bệnh nhân cung cấp cả mẫu mô ung thư và mẫu máu, kết quả giải trình tự sản phẩm PCR thu được từ 2 loại mẫu này tương đồng 100%.

Bảng 1. Đa hình vùng promoter của UGT1A1 ở 38 bệnh nhân nghiên cứu

Kiểu gen UGT1A1	Số bệnh nhân	Tỷ lệ bệnh nhân (%)
(TA) ₅ /(TA) ₆	8	21.0%
(TA) ₆ /(TA) ₆	24	63.2%
(TA) ₆ /(TA) ₇	6	15.8%



Hình 2. Kết quả giải trình tự cho các kiểu gen vùng promoter của UGT1A1. A: kiểu gen (TA)₅/(TA)₆. B: kiểu gen (TA)₆/(TA)₆. C: kiểu gen (TA)₆/(TA)₇.

Tần số của allen mang (TA)₅, (TA)₆ và (TA)₇ lần lượt là 0.10, 0.82 và 0.08. Kiểm định với chi-square test, ta có $\chi^2 = 1.93$ (bậc tự do df=3) và P-value=0.58. Như vậy, tần số các allen thu được trong nghiên cứu này phù hợp theo định luật Hardy-Weinberg. Điều đó cũng cho thấy cấu trúc di truyền của các allen này ở người Việt Nam có thể đã trở nên ổn định (ít nhất trong quần thể 38 cá thể chúng tôi phân tích có tính đại diện).

4. Thảo luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy chúng tôi xác định được kiểu gen UGT1A1 từ cả mẫu máu và

mẫu mô đúc trong paraffin với kết quả tương đồng nhau. Điều này là do allele *UGT1A1* không xuất hiện đặc hiệu ở khối u mà phân bố đồng nhất ở các mô, vì vậy có thể lựa chọn nhiều loại mô để lấy mẫu phân tích cho gen này. Trong quá trình PCR, lượng lớn DNA thu từ mẫu mô đúc trong paraffin lớn hơn 60 ng/ μ l sẽ bắt đầu ức chế phản ứng tổng hợp DNA. Cho đến nay, hiện tượng DNA tách từ mô đúc trong paraffin ức chế phản ứng PCR đã được nhiều nghiên cứu báo cáo nhưng chưa được làm rõ nguyên nhân [7]. Nhiều yếu tố trong mẫu DNA có khả năng tác động đến phản ứng PCR. Sự phân mảnh và đứt gãy DNA thu từ mô đúc trong paraffin không chỉ ảnh hưởng đến chất lượng trình tự làm khuôn cho phản ứng PCR mà còn tạo ra những phân đoạn DNA ngắn ngẫu nhiên có thể hoạt động như chất ức chế DNA polymerase.

Với tập hợp mẫu nhỏ (n= 38) nhưng kiểm định chi-square cho thấy tần số của các allele trên phân bố theo định luật Hardy-Weinberg, nhóm mẫu nghiên cứu có tính đại diện cho quần thể bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Tổng quan các nghiên cứu trên thế giới cho thấy tần số xuất hiện của allele mang (TA)₇ (hay *UGT1A1**28) dao động nhiều ở các quần thể khác nhau: 26% đến 31% ở quần thể người da trắng, 42% đến 56% ở quần thể người Châu Phi và 9% đến 16% ở các quần thể người Châu Á [8], [9]. Tần số thu được trong nghiên cứu khá gần với tần số được báo cáo ở một số nước ở khu vực châu Á. Tuy allele *UGT1A1**28 có tần số không cao nhưng FDA đã khuyến cáo nên tiến hành phân tích sự có mặt của allele này với bệnh nhân ung thư điều trị với irinotecan. Những bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp *UGT1A1**28 cần cân nhắc giảm liều cho lần điều trị đầu tiên với irinotecan, tránh việc tác dụng phụ gia tăng khi dùng thuốc. Ngoài ứng dụng tiên lượng liều dùng thuốc phù hợp với bệnh nhân, xét nghiệm này còn là công cụ hữu ích trong quá trình chẩn đoán bệnh nhân mắc hội chứng Gilbert [6].

5. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng được quy trình xác định đa hình vùng promoter của *UGT1A1*, áp dụng thành công quy trình này phân tích gen trên nhóm bệnh nhân ung thư đại trực tràng người Việt Nam.

Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Khoa Y Dược - Đại học Quốc gia Hà Nội cho đề tài mã số CS.15.09 để thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Anderson P.L., Lamba J., Aquilante C.L., and Schuetz E., "Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV - infected adults: A pilot study", *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 42 (2006) 441.
- [2] Sara C.M. and Ogechi N.I., "The clinical application of *UGT1A1* pharmacogenetic testing: Gene-environment interactions", *Human genomics.*, 4 (2010) 238.
- [3] <http://www.drugs.com/pro/irinotecan.html#t>
- [4] Perera M.A., Innocenti F., and Ratain M.J., "Pharmacogenetic testing for uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 polymorphisms: Are we there yet?", *Pharmacotherapy*, 28 (2008) 755.
- [5] Bosma P.J., Chowdhury J.R., Bakker C., Gantla S., Boer A., and Oostra B.A., "The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome", *N Engl J Med.*, 333 (1995), 1171-1175.
- [6] Strassburg C.P., "Pharmacogenetics of Gilbert's syndrome", *Pharmacogenomics*, 9 (2008) 703.
- [7] Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, Meller S, et al. "Improved PCR Performance Using Template DNA from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues by Overcoming PCR Inhibition. PLoS

- ONE 8(2013): e77771.
doi:10.1371/journal.pone.0077771
- [8] Hall D., Ybazeta G., Destro-Bisol G., Petzl-Erler M.L, and Di Rienzo A, "Variability at the uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 promoter in human populations and primates", *Pharmacogenetics*, 9 (1999) 591.
- [9] Iyer L., Hall D., Das S., Mortell M.A., Ramirez J., and Kim S., "Phenotypegenotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism", *Clin Pharmacol Ther*, 65 (1999) 576.

Genotyping Polymorphisms in Promoter Region of *UGT1A1* Gene in Colorectal Cancer Patients

Pham Thi Hong Nhung¹, Tran Quoc Hung², Nguyen Van Hong²,
Bui Son Nhat¹, Nguyen Huy Hoang¹, Dinh Doan Long¹

¹*VNU School of Medicine and Pharmacy - Vietnam National University,
144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

²*Hospital 198, 9 Tran Binh, Mai Dich, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

Abstract: Genetic polymorphisms in (TA)_nTAA promoter region of the enzyme uridine diphosphate glucuronyltransferase 1A1 (UGT1A1) have been reportedly associated with variation in drug response of patients suffering from different diseases. Therefore, we established and performed a genotyping protocol for rapid detection of *UGT1A1* promoter polymorphism in a group of Vietnamese colorectal cancer patients. The established genotyping protocol consists of DNA extraction from blood and formalin-fixed paraffin-embedded tissues, polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. These protocol was optimized to work well for both types of samples either derived from blood or formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Out of totally 38 patients genotyped for *UGT1A1* promoter polymorphism, 8 (21%) were found to be (TA)₅/(TA)₆, 24 (TA)₆/(TA)₆ (63.2%) and 6 (TA)₆/(TA)₇ (15.8%). The study revealed the genotyping method could be used in assisting prediction of drug response in colorectal cancer patients treated with agents metabolized by UGT1A1, such as irinotecan. Further study is ongoing to validate the association between the genetic polymorphism with clinically drug response in Vietnamese patients.

Keywords: UGT1A1, promoter polymorphisms, irinotecan, colorectal cancer.