

Xây dựng quy trình phân tích đột biến các exon 19, 20, 21 thuộc gen EGFR của bệnh nhân ung thư phổi ở Việt Nam

Đậu Thế Huy¹, Phạm Thị Hồng Nhung^{1,*}, Trần Vũ Quỳnh Giao¹,
Nguyễn Văn Hồng², Vũ Thị Thơm¹, Đinh Đoàn Long¹

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

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

Tóm tắt

Đa hình di truyền trên gen EGFR đã được biết đến có ảnh hưởng đáng kể đến đáp ứng thuốc điều trị ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Phân tích gen nhằm xác định các đột biến này có ý nghĩa trong thực tiễn điều trị nên đang được các bệnh viện Việt Nam tiếp cận và triển khai. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình phân tích đa hình di truyền các đột biến gen EGFR liên quan đến điều trị đích ở bệnh nhân ung thư phổi người Việt Nam. Phương pháp nghiên cứu chính được sử dụng bao gồm tách DNA từ mẫu mô sinh thiết bảo quản trong paraffin, khuếch đại ADN bằng PCR, xác định kiểu gen của bệnh nhân bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Kết quả nghiên cứu cho thấy chúng tôi đã hoàn thiện quy trình phân tích đột biến E746_A750del ở exon 19, T790M (c.2369C>T) ở exon 20, L861Q (c.2582T>A) và L858R (c.2573T>G) ở exon 21 trên gen EGFR. Đây là những đột biến đã được xác nhận có mối quan hệ đến đáp ứng thuốc trong điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ. Bước đầu phân tích thành công trên 7 mẫu bệnh nhân ung thư phổi, chúng tôi xác định 2 bệnh nhân mang đột biến L858R (c.2573T>G) làm tăng tính nhạy cảm với thuốc điều trị ung thư tác động qua thụ thể EGFR.

Nhận ngày 05 tháng 04 năm 2016, Chính sửa ngày 18 tháng 4 năm 2016, Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 6 năm 2016
Từ khóa: Ung thư phổi không tế bào nhỏ, đột biến gen EGFR.

1. Đặt vấn đề

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) là một thụ thể tyrosine kinase xuyên màng có vai trò quan trọng trong sự phát triển và di căn của các tế bào ung thư. Thông qua các trục tín hiệu RAS/RAF và PI3K/AKT, sự hoạt hóa bình thường của EGFR sẽ chi phối sự tăng sinh và tăng trưởng bình thường của tế bào [1]. Khi các trục tín hiệu này bị kích hoạt bất thường và liên tục do đột biến gen EGFR tế bào sẽ chuyển dạng ác tính [2-4].

Đột biến gen EGFR liên quan đến tính đáp ứng với thuốc điều trị đích của gen EGFR được

chia làm 2 nhóm [5]. Nhóm một là nhóm đột biến làm tăng tính nhạy cảm của tế bào ung thư với thuốc điều trị đích, 85-90% là các đột biến mất nucleotide ở exon 19 (E746_A750del) và đột biến điểm L861Q (c.2582T>A), L858R (c.2573T>G) tại exon 21. Nhóm thứ hai là nhóm đột biến gây kháng thuốc điều trị đích, chủ yếu là các đột biến chèn đoạn và đột biến điểm T790M (c.2369C>T) tại exon 20. Trong bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, đột biến gen EGFR có tần suất cao ở các nước Đông Á, bệnh nhân nữ và nhóm không hút thuốc lá hơn là các phân nhóm còn lại [6-7].

Hiện nay chưa có nghiên cứu nào ở Việt Nam phân tích các đột biến ở exon 19, exon 20 và exon 21 của gen EGFR nhằm đưa ra các lộ

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

trình điều trị thuốc hướng đích tại các bệnh viện. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm xây dựng quy trình phân tích bốn đa hình di truyền có vai trò quan trọng trong đáp ứng thuốc điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ là E746_A750del (exon 19), T790M (c.2369C>T ở exon 20) và E746_A750del (exon 21) ở bệnh nhân ung thư phổi.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Thu thập và bảo quản mẫu sinh phẩm: 7 mẫu mô sinh khiết kim ung thư phổi không tế bào nhỏ thu tại bệnh viện 198. Mẫu sinh khiết được cố định trong formalin và đúc trong paraffin, có thể bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

Tách chiết DNA tổng số: Vùng tế bào ung thư được đánh dấu trên tiêu bản, chúng tôi dựa vào đó để định vị và thu vùng tế bào ung thư phục vụ cho tách DNA. 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.

Thiết kế mỗi đặc hiệu nhân vùng promoter của exon 19, 20, 21 gen EGFR: Cặp mỗi được thiết kế và đánh giá các thông số với phần mềm PerlPrimer version 1.1.14. Sau đó đặt tổng hợp tại hãng IDT (Mỹ) với trình tự được trình bày trong bảng 1.

Nhân dòng vùng promoter của exon 19, 20, 21 thuộc gen EGFR bằng PCR: Để có quy trình nhân dòng đặc hiệu và ổn định, chúng tôi xác định nhiệt độ gắn mỗi, 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 exon 19, 20, 21 gen EGFR 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 phân tích bằng phần mềm BioEdit version 7.1.9, qua đó xác định kiểu gen của bệnh nhân.

Bảng 1. Trình tự mỗi nhân dòng exon EGFR

Exon	Trình tự mỗi	Độ dài sản phẩm
19	ATCGCTGGTAACATCCACCC AGGTTTCAGAGCCATGGACCC	232 bp
20	CCATGCGAAGCCACACTGAC CCTTCCCTGATTACCTTTGCGA	239 bp
21	GAGCTTCTTCCCATGATGATCTG CTGACCTAAAGCCACCTCT	230 bp

3. Kết quả nghiên cứu

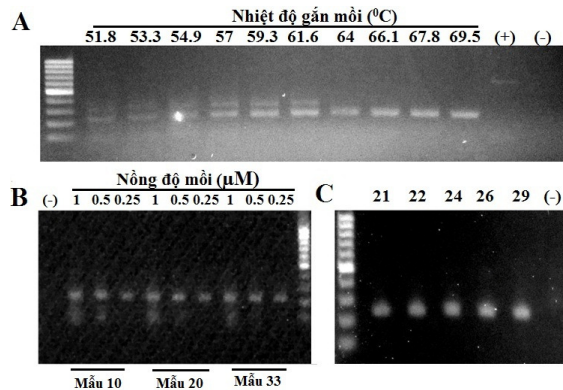
Tách chiết DNA tổng số: 7 mẫu mô đúc trong paraffin đều tách được DNA tổng số nhờ sử dụng kit ReliaPrep™ FFPE gDNA (Promega). Nồng độ DNA thu hồi sau tách chiết dao động từ 50 - 150 ng/µl phụ thuộc vào loại tế bào và lượng mẫu đúc trong paraffin. Mẫu có độ tinh sạch cao với chỉ số A260/280 dao động trong khoảng 1.7-2.0, chứng tỏ ADN được tách chiết đạt yêu cầu cho phản ứng khuếch đại ADN bằng PCR.

Nhân dòng và xác định đột biến trên các exon 19, 20, 21 thuộc gen EGFR: Như kết quả điện di trình bày ở hình 1-3, 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, 50 ng/µl DNA tách từ mô đúc trong paraffin. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gồm 3 giai đoạn: biến tính ban đầu 98°C trong 3 phút; 35 chu kỳ: 98°C trong 10 giây, gắn mỗi trong 30 giây, 72°C trong 30 giây; thời gian kéo dài cuối 72°C trong 2 phút.

Với quy trình nhân dòng exon 20, nồng độ mỗi tối ưu là 0.5 µM mỗi mỗi và nhiệt độ gắn mỗi tối ưu từ 60°C đến 68°C. Với quy trình nhân dòng exon 21, nồng độ mỗi tối ưu là 0.25 µM mỗi mỗi và nhiệt độ gắn mỗi tối ưu từ 62°C đến 68°C.

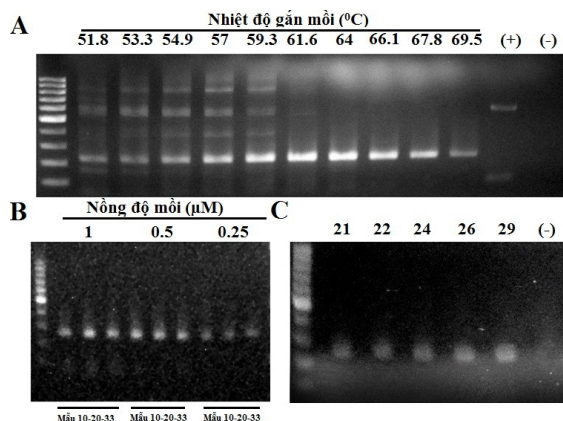
Giải trình tự xác định đột biến trên các exon 19, 20, 21 thuộc gen EGFR: Dựa vào kết quả giải trình tự mẫu PCR đã tinh sạch, 7 bệnh nhân đều không có đột biến mất đoạn

E746_A750del, T790M (c.2369C>T) và L861Q (c.2582T>A). 2/7 bệnh nhân có đột biến L858R (c.2573T>G). Kết quả của kiểu gen không xuất hiện đột biến E746_A750del được trình bày ở hình 4A. Kết quả của kiểu gen không xuất hiện đột biến T790M được trình bày ở hình 4B. Kết quả của kiểu gen bình thường trên exon 21 được trình bày ở hình 4C và kiểu gen xuất hiện đột biến L858R (c.2573T>G) ở hình 4D.

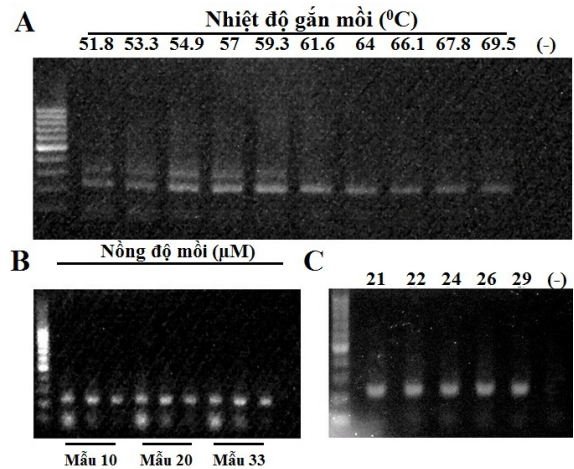


Hình 1. Ảnh điện di trên gel agarose 1.5% của thí nghiệm tối ưu PCR nhân vùng mang đột biến E746_A750del trên exon 19. A: tối ưu nhiệt độ gắn môi. B: tối ưu nồng độ DNA. C: sử dụng quy trình tối ưu chạy với 5 mẫu bệnh nhân bất kì.

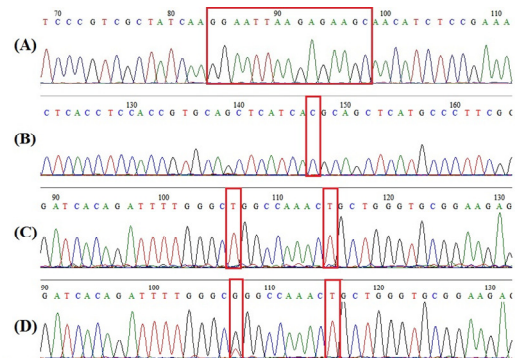
Với quy trình nhân dòng exon 19, nồng độ môi tối ưu là 0.25 μM mỗi môi và nhiệt độ gắn môi tối ưu từ 66°C đến 69°C.



Hình 2. Hình điện di trên gel agarose 1.5% của thí nghiệm tối ưu PCR nhân vùng mang đột biến T790M trên exon 20. A: tối ưu nhiệt độ gắn môi. B: tối ưu nồng độ DNA. C: sử dụng quy trình tối ưu chạy với 5 mẫu bệnh nhân bất kì.



Hình 3. Hình điện di trên gel agarose 1.5% của thí nghiệm tối ưu PCR nhân vùng mang đột biến L861Q và L858R trên exon 20. A: tối ưu nhiệt độ gắn môi. B: tối ưu nồng độ DNA. C: sử dụng quy trình tối ưu chạy với 5 mẫu bệnh nhân bất kì.



Hình 4. Kết quả giải trình tự cho các vùng chứa đột biến trên exon 19, 20, 21 của gen EGFR. A: phân đoạn chứa E746_A750del, phần đóng khung là vùng bị mất khi xảy ra đột biến. B: phân đoạn chứa T790M (c.2369C>T), phần đóng khung là vị trí xảy ra đột biến. C và D: phân đoạn chứa L861Q (c.2582T>A) và L858R (c.2573T>G), phần đóng khung là vùng bị mất khi xảy ra đột biến.

4. Thảo luận

Lượng DNA thu được từ mẫu sinh kịet đúc trong paraffin của bệnh nhân ung thư phổi thường đạt được rất thấp (<150 ng/μl) do lượng tế bào thu được khi lấy sinh kịet bằng chọc kim hút không nhiều và chúng tôi chỉ sử dụng vùng tế bào ung thư. Tuy nhiên, mẫu sinh kịet đúc trong paraffin là loại mẫu phổ biến được

lưu giữ trong phân tích tế bào phục vụ chẩn đoán và điều trị ung thư.

Chúng tôi chọn được 1 quy trình nhiệt chung cho PCR khuếch đại gen cả 3 exon EGFR là: biến tính ban đầu 98°C trong 3 phút; 35 chu kỳ: 98°C trong 10 giây, gắn mồi ở 68°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây; thời gian kéo dài cuối 72°C trong 2 phút. Q5 polymerase là enzym thế hệ mới có độ chính xác trong quá trình tổng hợp gen cao nhất hiện nay (hơn 100 lần so với Taq polymerase) và thời gian tổng hợp gen nhanh hơn 1 giờ so với quy trình nhiệt cổ điển [8]. Chúng tôi lựa chọn enzym này nhằm tăng độ chuẩn xác và giảm thời gian thao tác, tăng khả năng ứng dụng của phân tích này tại các bệnh viện.

Phương pháp giải trình tự hiện nay vẫn là “tiêu chuẩn vàng” để khảo sát các đột biến trên gen EGFR, với độ chính xác và tin cậy cao. Trong nghiên cứu của mình, vùng gen chứa đột biến EGFR liên quan đến đáp ứng thuốc trong điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ được khuếch đại và đọc trình tự. Kết quả giải trình tự thu được rõ ràng, không bị nhiễu cho thấy mẫu DNA đảm bảo độ tinh sạch khi giải trình tự. Với giải trình tự, ngoài 4 đột biến đích ban đầu, chúng tôi cũng xác định được thêm nhiều đột biến khác như rs758904586 và rs758904586 trên exon 19, rs397517121 và rs1050171 trên exon 20, rs150749913 và rs397517126 trên exon 21. Sử dụng quy trình này phân tích trên số lượng mẫu lớn, chúng ta có thể có cái nhìn tổng quan về các đột biến trên gen EGFR, khả năng liên kết di truyền giữa các đột biến cũng như đánh giá mối liên hệ giữa các đột biến và khả năng đáp ứng với thuốc tác động lên đích là EGFR. Mối liên hệ giữa một số đột biến EGFR nhất định trong ung thư phổi và tỷ lệ đáp ứng cao với các thuốc ức chế tyrosine kinase đã có những minh chứng rõ ràng. Năm 2013, FDA đã khuyến cáo việc sử dụng cả erlotinib (Tarceva) và afatinib (Gilotrif) trong điều trị cho bệnh nhân ung thư phổi di căn không tế bào nhỏ có khối u mang đột biến EGFR mất đoạn ở exon 19 hoặc L858R ở exon 21. Phương pháp điều trị đích hứa hẹn là liệu pháp điều trị mới, hiệu quả cho bệnh nhân ung thư. Tuy nhiên, không phải tất cả các bệnh nhân đều có đáp ứng tốt với thuốc điều trị đích. Chính vì vậy, phân tích gen EGFR giúp các bác sĩ có căn cứ để đưa ra quyết

định điều trị cho bệnh nhân, nhất là bệnh nhân ung thư giai đoạn cuối.

5. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng được quy trình xác định các đột biến trên các exon 19, 20, 21 của gen EGFR liên quan đến đáp ứng ở các bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ bằng kỹ thuật PCR kết hợp với giải trình tự.

Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Đại học Quốc gia Hà Nội cho đề tài mã số CS.15.10 để thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Paez, J.G., et al., EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304(2004): 1497-500.
- [2] Pao, W., et al., EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(2004): 13306-11.
- [3] Rusch, V., et al., Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res*, 53(1993): 379-85.
- [4] Cappuzzo, F., et al., Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 97(2005): 643-55.
- [5] Gombos Z., et al., A comparative study of EGFR mutation screening methods in non - small cell carcinoma of lung. *Journal Citation Reports. Science Sdition*, 111(2010): 365 - 368.
- [6] Sharma, S.V., et al., Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 7(2007): 169-181.
- [7] Gombos, Z., et al., A comparative study of EGFR mutation screening methods in non-small cell carcinoma of lung. *Bratisl Lek Listy*, 111(2010): 365-8.
- [8] www.neb.ca/q5

A Suitable Protocol for Genotyping Exons 19, 20 and 21 of *EGFR* Gene Extracted from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues in Vietnamese Non-Small Cell Lung Cancer Patients

Dau The Huy¹, Pham Thi Hong Nhung¹, Tran Vu Quynh Giao¹,
Nguyen Van Hong², Vu Thi Thom¹, Dinh Doan Long¹

¹*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: Several genetic polymorphisms of *EGFR* gene have been reported to affect the drug response in treatment of non-small cell lung cancer patients. Identifying mutations in exons 19, 20 and 21 of the gene may assist prediction of the patient's drug response and estimation of appropriate dosing. In this study, we established a rapid protocol for determining c.2235_2249del in exon 19, T790M (c.2369C> T) in exon 20, L861Q (c.2582T> A) and L858R (c.2573T > G) in exon 21 of the *EGFR* gene based on a combined PCR and sequencing approach. The protocol includes DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues, gene amplification by PCR, patient's genotyping by sequencing with ABI 3500 system. Out of the first 7 non-small cell lung cancer patients genotyped by the established protocol, 2 were found with L858R mutation which increased sensitivity for targeted therapeutics with *EGFR* tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as erlotinib and gefitinib. Further studies should be performed to elucidate the importance of *EGFR* genotyping in helping to ensure a better outcome of therapeutics in Vietnamese Non-Small Cell Lung Cancer Patients based on their genetic profiles.

Keywords: Non-small cell lung cancer, *EGFR* mutations.