

Ứng dụng kỹ thuật lai so sánh hệ gen trong xác định biến đổi di truyền ở bệnh nhân u nguyên bào thần kinh không khuếch đại Gen *MYCN*

Vũ Đình Quang^{1,*}, Nguyễn Thị Hồng Vân², Phùng Tuyết Lan³, Nguyễn Xuân Huy¹, Ngô Diễm Ngọc¹, Bùi Ngọc Lan¹, Phạm Duy Hiền¹, Lê Đình Công¹, Hoàng Ngọc Thạch¹, Dương Hồng Quân⁴, Nguyễn Thanh Liêm⁴, Lê Thanh Hải¹

¹Bệnh viện Nhi Trung ương, 18/879 La Thành, Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

³Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec, 458 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

⁴Viện Nghiên cứu Tế bào gốc và Công nghệ gen Vinmec, 458 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: U nguyên bào thần kinh (NBTK) là khối u ác tính ngoài sọ phổ biến nhất ở trẻ em, và được đặc trưng bởi sự không đồng nhất về mặt sinh học dựa trên sự đa dạng trong các biến đổi di truyền. Việc xác định biến đổi di truyền là một công cụ mạnh mẽ giúp cho các nhà lâm sàng phân nhóm nguy cơ và lựa chọn phác đồ điều trị chính xác cho từng bệnh nhân. Điều này sẽ góp phần làm tăng cơ hội điều trị thành công và giảm tối đa liều lượng hóa chất cho bệnh nhân. Đối tượng: 6 bệnh nhân u NBTK nhỏ hơn 18 tháng tuổi, không có khuếch đại gen *MYCN*, ở giai đoạn L2 và M trong đầu năm 2017 tại Bệnh viện Nhi Trung Ương. Phương pháp: Kỹ thuật lai so sánh hệ gen được thực hiện trên hệ thống CGH của hãng Agilent, với tiêu bản có độ phân giải 400000 đoạn oligo nucleotit. Kết quả: Đã xác định được biến đổi di truyền của 6 bệnh nhân, trong đó 4 bệnh nhân đang ở giai đoạn L2 có biến đổi về số lượng nhiễm sắc thể và 2 bệnh nhân (01 bệnh nhân giai đoạn L2 và 1 bệnh nhân giai đoạn M) có biến đổi cấu trúc nhiễm sắc thể. Dựa trên kết quả này, 4/5 bệnh nhân giai đoạn L2 được chỉ định không cần điều trị hóa chất tiếp, 1/5 bệnh nhân được chỉ định tiếp tục điều trị hóa chất. 1 bệnh nhân giai đoạn M có 50% cơ hội điều trị thành công khi áp dụng hóa trị liệu liều cao kết hợp ghép tế bào gốc. Kết luận: Xác định biến đổi di truyền bằng kỹ thuật lai so sánh hệ gen đã được triển khai thành công tại Việt Nam, mở ra cơ hội điều trị thành công với lượng hóa chất tối thiểu cho bệnh nhân u NBTK.

Từ khóa: U nguyên bào thần kinh, kỹ thuật lai so sánh hệ gen, điều trị.

1. Mở đầu

U nguyên bào thần kinh (neuroblastoma) là dạng khối u có nguồn gốc phôi bào của hệ thần

kinh giao cảm, tức là tế bào gốc của khối u là những tế bào tiền thân đang phát triển và được biệt hóa chưa hoàn toàn, bắt nguồn từ mô màng thần kinh. Chính vì thế, u NBTK thường xảy ra ở trẻ nhỏ [1]. Đây là khối u hay gặp nhất ở trẻ em dưới 1 tuổi, với tỷ lệ mắc mới là 1/7000 trẻ đẻ sống. Độ tuổi chẩn đoán trung bình là 18 tháng [2].

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-984886857.

Email: vudinhquang@nhp.org.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4583>

Các nghiên cứu về di truyền trên u NBTK đã được thực hiện từ những năm 1980. Nhiều biến đổi di truyền ở bệnh nhân UNBTK được phát hiện như khuếch đại gen *MYCN*, mất đoạn cánh ngắn nhiễm sắc thể (NST) số 1 (1p), thêm đoạn cánh dài NST số 17 (17q) hay mất đoạn cánh dài NST số 11 (11q),... Các dấu ấn di truyền này đã bổ sung thêm nhiều thông tin về tiên lượng, cho thấy vai trò quan trọng trong việc phân nhóm bệnh nhân cũng như lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp nhất. Chẳng hạn, các bệnh nhân có bất thường về số lượng nhiễm sắc thể, tạo ra thể (gàn) tam bội có tiên lượng tốt; hay khuếch đại gen *MYCN* thường gặp trên các bệnh nhân nguy cơ cao, tiên lượng xấu... [3]. Các bất thường này được chia thành 2 nhóm lớn: các biến đổi về số lượng NST (thêm, mất một hoặc vài NST) (NCA, *numerical chromosomal aberrations*) và các biến đổi liên quan đến cấu trúc NST (thêm đoạn, mất đoạn, khuếch đại gen) (SCA, *segmental chromosomal aberrations*). Các khối u chỉ có biến đổi về số lượng NST hay gặp ở các bệnh nhân nhỏ tuổi, giai đoạn sớm, có thiên hướng biệt hóa và có tiên lượng tốt hơn. Ngược lại, các biến đổi về cấu trúc ở NST 1p, 3p, 4p, 11q, 17q hay khuếch đại gen *MYCN* lại là dấu ấn tiên lượng xấu cho bệnh nhân u NBTK [4].

Các biến đổi di truyền này có thể được phát hiện bằng xác định công thức NST cơ bản hoặc bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH). Trong khi, công thức NST đòi hỏi nhiều thời gian phân tích và kém hiệu quả do cần phải có cụm nhiễm sắc thể từ khối u tươi, thì hạn chế của của kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ là tốn thời gian, và không thể phát hiện nhiều biến đổi cùng lúc với số lượng mẫu lớn. Sự ra đời của kỹ thuật lai so sánh hệ gen có khả năng phân tích toàn bộ hệ gen đã cho phép xác định biến đổi di truyền của bệnh nhân u NBTK chỉ với 1 lần chạy. Các kết quả này đã giúp phân loại di truyền u NBTK thành các nhóm nhỏ với các đặc điểm tiên lượng riêng biệt, tương ứng với các phác đồ và kết quả điều trị khác nhau [4, 5].

Kỹ thuật lai so sánh hệ gen (CGH, *Comparative Genomics Hybridization*) được ra đời năm 1992 trong một công trình nghiên cứu

về di truyền tế bào trên u đặc ở Hoa Kỳ [6]. Từ đó đến nay, kỹ thuật này được hoàn thiện và trở nên phổ biến trong các nghiên cứu di truyền trên các khối u đặc hay các rối loạn phát triển như tự kỷ, chậm phát triển tâm thần vận động,... Thành phần đầu tiên và quan trọng nhất của kỹ thuật này là DNA chip, gồm hàng nghìn đến hàng triệu các đoạn oligonucleotide có trình tự xác định (đầu dò) được gắn trên bản kính hiển vi. Thông thường, phân tích biến đổi di truyền trên khối u NBTK cần từ 60.000 (60k) đến 180.000 (180k) đoạn oligo nucleotide trong một chip. Thành phần thứ hai là hỗn hợp hai mẫu DNA hệ gen có đánh dấu huỳnh quang: mẫu DNA nghiên cứu (thường đánh dấu màu đỏ) và mẫu DNA đối chứng (thường đánh dấu màu xanh). Hỗn hợp mẫu DNA này sẽ được nhỏ lên DNA chip để gắn vào các đầu dò có sẵn. Tổng hợp tỷ lệ huỳnh quang ở từng đầu dò, ta có thể xác định được thêm hay mất đoạn NST ở vị trí các đầu dò đó [7, 8].

Các bệnh nhân u NBTK thường được đánh giá trạng thái khuếch đại gen *MYCN* bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH). Tuy nhiên, đối với các bệnh nhân nguy cơ thấp và trung bình không có khuếch đại gen *MYCN*, vẫn cần thêm thông tin về tình trạng biến đổi di truyền để có được quyết định điều trị phù hợp. Dựa trên cơ sở đó nghiên cứu này được thực hiện nhằm để xác định biến đổi di truyền của một số bệnh nhân u NBTK và sử dụng kết quả có được vào việc lựa chọn phác đồ điều trị cho bệnh nhân.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

06 bệnh nhân trong nhóm tuổi ít hơn 18 tháng được chẩn đoán mắc u NBTK tại BVNTU từ tháng 1 đến tháng 4 năm 2017, trong đó có 05 bệnh nhân giai đoạn L2 và 01 bệnh nhân giai đoạn M (theo hệ thống phân loại u NBTK quốc tế, INRG). Các bệnh nhân này đều được xác định không có khuếch đại gen *MYCN* bằng kỹ thuật FISH.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Mẫu bệnh phẩm

Mảnh u tươi (không cố định trong formol) trước điều trị hóa chất được thu thập ngay sau sinh thiết và bảo quản ở -80°C đến thời điểm nghiên cứu.

2.2.2. Kỹ thuật lai so sánh bộ gen

Kỹ thuật lai so sánh bộ gen được thực hiện tại phòng Nghiên cứu Ung thư, VNC Vinmec trên hệ thống CGH của hãng Agilent (Quốc gia).

Tiêu bản sử dụng cho nghiên cứu này là **SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent)** với DNA chip có độ phân giải 400000 đoạn oligo nucleotide phủ toàn bộ hệ gen.

DNA hệ gen từ các mẫu bệnh phẩm được tách bằng kit (tên bộ kit) của hãng Qiagen và được đo nồng độ bằng máy đo DNA Nanodrop

2000 (Thermo Scientific). DNA sau đó được đánh dấu bằng thuốc nhuộm Cy5, và trộn với DNA hệ gen đối chứng đã được đánh dấu bằng thuốc nhuộm Cy3. Hỗn hợp DNA này được nhỏ lên tiêu bản và phản ứng lai được thực hiện ở 67°C trong 40 giờ (h). Kết quả lai được phân tích bằng phần mềm CytoGenomics (Agilent).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xác định biến đổi di truyền

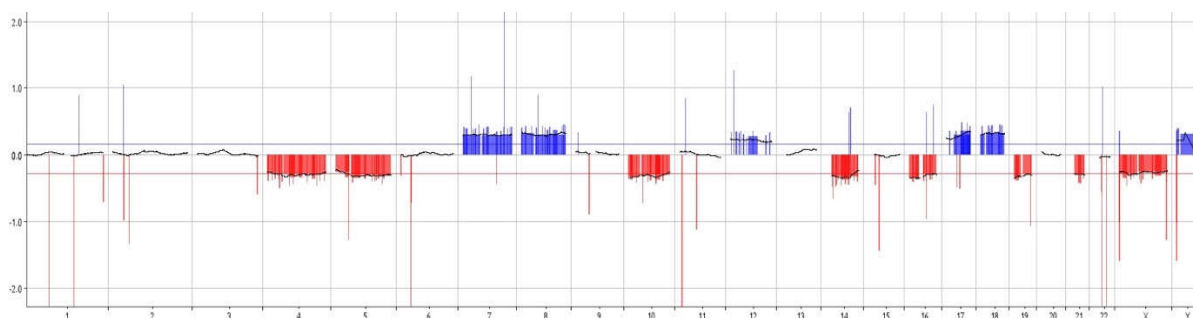
Kết quả lai so sánh bộ gen đều thể hiện các biến đổi di truyền một cách rõ ràng thông qua các hình ảnh của từng NST (hình 1 và 2). Từ kết quả CGH, dữ liệu được phân tích và từ đó biến đổi di truyền (BĐĐT) được xác định. Trong số 06 bệnh nhân, 04 bệnh nhân chỉ biến đổi về số lượng NST (NCA) và 02 bệnh nhân có biến đổi về cấu trúc NST (SCA) (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách bệnh nhân u NBTK và biến đổi di truyền

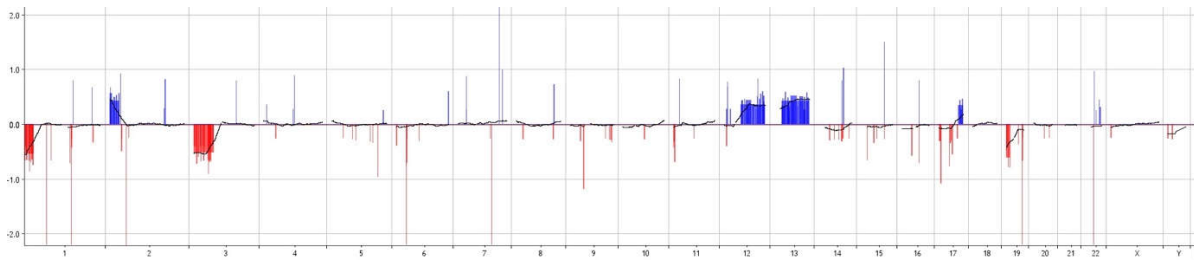
| STT | Mã số bệnh nhân | Tuổi | Giai đoạn INRG | Biến đổi di truyền |
|-----|-----------------|----------|----------------|--|
| 1 | NBL001 | 11 tháng | L2 | NCA (-3,-4,+7,-10,-11,-13,-14,-16,+17,-19,-21) |
| 2 | NBL002 | 13 tháng | L2 | NCA (-4,-5,+7,+8,-10,-14,-16,+17,+18,-19,-21) |
| 3 | NBL003 | 2 tháng | L2 | NCA (-4,+7,-9,-10,-11, -14, -17,-21) |
| 4 | NBL004 | 15 tháng | L2 | SCA (-1p,-4,-9q,-11q, -17p,+17q,-19) |
| 5 | NBL005 | 12 tháng | L2 | NCA (-4,-5,+7,+8,-10,-14,-16,+17,+18,-19,-21) |
| 6 | NBL006 | 12 tháng | M | SCA (-1p,+2q, -3p,+12q,+13,+17q,-19p) |

Ghi chú: -: mất; +: thêm; p: cánh ngắn; q: cánh dài

Một số hình ảnh kết quả lai so sánh hệ gen được thực hiện trên 6 mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân u NBTK không có khuếch đại gen *MYCN*.



Hình 1. Kết quả NCA của bệnh nhân NBL005 (trục tung: cường độ tín hiệu; trục hoành: số thứ tự nhiễm sắc thể, màu xanh: tăng tín hiệu, màu đỏ: giảm tín hiệu).



Hình 2. Kết quả SCA của bệnh nhân NBL006 (trục tung: cường độ tín hiệu; trục hoành: số thứ tự nhiễm sắc thể, màu xanh: tăng tín hiệu, màu đỏ: giảm tín hiệu).

Như vậy, vị trí những biến đổi trong hệ gen của từng bệnh nhân u NBTK đã được xác định thành công bằng kỹ thuật lai so sánh hệ gen. Đồng thời, kỹ thuật lai so sánh hệ gen đã cho thấy khả năng phát hiện nhiều biến đổi nhiễm sắc thể cùng lúc trong một lần chạy. Đây chính là ưu điểm vượt trội khi so sánh với các kỹ thuật khác hiện nay đang sử dụng để phát hiện biến đổi di truyền ở mức độ nhiễm sắc thể như công thức nhiễm sắc thể, lai huỳnh quang tại chỗ hay MLPA. Các kết quả biến đổi di truyền này sẽ được áp dụng để phân loại và chọn lựa hướng điều trị phù hợp cho từng bệnh nhân.

3.2. Ứng dụng kết quả CGH trong phác đồ điều trị

Các bn u NBTK tại BVNTU được điều trị theo phác đồ của Hiệp hội Ung thư Nhi châu Âu SIOPEN. Trong số 05 bn giai đoạn L2 ở nghiên cứu này có 03 bn đã ngừng điều trị hóa chất sau 2 đợt Carbo-VP16, 01 bn đang điều trị hóa chất (2 đợt Carbo-VP16 + 1 đợt CADO), cả 4 bn này đều không có khả năng phẫu thuật và 01 bn mới chẩn đoán. Việc quyết định điều trị tiếp hay chỉ theo dõi phụ thuộc rất nhiều vào kết quả BDDT. Nếu BDDT là NCA thì bn có thể dừng điều trị và theo dõi tiếp. Ngược lại, nếu là SCA thì bn sẽ cần điều trị tiếp tục 2 đợt hóa chất và phẫu thuật.

Mặt khác, bn giai đoạn M đã điều trị xong hóa trị liệu tấn công theo phác đồ nguy cơ cao và đang được điều trị giảm nhẹ. Kết quả CGH là NCA sẽ cho phép ngừng điều trị hóa chất, nếu là SCA cần tiếp tục điều trị hóa trị liều cao kèm ghép tế bào gốc, phẫu thuật và xạ trị, khả năng khỏi bệnh trong trường hợp này là 50%.

Kết quả BDDT đã giúp cho các nhà lâm sàng có quyết định phù hợp với từng bệnh nhân để có thể mang lại kết quả điều trị cao nhất, đặc biệt với 3 bn giai đoạn L2 là NBL002, NBL004 và NBL005. Bn NBL002 được quyết định không điều trị hóa chất đợt 4 (CADO). Bn NBL004 là một bn đã ngừng điều trị và đang theo dõi định kỳ, nhưng với kết quả BDDT SCA, bn này cần tiếp tục điều trị 2 đợt hóa trị và phẫu thuật để làm giảm nguy cơ tái phát. Còn với bn NBL005, đây là một bn mới và kết quả BDDT NCA đã giúp cho bệnh nhân tránh được việc điều trị hóa chất khi kích thước khối u đã giảm đi 40% trong vòng 1 tháng. Rõ ràng, xác định BDDT bằng CGH là một công cụ rất có ý nghĩa, đóng góp vai trò quan trọng trong việc phân nhóm nguy cơ và lựa chọn phác đồ phù hợp nhất cho từng bệnh nhân.

4. Kết luận

Kỹ thuật lai so sánh hệ gen nhằm xác định các biến đổi di truyền trên toàn bộ hệ gen ở các bệnh nhân u NBTK là công cụ hiệu quả, có khả năng được áp dụng cho các trường hợp đã xác định không có khuếch đại gen *MYCN*, giúp bổ sung thông tin về các biến đổi di truyền khác ở bệnh nhân, từ đó các nhà lâm sàng có định hướng điều trị phù hợp và hiệu quả. Việc áp dụng CGH như là phương pháp xét nghiệm cận lâm sàng đã và sẽ mở ra nhiều hơn cơ hội điều trị thành công cũng như giảm tối đa việc điều trị hóa chất đối với từng bệnh nhân u NBTK tại Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

- [1] Brodeur G. M. (2003), "Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma", *Nature reviews. Cancer* 3(3), 203-216.
- [2] London W. B., Castleberry R. P., Matthay K. K., Look A. T., Seeger R. C., Shimada H., Thomer P., Brodeur G., Maris J. M., Reynolds C. P. and Cohn S. L. (2005), "Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group", *Journal of clinical oncology* 23(27), 6459-65
- [3] Maris J. M. (2010), "Recent Advances in Neuroblastoma", *The New England Journal of Medicine* 362(23), 2202-2211.
- [4] Thomer P. S. (2014), "The molecular genetic profile of neuroblastoma", *Diagnostic Histopathology* 20(2), 76-83.
- [5] Janoueix-Lerosey I., Schleiermacher G., Michels E., Mosseri V., Ribeiro A., Lequin D., Vermeulen J., Couturier J., Peuchmaur M., Valent A., Plantaz D., Rubie H., Valteau-Couanet D., Thomas C., Combaret V., Rousseau R., Eggert A., Michon J., Speleman F. and Delattre O. (2009), "Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma", *Journal of clinical oncology* 27(7), 1026-33.
- [6] Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Sudar Da., Rutovitz D., Gray J. W., Waldman F. and Pinkel D. (1992), "Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors", *Science* 258, 818-821.
- [7] Garnis C., Coe B. P., Lam S. L., MacAulay C. and Lam W. L. (2005), "High-resolution array CGH increases heterogeneity tolerance in the analysis of clinical samples", *Genomics* 85(6), 790-3.
- [8] Pinkel D. and Albertson D. G. (2005), "Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer", *Nature Genetics* 37 Suppl, S11-7.

Application of Comparative Genomics Hybridization Technique in Determining Genomic Profiles and Treatment in Non-Amplified *MYCN* Neuroblastoma Patients in Vietnam

Vu Dinh Quang¹, Nguyen Thi Hong Van², Phung Tuyet Lan³, Nguyen Xuan Huy¹, Ngo Diem Ngoc¹, Bui Ngoc Lan¹, Pham Duy Hien¹, Le Dinh Cong¹, Hoang Ngoc Thach¹, Duong Hong Quan⁴, Nguyen Thanh Liem⁴, Le Thanh Hai¹

¹Vietnam National Hospital of Pediatrics, 18/879 La Thanh, Dong Da, Hanoi, Vietnam

²VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

³Vinmec International Hospital, 458 Minh Khai, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam

⁴Vinmec Research Institute of Stem Cell and Gene Technology, 458 Minh Khai, Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam

Abstract: Neuroblastoma (NBL) is the most common extracranial solid cancer of childhood and is characterized by a remarkable biological heterogeneity, cause of multiple genetic changes. The genetic profiles are the powerful tools for the clinical in risk stratification and choice of suitable treatment protocol in NBL patients. This will increase the chance of treatment's success and minimize the chemotherapy per patient. **Sample:** 6 NBL patients lower 18 months, non-amplified *MYCN* in National Children's Hospital. **Method:** The CGH technique is performed on the Agilent's system with the 400k chip. **Results:** 4 patients are found the numerical chromosomal aberrations (NCA) (both stage L2), the others are the segmental chromosomal aberrations (SCA) (1 stage L2 and 1 stage M). Based on this results, 4/5 patients will stop the chemotherapy, 1 patient continues the treatment. The stage M patient has the 50% chance of success in high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. **Conclusion:** The genomic profile by CGH is established successfully in Vietnam, bring to NBL patients the higher chance of complete treatment with the minimal chemotherapy.

Keywords: Neuroblastoma, Comparative Genomics Hybridization, Treatment.