

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

PHAN NGUYỄN THANH VÂN

**ỨNG DỤNG KỸ THUẬT KHUẾCH ĐẠI GIEN
KHẢO SÁT CÁC TỔ HỢP GIEN THƯỜNG GẶP
TRONG BỆNH LÝ BẠCH CẦU CẤP**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

TP. Hồ Chí Minh – Năm 2013

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạch cầu cấp (BCC) là bệnh lý ác tính của hệ tạo máu được đặc trưng bởi sự tăng sinh và tích tụ tế bào non trong máu và tủy xương. BCC được chia thành 2 nhóm chính là BCC dòng tủy (BCCDT) và BCC dòng lympho (BCCDL). Trước đây, việc chẩn đoán và phân loại bệnh bạch cầu cấp hoàn toàn dựa trên hình thái học và nhuộm hóa tế bào theo tiêu chuẩn phân loại của FAB (French – American - British) [9], [30]. Gần đây, trên thế giới, việc xác định dấu ấn miễn dịch bằng kỹ thuật tế bào dòng chảy (Flow Cytometry) đã được dùng nhằm phân loại các phụ nhóm của BCC như: BCC dòng lympho B (BCCDL-B), BCC dòng lympho (BCCDL-T) và BCCDT, đặc biệt là những trường hợp không biệt hóa [23].

Ngày nay, những bất thường về di truyền tế bào và về gien được tìm thấy trong hầu hết các bệnh ung thư máu. Tế bào bệnh bạch cầu có thể mang những bất thường nhiễm sắc thể (NST) khác nhau bao gồm những thay đổi về số lượng NST như tăng số lượng bộ NST hay giảm số lượng bộ NST, 3 NST và những thay đổi về cấu trúc NST như mất đoạn, đảo đoạn và chuyển đoạn NST.

Trong BCCDT, 4 chuyển vị NST thường gặp là t(8;21), t(15;17), t(9;11) và inv(16)/t(16;16) tạo ra 4 kiểu tổ hợp gien *AML1/ETO* [35], [88], *PML/RARA* [27], *MLL/AF9* [19] và *CBFB/MYH11* [89] tương ứng gặp trong 25-30% bệnh nhân. Bên cạnh đó, trong BCCDL, 4 chuyển vị NST thường gặp là t(1;19), t(4;11), t(12;21) và t(9;22) tạo ra 4 kiểu tổ hợp gien *E2A/PBX1* [62], [96], *MLL/AF4* [29], [149], *TEL/AML1* [72] và *BCR/ABL* [80] tương ứng gặp trong 30-35% bệnh nhân.

Sự nhận dạng gien *BCR* và *ABL* trong chuyển đoạn t(9;22) tiêu biểu cho bước ngoặt quan trọng khác trong việc thiết lập cơ sở di truyền trong bệnh bạch cầu [124]. Nhiều nghiên cứu sau đó đã xác lập cơ sở phân tử cho những bất thường NST đặc trưng trong bệnh bạch cầu. Ngoài việc cung cấp những đầu mối về nguyên nhân bệnh bạch cầu, những tiến bộ như thế có ý nghĩa quan trọng trong

việc xử trí bệnh [14].

Có nhiều phương pháp để phát hiện các bất thường về di truyền tế bào như phân tích NST đồ, kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH: Fluorescence *In Situ* Hybridization), lai so sánh bộ gen (CGH: Comparative Genomic Hybridization), SKY (Spectral Karyotyping), M-FISH (Multiplex- Fluorescence *In Situ* Hybridization) hoặc CGH microarray, gọi là kỹ thuật di truyền tế bào phân tử. Ngoài ra, còn có kỹ thuật khuếch đại gen phiên mã ngược (RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction). Với những ưu điểm như độ nhạy cao (có khả năng phát hiện 1 tế bào ác tính trong 10.000 – 1.000.000 tế bào) [17], [115], [144], phát hiện được những chuyển đoạn NST khó được phát hiện bằng kỹ thuật NST đồ do kích thước NST không thay đổi rõ như t(12;21)(p13;q22) [121] đồng thời cho kết quả nhanh nên kỹ thuật RT-PCR ngày càng trở thành công cụ quan trọng trong chẩn đoán các bất thường về NST và gen cho bệnh nhân ung thư máu.

Tại Việt Nam, nhiều nhà khoa học đã thực hiện khá nhiều nghiên cứu về ung thư, từ dịch tễ cho đến điều trị. Tuy nhiên, việc nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật di truyền trong phân tích các bất thường NST trong chẩn đoán và điều trị bệnh lý bạch cầu cấp còn rất hạn chế. Trước đây, chỉ có vài báo cáo ứng dụng kỹ thuật phân tích di truyền tế bào kinh điển để phát hiện bất thường NST Philadelphia (Ph) trong bệnh BCMDT, nhưng chỉ dừng lại ở mức độ nghiên cứu trên số lượng nhỏ bệnh nhân, chưa được áp dụng thường quy trong chẩn đoán và theo dõi điều trị bệnh.

Từ tháng 3 năm 2006, Bệnh viện Truyền Máu Huyết Học thành phố Hồ Chí Minh (BV. TMHH TP. HCM) đã áp dụng thường quy các kỹ thuật sinh học phân tử FISH và RT-PCR trong chẩn đoán, tiên lượng và đặc biệt là theo dõi đáp ứng điều trị, đánh giá bệnh tồn lưu ở mức độ phân tử ở bệnh lý bệnh BCMDT, BCCDT và BCCDL. Trong năm 2006, 123 bệnh nhân bệnh bạch cầu được phân tích bằng kỹ thuật FISH để phát hiện các chuyển đoạn t(9;22), t(15;17) và t(8;21) và bằng kỹ thuật RT-PCR để phát hiện các tổ hợp gen *BCR/ABL*, *PML/RARA* và *AML1/ETO* tại Bệnh viện. Trong 2 năm, từ 2008 đến 2010, Bệnh viện phối hợp với Đại học Y

được TP. HCM triển khai đề tài cấp Nhà nước chuẩn hóa các kỹ thuật di truyền phân tử trong bệnh lý huyết học.

Việc ứng dụng sinh học phân tử (kỹ thuật RT-PCR, Multiplex PCR, PCR định lượng gen) cho kết quả nhanh chóng hơn so với các kỹ thuật di truyền như nhiễm sắc thể đồ hay FISH, nên đáp ứng kịp thời với nhu cầu chẩn đoán bệnh và chọn lựa phác đồ thích hợp. Kỹ thuật có độ nhạy cao, nên rất thích hợp để theo dõi điều trị bệnh và đánh giá nguy cơ tái phát bệnh. Bên cạnh đó, chúng ta có thể phát hiện nhiều bất thường cùng một lúc, thay vì tốn nhiều thời gian và chi phí cho việc khảo sát từng bất thường như trong kỹ thuật FISH, nên phân nhóm tiên lượng bệnh sớm.

Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu tổng quát như sau: "Ứng dụng kỹ thuật khuếch đại gen khảo sát các tổ hợp gen thường gặp trong bệnh lý bạch cầu cấp, góp phần phân loại nhóm tiên lượng bệnh và theo dõi điều trị, tại bệnh viện Truyền máu Huyết học thành phố Hồ Chí Minh, từ ngày 01 tháng 10 năm 2009 đến 31 tháng 7 năm 2011". Để đạt được kết quả trên, chúng tôi cần phải thực hiện các mục tiêu chuyên biệt sau:

1. Xác định tỷ lệ của các tổ hợp gen thường gặp lúc mới chẩn đoán trong nhóm bệnh bạch cầu cấp dòng tủy.
2. Xác định tỷ lệ của các tổ hợp gen thường gặp lúc mới chẩn đoán trong nhóm bệnh bạch cầu cấp dòng lympho.
3. Triển khai kỹ thuật PCR định lượng theo dõi điều trị.

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Di truyền phân tử và ý nghĩa trong bạch cầu cấp dòng tủy

Đối với BCCDT, có rất nhiều yếu tố tiên lượng bệnh như: triệu chứng lâm sàng, độ tuổi, huyết học, miễn dịch và di truyền học. Nhờ sự phát triển của sinh học phân tử, những bất thường về NST và các đột biến gen ngày càng được xác định một cách dễ dàng và trở thành một công cụ quan trọng giúp chẩn đoán cũng như tiên lượng bệnh. Tương ứng với tính đa dạng về mặt biểu hiện lâm sàng, những thay đổi NST và đột biến gen trong BCCDT rất phức tạp [117]. Khảo sát những bất thường về NST và đột biến gen lúc chẩn đoán có ý nghĩa quyết định đối với tiên lượng bệnh. Bên cạnh đó, việc phát hiện các đột biến gen đóng vai trò rất quan trọng đối với chẩn đoán, điều trị, cũng như xác định các yếu tố tiên lượng bệnh. Việc phân nhóm nguy cơ theo di truyền tế bào khác nhau giữa nhóm bệnh nhân (BN) trẻ tuổi và nhóm ≥ 60 tuổi và những bất thường NST mắc phải hiện diện trong tế bào ung thư máu của hầu hết bệnh nhân BCCDT.

1.1.1. Các bất thường NST và gen phổ biến

Vào thập niên 1970, gần 50% BCCDT được tìm thấy có bất thường NST bằng phân tích NST đồ kinh điển. Ngày nay, với sự phối hợp của các kỹ thuật di truyền phân tử như kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH: Fluorescence in *situ* Hybridization), lai so sánh bộ gen (CGH: Comparative Genomic Hybridization), khuếch đại gen (PCR: Polymerase Chain Reaction), khoảng 55 đến 78% BCCDT người lớn có bất thường NST, trong đó 55% là 1 bất thường; 15-20% là tam bội (trisomy) hoặc đơn bội (monosomy) và phần còn lại có từ 2 bất thường trở lên.

Những bất thường NST thường gặp trong BCCDT bao gồm t(15;17), t(8;21), inv(16), +8, +21, del(5q), -7, bất thường 11q23 và bất thường 12p11-13. Sự phối hợp giữa dữ liệu lâm sàng và di truyền phân tử đã đưa đến việc nhận ra những phân nhóm BCCDT và giúp phân nhóm tiên lượng. Những bất thường di truyền xuất

hiện rơi vào hai nhóm bổ sung được định nghĩa rộng gồm nhóm I và nhóm II. Nhóm I bao gồm những đột biến hoạt hóa những con đường truyền tín hiệu, làm tăng cường sự tăng sinh và khả năng sống sót của những tế bào bạch cầu đầu nguồn. Những đột biến dẫn đến hoạt hóa thụ thể tyrosine kinase FLT3 hoặc hoạt hóa đường truyền tín hiệu RAS được xếp vào những đột biến thuộc nhóm I. Nhóm II bao gồm những đột biến ảnh hưởng đến những yếu tố phiên mã hoặc là thành phần của phức hợp đồng hoạt hóa phiên mã, làm suy giảm khả năng biệt hóa tế bào. Những tổ hợp gen được tạo thành từ những chuyển đoạn t(8;21), inv(16)/t(16;16), t(15;17), hoặc những đột biến của gen *CEBPA*, *MLL*, và *NPM1* được xếp vào nhóm II [28] (Phụ lục 1. Danh mục các gen).

1.1.1.1. Chuyển đoạn t(8;21)(q22;q22)

Chuyển đoạn t(8;21)(q22;q22) được mô tả lần đầu tiên vào năm 1973. Đây là chuyển đoạn rất thường gặp trong bệnh BCCDT thể M2 (theo FAB) tạo ra tổ hợp gen *AML1/ETO* [35], [88]. Gen *AML1* (acute myeloid leukemia 1 gene) còn được biết đến với tên *PEBP2a* (polyoma enhancer binding protein 2 subunit a), hoặc *CBFA2* (core binding factor subunit A2) gồm có 9 exon, tạo thành một vùng có kích thước 150 kb. Gen *ETO* (Eight Twenty One) còn có tên là gen *CDR* (cyclin D-related) hoặc *MTG8* (myeloid translocation gene on chromosome 8) gồm có 13 exon kéo dài một đoạn 87 kb. Hậu quả chuyển đoạn này là chuyển gen *AML1* trên nhiễm sắc thể số 21 đến gắn với gen *ETO* trên nhiễm sắc thể số 8. Gen *AML1* bình thường mã hóa protein có vai trò trong hoạt hóa phiên mã làm tế bào phân chia và biệt hóa. Khi xuất hiện chuyển đoạn, protein hình thành từ tổ hợp gen *AML1/ETO* không những không có chức năng của protein AML1 mà còn ức chế protein AML1 bình thường, dẫn đến tế bào bị ung thư.

Chuyển đoạn t(8;21) có tiên lượng tốt ở người lớn bệnh BCCDT, tỷ lệ đạt lui bệnh cao với thời gian lui bệnh kéo dài nếu trong điều trị củng cố sử dụng liều cao Cytarabine. Khác với người lớn, trẻ em có chuyển đoạn t(8;21) đáp ứng trung bình với hóa trị liệu và có thời gian sống ngắn hơn [150].

1.1.1.2. Chuyển đoạn t(15;17)(q22;q11)

Chuyển đoạn t(15;17)(q22;q11) và tổ hợp gen *PML/RAR α* là chuyển đoạn đặc hiệu trong BCCDT, thể M3 (APL) [123], được gợi ý bằng sự hiện diện của nhiều hạt lớn tiền tủy bào kết hợp với đông máu nội mạch lan tỏa, nhưng cũng có phân nhóm với ít hạt li ti. Tổ hợp gen *PML/RARA* được sử dụng như một chỉ điểm cho việc phát hiện những tế bào APL tại thời điểm chẩn đoán cũng như theo dõi trong suốt quá trình điều trị. Tuy nhiên, tổ hợp gen này hiện diện trong hầu hết nhưng không phải trong tất cả những trường hợp APL [27], [143]. Chuyển đoạn này mang gen *RAR α* (Retinoic Acid Receptor α) trên nhiễm sắc thể số 17 đến gần với gen *PML* (Promyelocytic Leukemia) trên nhiễm sắc thể số 15. Những điểm gãy trên gen *RARA* luôn xuất hiện ở intron 2 dài 17 kb. Trái lại, 3 vùng điểm gãy trên gen *PML* liên quan đến chuyển vị t(15;17) nằm trên intron 6 (bcr1; 55% trường hợp), exon 6 (bcr2; 5%), và intron 3 (bcr3, 40%). Kết quả là có 3 đồng dạng của tổ hợp gen *PML/RARA* có khả năng xảy ra là dạng dài (L hoặc bcr1), dạng biến thể (V hoặc bcr2), và dạng ngắn (S hoặc bcr3). Điều đáng lưu ý là trong trường hợp dương tính với bcr2, những sản phẩm PCR của bản mã *PML/RARA* sẽ có kích thước khác nhau tùy thuộc vào vị trí của điểm đứt gãy nằm trên exon 6 của gen *PML*.

Bình thường, protein sản phẩm của gen *RAR α* có chức năng hoạt hóa quá trình phiên mã của các gen có vai trò giúp tế bào trưởng thành. Cấu trúc của protein này có phần gắn vào deoxyribonucleic acid (DNA) và một phần tương tác với dẫn chất của acid retinoic. Trong trường hợp chuyển đoạn t(15;17), tổ hợp gen *PML/RAR α* mã hóa protein mới, protein mới này không những không hoạt hóa phiên mã mà còn ức chế chức năng của *RAR α* bình thường do đó tế bào không tổng hợp được protein, quá trình trưởng thành tế bào dừng lại ở giai đoạn tiền tủy bào. Theo y văn, để hoạt động ức chế phiên mã, protein *PML/RAR α* phải gắn với một phức chất khác gồm chất đồng ức chế nhân (NcoR: Nuclear CoRepressor) và enzym histone de-acetylase. Hiện tượng gắn hai phức này sẽ bị ly giải với sự có

mặt của dẫn chất acid retinoic và khi ly giải thì protein PML/RAR α không còn tác dụng.

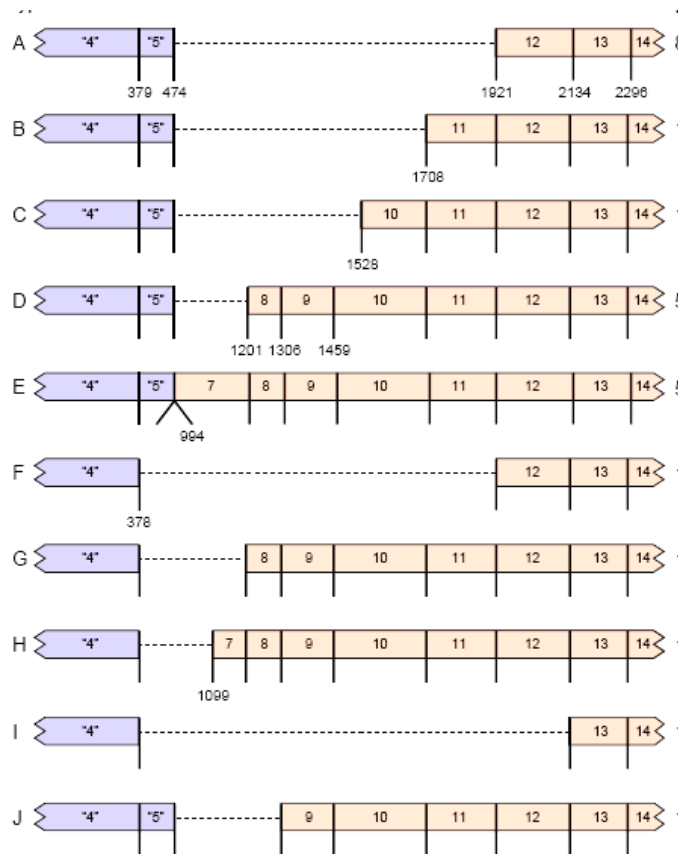
Lợi dụng đặc tính này, người ta dùng ATRA (All Trans Retinoic Acid) để điều trị bệnh. Những chiến lược điều trị APL mới tập trung vào giảm thiểu liều pháp hóa trị, dùng kết hợp ATRA và Arsenic trioxide (nhắm vào đích là gen *PML*) như là liệu pháp ban đầu cho những bệnh nhân không thể đáp ứng với anthracycline hoặc những người lớn tuổi [81]. Kết quả dương tính với tổ hợp gen *PML/RARA* ở những bệnh nhân sau giai đoạn điều trị củng cố như là một dấu hiệu báo trước mạnh mẽ cho sự tái phát về mặt huyết học sẽ diễn ra sau đó [4]. Trái lại, những kết quả âm tính lặp lại sẽ đi liền với việc thời gian sống sót kéo dài trên phần lớn bệnh nhân. Do đó, phát hiện t(15;17) và tổ hợp gen *PML/RARA* đóng góp rất lớn trong việc quyết định điều trị bằng ATRA; cũng như là cơ sở cho chẩn đoán, theo dõi điều trị và tiên lượng [65].

1.1.1.3. Đảo đoạn nhiễm sắc thể 16

Đảo đoạn nhiễm sắc thể 16, inv(16)(p13;q22) đã được Le Beau mô tả trong bệnh BCCDT vào năm 1983; ngoài ra, một bất thường liên hệ khác cũng được mô tả là chuyển đoạn t(16;16)(p13;q32). Bất thường này xảy ra chủ yếu (khoảng 50%) trên bệnh nhân BCC dòng tủy-monô bào có kèm tăng bạch cầu ái toan (BCCDT-M4Eo). Tuy nhiên, tổ hợp gen *CBFB/MYH11* vẫn được tìm thấy ở nhiều dạng khác của BCCDT như thể M4 không kèm bạch cầu ái toan, thể M2, M5; và ít gặp hơn trong thể M1, M6, và M7 [70]. Bất thường inv(16)/t(16;16) được phát hiện trên 8-9% bệnh nhân mới được chẩn đoán BCCDT [122], và 4 - 16% bệnh nhân BCCDT có bất thường NST.

Đối với gen *CBFB*, phần lớn những điểm đứt gãy nằm trên intron 5 dài 15 kb. Hướng từ đầu 5' đến đầu 3' là hướng từ tâm động đến đầu mút của NST. Gen *MYH11* gồm có 21 exon trải dài một đoạn 37 kb. Vùng 5' của gen *MYH11* thường bị mất trong suốt quá trình đảo đoạn. Kết quả là chỉ có tổ hợp gen *CBFB/MYH11* được biểu hiện trong trường hợp inv(16)(p13q22). Trong cả hai trường hợp đảo

đoạn và chuyển đoạn, gen *CBFB* ở 16q22 và gen *MYH11* ở 16p13 bị gãy, kết quả tạo thành tổ hợp gen 5'*CBFB* và 3'*MYH11*. Do kết quả của hiện tượng ghép nối khác nhau (alternative splicing), 10 bản mã của tổ hợp gen *CBFB/MYH11* (từ A đến J) đã được báo cáo (Hình 1.1). Trong đó, hơn 85% những bệnh nhân dương tính có bản mã dạng A; bản mã dạng D và E, mỗi dạng chiếm gần 5%; trái lại, tất cả những dạng còn lại chỉ xuất hiện rời rạc. RNA thông tin của tổ hợp gen này là một dấu ấn phân tử điển hình thích hợp cho cả trong chẩn đoán lẫn theo dõi điều trị [22], [109]. Những bệnh nhân BCCDT có inv(16)/t(16;16) có tiên lượng tốt với tỷ lệ đạt lui bệnh cao và thời gian sống kéo dài (hơn 50% bệnh nhân). Sự chuyển đoạn xảy ra ít hơn 10% ở bệnh nhân lớn hơn 60 tuổi bệnh BCCDT mới.



Hình 1.1. Những dạng bản mã của tổ hợp gen *CBFB/MYH11* [22], [109]