

NGHIÊN CỨU SỰ BIẾN ĐỔI BIỂU HIỆN GEN GIỮA UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG CÓ DI CĂN HẠCH VÀ KHÔNG DI CĂN HẠCH BẰNG PHƯƠNG PHÁP MICROARRAY

*Lê Quang Minh**; *Hoàng Văn Lương***; *Triệu Tiến Sang***
*Trần Văn Khoa***; *Nguyễn Duy Bắc***

TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá và so sánh biểu hiện gen trên 7 mẫu mô từ bệnh nhân (BN) ung thư đại trực tràng (UTĐTT) có di căn hạch và 32 mẫu mô từ BN UTĐTT không di căn hạch được xác chẩn qua sinh thiết sau phẫu thuật nhằm đánh giá biến đổi biểu hiện gen giữa hai loại. Tách chiết ARN tổng số từ mô ung thư và mô lành. Tổng hợp cADN, ARN, tinh sạch ARN sử dụng bộ kit Ambion Illumina TotalPrep RNA Amplification theo quy trình của nhà sản xuất. Lai cARN lên chip sử dụng Sentrix^(R)BeadChip HumanRef-8_V2, Illumina (Mỹ), 22.185 gen. Rửa và phát hiện tín hiệu bằng Stepavidin-Cy3. Quét hình ảnh lai cARN trên chip trên hệ thống Illumina Bead array reader, Bead Station 500X. Phân tích kết quả thu được bằng phần mềm Beadstudio V1.5.1.3 và phần mềm trực tuyến DAVID. Kết quả cho thấy: 17 gen tăng biểu hiện và 5 gen giảm biểu hiện ở mô ung thư có di căn hạch so với mô ung thư chưa có di căn hạch ($p < 0,05$).

* Từ khóa: Ung thư đại trực tràng; Microarray.

STUDY ON GENE EXPRESSION CHANGES IN LYMPH NODE - POSITIVE AND LYMPH NODE - NEGATIVE COLORECTAL CANCER USING MICROARRAY METHOD

SUMMARY

The study was carried out in 7 lympho node-positive colorectal cancer tissues and 32 lympho node negative colorectal cancer tissues, confirmed by biopsy analysis after operation with a view of evaluating gene expression changes of the two kinds. Total RNA were extracted from the 62 samples. cDNA, RNA, were syntherized and purified using Ambion Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit, according to manufacture's procedure. cRNA were hybridized with oligonucleotide probes on Sentrix^(R)BeadChip HumanRef-8_V2, Illumina, USA, 22,185 genes. After washing, signal was detected with Stepavidin-Cy3. Scanning and getting image carried out on Illumina Bead array reader, Bead Station 500X. Analysis of the obtained data was done with Beadstudio V1.5.1.3 and online DAVID software. The rerults showed 17 up - regulated genes and 5 down - regulated genes in lympho node-positive colorectal cancer tissues in comparision with lympho node - negative colorectal cancer tissues ($p < 0.05$).

* Key words: Colorectal cancer; Microarray.

* Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Nam

** Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Lê Trung Hải

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng là bệnh thường gặp, mỗi năm trên thế giới có 900.000 người mắc và 500.000 người chết vì UTĐTT. Để đạt được hiệu quả điều trị tốt, cần xác định chính xác giai đoạn bệnh. Điều này giúp có chiến lược điều trị thích hợp và tiên lượng chính xác thời gian sống thêm đối với BN. Hiện nay, các nước tiên tiến đang ứng dụng công nghệ microarray để nghiên cứu các biến đổi biểu hiện gen ở những tình trạng bệnh lý khác nhau của UTĐTT. Ở Việt Nam, hiện chưa có công trình nghiên cứu nào về vấn đề này, vì thế chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm đánh giá biến đổi biểu hiện gen ở UTĐTT có di căn hạch và UTĐTT không di căn hạch bằng phương pháp microarray.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

39 BN UTĐTT được phẫu thuật tại Bệnh viện K từ 11 - 2007 đến 4 - 2010.

* *Tiêu chuẩn chọn BN:* BN được chẩn đoán xác định UTĐTT bằng mô bệnh học, lấy mô ở trung tâm khối u, khối lượng 5 - 10 g/mẫu. Mô sau khi lấy được bảo quản ngay trong bình ni tơ lỏng -80°C cho tới khi tách chiết ARN.

* *Tiêu chuẩn loại trừ:* BN đã được hóa trị và hoặc xạ trị trước phẫu thuật.

2. Hóa chất và thiết bị.

- Hóa chất: hóa chất tách chiết ARN, hóa chất cho PCR và RT-PCR, hóa chất dùng cho tinh sạch cADN và cARN, hóa chất dùng cho điện di, hóa chất dùng cho lai cARN lên chip (hóa chất huỳnh quang Cy3, nước cất tinh sạch deion, Sentrix BeadChip HumanRef 8_v2-Illumina, Mỹ).

- Thiết bị: máy nhân gen ABI, 9700, Bead array 500X (Illumina, Mỹ).

3. Phương pháp nghiên cứu.

Phương pháp tách chiết ARN tổng số từ mô sử dụng bộ kit tách chiết ARN của hãng Ambion theo quy trình của nhà sản xuất. Nghiền mẫu bằng máy nghiền đồng thể trong nito lỏng. Dụng cụ trước khi dùng được tráng dung dịch nước không có ARNase, dung dịch chống ARNase - DETC, NaOH 0,1 M và EDTA 1 M. Tổng hợp, tinh sạch cADN, phiên mã sang cARN, tinh sạch cARN sử dụng bộ kit Ambion Illumina TotalPrep RNA Amplification theo quy trình của nhà sản xuất. Quá trình tổng hợp được thực hiện trên hệ thống thống máy nhân gen ABI 9700, bao gồm: tổng hợp sợi thứ nhất sử dụng 50 - 500 ng ARN mẫu ở 42°C trong 2 giờ, tổng hợp sợi thứ hai ở 16°C trong 2 giờ, tổng hợp cARN ở 37°C. Tính toán các thành phần phản ứng tổng hợp cADN, cARN theo địa chỉ website trực tuyến: www.ambion.com/tools/illumina [7]. Kết thúc mỗi bước trên, để ngay mẫu vào trong đá và để ở tủ lạnh -20°C.

Định lượng nồng độ ARN trên hệ thống Nano - Drop trước khi thực hiện phản ứng lai. Lai cARN lên chip Sentrix BeadChip HumanRef 8_v2-Illumina (Mỹ), cho biểu hiện của 22.185 gen trong bộ gen người. Dùng đồng nhất lượng 1,5 µg ARN cho mỗi mẫu cùng GEX-HYB, nước cất không có ARNase, GEX-HCB tại điều kiện 58°C trong lò lai, thời gian 16 - 20 giờ. Rửa chip sau khi lai qua các bước ủ ở nhiệt độ phòng, rửa ở nhiệt độ cao, rửa ở nhiệt độ phòng lần một, rửa với cồn ethanol; rửa ở nhiệt độ phòng lần hai, dùng phản ứng, phát tín hiệu bằng

Stepavidin-Cy3; rửa ở nhiệt độ phòng lần ba, ly tâm và làm khô ở nhiệt độ phòng. Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bảo quản chip cho tới khi scan. Hình ảnh lai cARN trên chip bằng hệ thống Illumina Bead array reader, Bead Station 500X. Hình ảnh kết quả thu được là tín hiệu huỳnh quang của các gen trên chip. Phân tích kết quả thu được bằng phần

mềm Beadstudio V1.5.1.3 và phần mềm trực tuyến DAVID. Mã hóa hình ảnh kết quả thu được trên các file có đuôi .idat; .dmap; locs. Đưa các file kết quả này vào phần mềm BeadstudioV1.5.1.3 và phần mềm trực tuyến DAVID [7]. So sánh biểu hiện gen giữa UTĐTT không di căn hạch và di căn hạch thông qua mô UTĐTT không di căn hạch và di căn hạch.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

So sánh biểu hiện gen giữa mô ung thư có di căn và mô ung thư không di căn (độ khác biệt > 3 lần và mức ý nghĩa $p < 0,01$) thấy 17 gen tăng biểu hiện.

Bảng 1: Kết quả gen tăng biểu hiện gen giữa UTĐTT không di căn và UTĐTT di căn hạch.

MÃ GEN	KÝ HIỆU GEN	TÊN GEN THEO QUỐC TẾ	NST	CHỨC NĂNG	TĂNG (LẦN)
ILMN_30180	SRY	SRY (sex determining region Y)-box 8	16p13.3	Chuyển hóa, xử lý tế bào, điều hòa phát triển, điều hòa sinh học	3,25
ILMN_8635	WDR72	WD repeat domain 72	15q21.3	Mã hóa cho protein WDR72. Đột biến gen này làm amelogenin không hoàn chỉnh dẫn đến suy giảm khả năng trưởng thành ở người	4,56
ILMN_29852	AMY1a AMY1B AMY1C	Amylase, alpha 1A, 1B, 1C (salivary)	1p21	Chuyển hóa	3,10
ILMN_27187	BMP4	Bone morphogenetic protein 4	14q22-q23	Sinh sản, miễn dịch, điều hòa sinh học, con đường tín hiệu Hedgehog, con đường tín hiệu TGF-beta, con đường phát sinh ung thư, ung thư tế bào đệm	3,61
ILMN_1644	COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1	1p21	Chuyển hóa, bám dính sinh học, phát triển, đáp ứng kích thích, kết dính trung tâm, tương tác thụ thể ECM	3,32
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)

ILMN_11097	DUSP4	Dual specificity phosphatase 4	8p12-p11	Chuyển hóa, đáp ứng kích thích, điều hòa sinh học, con đường tín hiệu MAPK	4,93
ILMN_9965	FOXQ1	Forkhead box Q1	6p25	Chuyển hóa, phát triển, điều hòa sinh học	3,10
ILMN_16009	FZD10	Frizzled homolog 10 (Drosophila)	12q24.33	Phát triển, điều hòa sinh học, con đường tín hiệu WNT, con đường phát sinh ung thư, UTĐTT, ung thư tế bào đệm	7,61
ILMN_2247	IL8	Interleukin 8	4q13-q21	Lão hóa, ung thư, miễn dịch, điều hòa sinh học, tương tác thụ thể Cytokine-cytokine, tham gia vào một số đường truyền tín hiệu	5,22
ILMN_14182	MED1	Mediator complex subunit 1	17q12-q21.1	Ung thư, chuyển hóa, miễn dịch, điều hòa sinh học	3,59
ILMN_25981	MSLN	Mesothelin	16p13.3	Xử lý tế bào, kết dính sinh học, kết dính tế bào	6,66
ILMN_6045	PCCA	Propionyl Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	13q32	Chuyển hóa	4,51
ILMN_9394	SPP1	Secreted phosphoprotein 1	4q21-q25	Ung thư, chuyển hóa, kết dính sinh học điều hòa sinh học kết dính trung tâm, tương tác thụ thể ECM, con đường tiếp nhận tín hiệu Toll-like	3,92
ILMN_13769	SPINK4	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 4	9p13.3	Miễn dịch	6,06
ILMN_10210	SERPINB1	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	6p25	Mã hóa cho protein serpinB1, protein này ức chế men elastaza của bạch cầu	4,10
ILMN_25089	TESC	Tescalcin	12q24.22	Điều hòa sinh học	3,30
ILMN_14896	WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11	11q13.5	Con đường tín hiệu WNT con đường tín hiệu Hedgehog, tạo melanin, cơ chế phát sinh ung thư, ung thư tế bào đệm	5,54

Hầu hết gen đều có chức năng liên quan đến chuyển hóa, điều hòa sinh học, truyền tín hiệu và tương tác, kết dính tế bào.

Bảng 2: Kết quả gen giảm biểu hiện giữa UTĐTT có di căn hạch và không di căn hạch (sự khác biệt < 2 lần và $p < 0,01$).

MÃ GEN	KÝ HIỆU GEN	TÊN GEN THEO QUỐC TẾ	NST	CHỨC NĂNG	TẦNG (LẦN)
ILMN_22855	ITIH1	Inter-alpha (globulin) inhibitor H1	1p36.12	Chu trình tế bào, cần cho định vị cấu trúc tâm động của BUB1	2,51
ILMN_28594	MGP	Matrix G1a protein	12p13.1-p12.3	Chuyển hóa, điều hòa tế bào	5,35
ILMN_174859	PRSS8	Prostasin protease	11q23	Chuyển hóa, phản ứng kích thích, mã hóa trypsinogen	3,17
ILMN_5562	BUB3	Mitotic spindle checkpoint protein	10q26	Chuyển hóa, điều hòa tế bào, mã hóa cho 1 protein liên quan đến kiểm soát phân bào	2,53
ILMN_4960	TPP2	Tripeptidyl peptidase II	13q32-q33	Chuyển hóa, mã hóa cho peptidase, ở pH trung tính	3,24

Các gen đều liên quan đến quá trình chuyển hóa và điều hòa chu trình tế bào.

BÀN LUẬN

1. Gen tăng biểu hiện giữa nhóm UTĐTT có di căn hạch và không di căn hạch.

Kết quả nghiên cứu về biến đổi gen của UTĐTT giữa nhóm không di căn và nhóm di căn cho thấy: 17 gen tăng biểu hiện > 3 lần, với $p < 0,01$. Hầu hết gen liên quan đến chuyển hóa, điều hòa sinh học, truyền tín hiệu và tương tác, kết dính tế bào. So sánh với một số nghiên cứu khác về số lượng gen biến đổi: Bertucci và CS [1] xác định 46 gen để phân biệt giữa UTĐTT có di căn hạch và chưa di căn hạch và 244 gen có giá trị phân biệt Dukes D và Dukes A-C. Trong số gen có biểu hiện khác biệt, 219 gen giảm điều hòa và 25 gen tăng điều hòa. Frederiksen C.M. nghiên cứu > 5.000 gen của đại tràng xích ma và đại tràng trái, 5 mẫu từ niêm mạc bình thường và 5 mẫu từ mô ung thư thuộc các giai đoạn A, B, C, D, kết luận: có thể phân loại giai đoạn Dukes B và Dukes C với sai số < 20% [3]. Grade M và CS (2007) nghiên cứu 73 khối u, xác định 68 gen khác biệt có ý nghĩa giữa UTĐTT chưa di căn hạch và di căn hạch ($p < 0,001$) [4]. Những gen này chủ yếu tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch tế bào [3]. Kwon H.C và CS (2004) phân tích biểu hiện gen từ 12 khối u dùng phương pháp microarray, xác định khoảng 60 gen có thể hỗ trợ cho di căn hạch [5]. Croner M.D (2008) nghiên cứu 40 mẫu UTĐTT giai đoạn UICC I, II, 40 mẫu giai đoạn UICC III và 25 mẫu niêm mạc bình thường, phát hiện 50 gen có sự khác biệt, trong đó 40 gen tăng biểu hiện và 10 gen giảm biểu hiện [2]. Đó là những gen có chức năng kết dính tế bào, vận chuyển, truyền tín hiệu, chuyển hóa, tổng hợp protein, kiểm soát biểu hiện gen và hệ thống miễn dịch [2].

Về một số gen được phát hiện trong nghiên cứu:

Gen *SRY* (sex determining region Y) - box 8: có chức năng tham gia vào quá trình chuyển hóa, xử lý tế bào, điều hòa phát triển, điều hòa sinh học, trong nhóm gen này có thể dựa vào thay đổi biểu hiện *SOX2* và *SOX17* để phân biệt giữa tiền ung thư và ung thư biểu mô, khác biệt có giá trị chẩn đoán [6].

Gen *MED1* (mediator complex subunit 1): có chức năng tham gia quá trình phát sinh ung thư, chuyển hóa, miễn dịch, điều hòa sinh học, điều hòa chết tế bào theo chương trình, phụ thuộc p53 [6].

Gen *FZD10* (rizzled homolog 10): có chức năng liên quan đến điều hòa sinh học, phát triển tế bào, phát sinh ung thư, UTĐTT, ung thư tế bào đệm [6].

Gen *SPP1* (secreted phosphoprotein 1): vị trí trên nhiễm sắc thể 4q21-q25, kết quả nghiên cứu thấy tăng biểu hiện 3,92 lần. Chức năng tham gia vào quá trình chuyển hóa, ung thư, kết dính sinh học, điều hòa sinh học, kết dính trung tâm, tương tác thụ thể ECM và tham gia vào con đường tiếp nhận tín hiệu Toll-like [6].

Một số gen khác cũng tăng biểu hiện như *TESC*, là một yếu tố truyền tín hiệu, tham gia vào khung xương tế bào và phân chia tế bào, phân ly nhiễm sắc thể, điều hòa sinh học, điều hòa kết dính tế bào.

2. Gen giảm biểu hiện giữa nhóm UTĐTT di căn hạch và không di căn hạch.

Với sự khác biệt nhau về mức độ giảm biểu hiện gen < 2 lần, $p < 0,05$, chúng tôi phát hiện có 5 gen giảm biểu hiện ở trường hợp UTĐTT có di căn hạch so với không di căn hạch. Tất cả các gen này đều liên quan đến quá trình chuyển hóa.

Gen *ITIH1* (Inter-alpha inhibitor H1): vị trí trên nhiễm sắc thể 1p36.12, mức độ giảm biểu hiện 2,51 lần, có chức năng tham gia vào chu trình tế bào [6].

Gen *MGP* (Matrix G1a protein): vị trí trên nhiễm sắc thể 12p13.1-p12.3, mức độ giảm biểu hiện 5,35 lần, có chức năng tham gia mã hóa cho protein matrix G1a. Gen này cũng giảm biểu hiện, nhiều khi có di căn hạch trong ung thư đường tiết niệu [6].

Gen *PRSS8* (Prostasin protease): vị trí trên nhiễm sắc thể 11q23, mức độ giảm biểu hiện 3,17, có chức năng tham gia chuyển hóa, phản ứng kích thích, mã hóa trypsinogen, mã hóa cho prostasin serine protease. Gen này ức chế khả năng xâm lấn, được phát hiện thấy giảm biểu hiện trong di căn ung thư do có liên quan đến khả năng xâm lấn [6].

Gen *BUB3* (Mitotic spindle checkpoint protein): có chức năng chuyển hóa, điều hòa chu trình tế bào, mã hóa cho 1 protein liên quan đến kiểm soát phân bào mã hóa cho protein tham gia vào điểm kiểm soát thoi phân bào. Protein này tương tác với *APC* để điều hòa sự phân ly của nhiễm sắc thể trong quá trình phân chia tế bào. Sự suy giảm chức năng kiểm soát điểm phân bào, trong đó đột biến *BUB3* liên quan đến UTĐTT [6].

Gen *TPP2* (Tripeptidyl peptidase II): có chức năng quan trọng trong thoái biến protein liên quan tới khả năng xâm lấn và di căn.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu biến đổi biểu hiện gen của 7 trường hợp UTĐTT có di căn hạch và 32 trường hợp không di hạch, chúng tôi đi đến một số kết luận sau:

17 gen tăng biểu hiện trong UTĐTT có di căn hạch so với không di căn hạch. Các gen này có chức năng liên quan đến chuyển hóa, điều hòa sinh học, truyền tín hiệu và tương tác, kết dính tế bào. Điển hình: gen *FZD10* tăng 7,61 lần, *MSLN* tăng 6,66 lần, *SPINK4* tăng 6,06 lần, *WNT11* tăng 5,54 lần, *IL 8* tăng 5,22 lần.

5 gen giảm biểu hiện ở UTĐTT có di căn hạch so với không di căn hạch: gen *ITIH1*, *MGP*, *PRSS8*, *BUB3* và *TPP2*. Tất cả các gen này có chức năng liên quan đến quá trình chuyển hóa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bertucci F., Salas S., Eyster S. et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histological parameters. *Oncogene*. 2004, 23, pp.1377-1391.

2. Croner R.S., Fortsch T., Brucki W.M. et al. Molecular signature for lymphatic metastasis in colorectal carcinomas. *Ann Surg*. 2008, 247, pp.803-810.

3. Frederiksen C.M., Knudsen S., Laurber S. et al. Classification of Dukes B and C colorectal cancers using expression arrays. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003, 129, pp.263-271.

4. Grade M., Horman P., Beck S. et al. Gene expression profiling reveals a massive, aneuploidy - dependent transcriptional deregulation and distinct differences between lymph node - negative and lymph node - positive colon carcinomas. *Cancer Res*. 2007, 67, pp.41-56.

5. Kwon H.C., Kim S.H., Roh M.S. et al. Gene expression profiling in lymph node - positive and lymph node - negative colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007, 47, pp.141-152.

6. <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

7. <http://www.ambion.com/tools/illumina>