

NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN GIẢM ĐIỀU HOÀ GEN TRONG MÔ UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG BẰNG CÔNG NGHỆ MICROARRAY

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

TÓM TẮT

Nghiên cứu tiến hành đánh giá và so sánh biểu hiện gen trên 62 mẫu mô từ bệnh nhân (BN) ung thư đại trực tràng (UTĐTT) được xác chẩn qua sinh thiết sau phẫu thuật, trong đó có 39 mẫu mô ung thư và 23 mẫu mô tổ chức xa khối u. Tách chiết ARN tổng số từ mô ung thư và mô lành. cADN, ARN, được tổng hợp, tinh sạch RNA sử dụng bộ kit Ambion Illumina TotalPrep ARN Amplification Kit theo quy trình của nhà sản xuất. Lai cARN lên chip sử dụng Sentrix^(R)BeadChip HumanRef-8_V2, Illumina, Mỹ, 22185 gen. Rửa và phát hiện tín hiệu bằng Stepavidin-Cy3. Scan hình ảnh lai cARN trên chip của hệ thống trên hệ thống Illumina Bead array reader, Bead Station 500X. Phân tích kết quả bằng phần mềm Beadstudio V1.5.1.3 và phần mềm trực tuyến DAVID. So sánh biểu hiện gen được giữa các mẫu mô ung thư và mẫu mô xa tổ chức ung thư - mô lành. Kết quả phát hiện 43 gen giảm biểu hiện ở mô ung thư so với mô lành ($p < 0,01$).

* Từ khóa: Ung thư đại trực tràng; Công nghệ microarray.

STUDY ON DOWN-REGULATED GENES IN COLORECTAL CANCER TISSUE USING MICROARRAY TECHNOLOGY

SUMMARY

The study was carried out on 62 tissue samples, including 39 tumor tissue and 23 normal tissue samples from colorectal cancer patients, confirmed by biopsy analysis after operation. Total RNA were extracted from the 62 samples. cDNA, RNA, were synthesized and purified using Ambion Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit, according to manufactures procedure. cRNA were hybridized with oligonucleotide probes on Sentrix^(R)BeadChip HumanRef-8_V2, Illumina, USA, 22185 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 with Beadstudio V1.5.1.3 and online DAVID software. The results showed 43 down-regulated genes in tumor tissues in comparison with the normal ones of same type ($p \leq 0,01$).

* Key words: Colorectal cancer; Microarray technology.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây tỷ lệ mới mắc ung thư đại -trực tràng (UTĐTT) tăng nhanh ở nước ta từ 9,2 lên 11, 8/100.000 ở nam giới và từ 6, 4 lên 8,3/100.000 ở nữ giới từ 1990

đến 2002. Năm 2002 cả nước có 6.029 BN mới mắc UTĐTT.

Là một bệnh diễn biến thầm lặng, triệu chứng nghèo nàn và thường lẫn với các triệu chứng rối loạn cơ năng và thực thể của các

* Học viện Quân y

** Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Nam

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

bệnh lý đường tiêu hoá khác nên ít được chú ý, dễ bỏ qua, biểu hiện rõ hơn khi bệnh đã nặng. Mặc dù hiện nay có nhiều phương

pháp chẩn đoán hiện đại, nhưng tỷ lệ phát hiện UTĐTT sớm vẫn rất thấp.

Ở nước ta, cho đến nay mới chỉ đề cập đến biến đổi một vài gen riêng lẻ, chưa có một công trình nào nghiên cứu cách có hệ thống và đầy đủ về biến đổi gen trong UTĐTT cũng như mối liên quan của biến đổi này với đặc điểm lâm sàng, nội soi, mô bệnh học. Xuất phát từ thực tế đó chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục tiêu:

Khảo sát sự biểu hiện của các gen trong genome người trong tổ ở UTĐTT bằng kỹ thuật microarray.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Từ 1 - 2008 đến 12 - 2009 nghiên cứu trên 62 mẫu mô gồm 39 mẫu tổ chức ung thư và 23 mẫu tổ chức xa khối u (mô lành). BN đều được được khám, nội soi, sinh thiết, phẫu thuật, xét nghiệm mô bệnh học tại Bệnh viện K TW và chẩn đoán xác định là UTĐTT. Lấy mô lấy từ trung tâm khối u và tổ chức mô cùng loại xa khối u trong phẫu thuật. Khối lượng: 5-10g/mẫu. Mô sau khi lấy, được bảo quản ngay trong bình nitơ lỏng và lưu trong tủ lạnh -80°C cho tới khi tách chiết ARN.

Loại trừ các trường hợp: BN có kết quả giải phẫu bệnh không xác định ung thư, BN u lành, viêm mãn tính, lao ruột, UTĐTT đã điều trị bằng tia xạ, hoá chất trước phẫu thuật.

2. Hoá chất và thiết bị.

Các hoá chất bao gồm: hoá chất tách chiết ARN, hoá chất cho PCR và RT-PCR, hoá chất dùng cho tinh sạch cADN và cARN, hoá chất dùng cho điện di, hoá chất dùng cho lai cARN lên Chip (hoá chất huỳnh quang Cy3, nước cất tinh sạch deion, Sentrix^(R)

BeadChip HumanRef-8_V2, Illumina, Mỹ.). Thiết bị máy móc: máy nhân gen ABI, 9700, Bead array 500X, Illumina.

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. Quá trình nghiền mẫu được tiến hành bằng máy nghiền đồng thể trong nitơ lỏng. Dụng cụ trước khi dùng được tráng các dung dịch nước không có ADNase, ARNase, dung dịch chống ARNase DETC, NaOH 0,1M và EDTA 1M. Tổng hợp, tinh sạch cADN, phiên mã sang ARN, tinh sạch ARN sử dụng bộ kit Ambion Illumina TotalPrep ARN Amplification Kit theo quy trình của nhà sản xuất. Quá trình tổng hợp nói trên thực hiện trên hệ thống máy nhân gen ABI 9700. Bao gồm tổng hợp sợi thứ nhất sử dụng lượng RNA mẫu 50 - 500ng ở điều kiện 42°C trong 2 giờ. Tổng hợp sợi thứ hai trong điều kiện 16C trong 2 giờ. Tổng hợp cARN trong điều kiện 37°C. Ngay sau khi kết thúc mỗi bước, cho mẫu ngay vào trong đá và chuyển vào tủ lạnh -20C.

Định lượng nồng độ ARN trên hệ thống Nano-Drop trước khi thực hiện phản ứng lai.

Lai cARN lên chip sử dụng Sentrix^(R) BeadChip HumanRef-8_V2, Illumina, Mỹ, cho biểu hiện của 22.185 gen trong bộ gen người. Dùng đồng nhất lượng là 1,5g ANA cho mỗi mẫu cùng GEX-HYB, nước cất không có ARNase, GEX-HCB tại điều kiện 58C trong lò lai 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 1, rửa với cồn ethanol, rửa ở nhiệt độ phòng lần 2, dùng phản ứng. Phát hiện tín hiệu bằng Stepavidin-Cy3, rửa ở nhiệt độ phòng lần 3, 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. Scan hình ảnh lại cARN trên chip trên 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. Hình ảnh kết quả thu được sẽ

được mã hóa trên các file có đuôi .idat; .dmap; .locs. Kết quả file này sẽ được đưa vào phần mềm Beadstudio V1.5.1.3 và phần mềm trực tuyến DAVID để phân tích. So sánh Biểu hiện gen được so sánh giữa các mẫu mô ung thư và mẫu mô xa tổ chức ung thư - mô lành.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Sau khi phân tích toàn bộ bộ gen người chúng tôi nhận thấy các gen giữa các mẫu ung thư và mẫu lành khác nhau có ý nghĩa thống kê với $p \leq 0,05$: 3727 gen biểu hiện cao và 285 gen biểu hiện thấp. Với mức ý nghĩa $p \leq 0,01$, số lượng gen biểu hiện cao

khi so sánh gen của mô bệnh và mô lành là 539 gen biểu hiện cao và 113 gen biểu hiện thấp. Dưới đây là 43 gen có sự giảm biểu hiện với mức khác biệt giữa mô lành và mô bệnh có ý nghĩa thống kê với $p \leq 0,01$.

Bảng 1: Các gen giảm biểu hiện với mức ý nghĩa thống kê là $p \leq 0,01$

| Mã số | Ký hiệu gen | Ký hiệu khác | Mức tín hiệu MB | Mức tín hiệu ML | Tỷ lệ tín hiệu MB/ML | p |
|------------|-------------|--|-----------------|-----------------|----------------------|--------|
| ILMN_5070 | MYH11 | AAT4; FAA4; SMHC; SMMHC; MGC32963; MGC126726; DKFZp686D10126 | 3250.87 | 6052.27 | 1.86 | 0,0011 |
| ILMN_13364 | ACTG2 | ACT; ACTE; ACTA3; ACTL3; ACTSG | 4554.34 | 7097.34 | 1.56 | 0,0034 |
| ILMN_22618 | TPM2 | DA1; TMSB; AMCD1 | 3017.64 | 4846.48 | 1.61 | 0,0033 |
| ILMN_8970 | ALDOB | | 214.52 | 1837.29 | 8.56 | 0,0039 |
| ILMN_13726 | LTA4H | | 1007.24 | 2361.70 | 2.34 | 0,0006 |
| ILMN_6391 | FLNC | ABPA; ABPL; FLN2; ABP-280; ABP280A | 1455.47 | 2467.39 | 1.70 | 0,0087 |
| ILMN_28166 | GUCA2A | GUCA2; STARA; GUANYLIN | 727.58 | 1683.42 | 2.31 | 0,0005 |
| ILMN_23504 | APOA1 | MGC117399 | 66.32 | 978.34 | 14.75 | 0,0046 |
| ILMN_20117 | TPM2 | DA1; TMSB; AMCD1 | 1471.07 | 2343.86 | 1.59 | 0,0037 |
| ILMN_9286 | APOB | FLDB | 61.59 | 918.32 | 14.91 | 0,0023 |
| ILMN_18109 | RBPMS2 | | 544.01 | 1218.06 | 2.24 | 0,0030 |
| ILMN_415 | CALD1 | CDM; H-CAD; L-CAD; NAG22; MGC21352 | 921.23 | 1541.02 | 1.67 | 0,0076 |
| ILMN_11273 | MS4A10 | MS4A9; CD20L7; FLJ16054 | 54.60 | 559.27 | 10.24 | 0,0033 |
| (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) |
| ILMN_11785 | AQP8 | | 277.34 | 781.28 | 2.82 | 0,0060 |
| ILMN_20358 | SLC7A9 | CSNU3 | 57.73 | 534.90 | 9.26 | 0,0027 |

| | | | | | | |
|-----------------|----------|--|--------|--------|------|--------|
| ILMN_6712 | MEP1A | PPHA | 402.64 | 870.57 | 2.16 | 0,0042 |
| ILMN_10700 | PGM5 | PGMRP | 319.47 | 745.33 | 2.33 | 0,0006 |
| ILMN_16910 | VIP | PHM27; MGC13587 | 416.69 | 841.80 | 2.02 | 0,0039 |
| ILMN_4236 | APOC3 | APOCIII | 59.01 | 446.92 | 7.57 | 0,0043 |
| ILMN_136952 | SORBS1 | CAP; FLAF2; R85FL; SH3D5; SORB1; SH3P12; FLJ12406; KIAA1296; DKFZp586P1422 | 550.85 | 921.09 | 1.67 | 0,0079 |
| ILMN_22078 | MYOM1 | SKELEMIN | 301.70 | 653.18 | 2.17 | 0,0022 |
| ILMN_29799 | HAND1 | Hxt; eHand; Thing1 | 203.54 | 551.40 | 2.71 | 0,0007 |
| ILMN_8647 | C1orf24 | NIBAN | 307.87 | 648.66 | 2.11 | 0,0024 |
| ILMN_29524 | MYL9 | LC20; MLC2; MRLC1; MYRL2; MGC3505 | 310.25 | 630.63 | 2.03 | 0,0065 |
| ILMN_22149 | FLJ21986 | | 298.28 | 606.08 | 2.03 | 0,0030 |
| ILMN_14208 | MTTP | ABL; MTP | 86.50 | 391.88 | 4.53 | 0,0020 |
| ILMN_6255 | SVIL | DKFZp686A17191 | 482.38 | 760.85 | 1.58 | 0,0064 |
| ILMN_1597 | PNCK | CaMK1b; MGC45419 | 226.82 | 488.28 | 2.15 | 0,0031 |
| ILMN_14465 | EPB41L3 | 4.1B; DAL1; DAL-1; KIAA0987 | 399.79 | 658.06 | 1.65 | 0,0026 |
| ILMN_29392 | CNN1 | SMCC; Sm-Calp | 263.44 | 517.57 | 1.96 | 0,0044 |
| ILMN_4152 | MAB21L2 | FLJ31103 | 198.27 | 440.03 | 2.22 | 0,0025 |
| ILMN_16841 | TMIGD | UNQ9372 | 113.70 | 342.46 | 3.01 | 0,0001 |
| ILMN_7975 | FHL1 | FHL1B; KYO-T; SLIM1; MGC111107; bA535K18.1 | 235.50 | 454.52 | 1.93 | 0,0029 |
| ILMN_13440 | MGC13057 | | 201.20 | 416.86 | 2.07 | 0,0013 |
| ILMN_23162 | MATN2 | | 311.32 | 524.93 | 1.69 | 0,0035 |
| ILMN_25295 | JAM3 | JAMC; JAM-C; FLJ14529 | 286.41 | 498.51 | 1.74 | 0,0035 |
| ILMN_23211 | PDK4 | | 201.39 | 405.01 | 2.01 | 0,0007 |
| ILMN_15063 | C7 | | 121.99 | 322.72 | 2.65 | 0,0005 |
| ILMN_11285 | TP53 | | 343.21 | 876.56 | 2.55 | 0,0022 |
| ILMN_13836 5 | AHR | | 121.32 | 897.89 | 7.40 | 0,0007 |
| ILMN_14614 | CYP1B1 | | 354.27 | 456.67 | 1.29 | 0,0024 |
| ILMN_4380 | CYP1A1 | | 111.23 | 763.78 | 6.87 | 0,0065 |
| ILMN_8603 | BRF1 | | 211.9 | 798.09 | 3.77 | 0,003 |

Trong số những gen giảm biểu hiện với tỷ lệ giảm từ 1,29 đến 14,91 lần ở mô ung thư so với mô lành, một số gen liên quan ung thư [1, 2, 4].

Gen BRF1 còn có tên gọi khác là TFIIIB90, hTFIIIB90. Nằm trên nhiễm sắc thể 14, là gen mã hóa cho ba tiểu phần của phức hợp yếu tố phiên mã ARN polymerase III.

Phức hợp này đóng vai trò quan trọng trong sự khởi đầu phiên mã bởi ARN polymerase III trên gen mã tARN, 5S rARN và các sARN cấu trúc khác. Liên quan tới sự nhân lên của tế bào trong chu trình tế bào. Gen AHR (aryl hydrocarbon receptor) là gen mã hóa cho yếu tố phiên mã hoạt hóa đích liên quan đến điều hòa của các phản ứng sinh hóa của các hydrocacbon thơm. Đây là một receptor điều hòa các enzyme điều hòa các chất sinh hóa như cytochrome P450, đích của nó là một loạt các hydrocacbon thơm. Gen hóa của nó nằm trên nhiễm sắc thể số 7, dài 848bp. Gen này liên quan tới phiên mã, điều hòa quá trình phiên mã từ polymerase II promoter, chết theo chương trình của tế bào, điều hòa quá trình tổng hợp các chất sinh hóa v.v. Gen CYP1A1 nằm trên nhiễm sắc thể 15 ở vị trí 15q24.1, mã hóa một số họ cytochrome P450 của enzyme. Protein cytochrome P450 là một enzyme oxy hóa xúc tác cho rất nhiều phản ứng liên quan tới sự trao đổi chất gây nghiện và tổng hợp cholesterol, steroid lipid khác. Protein này tập trung ở lưới nội chất. Gen CYP1A1 liên quan tới trao đổi hydrocacbon thơm có nhiều vòng (PAHs), một hợp chất trung gian gây ung thư.

Thành

viên của họ này là gen CYP1A2, dài khoảng 25 kb. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu về gen CYP1A1 với UTĐTT như nghiên cứu của Lakshmi Sivaraman và CS (1994). Gen TP53 là gen ức chế khối u. Protein p53 được sản xuất bởi một gen nằm trên vai dải nhiễm thể số 17 (17p13). Gen p53 mã hoá cho protein 53-kDa chứa 393 axit amin. Trong quá trình phát triển UTĐTT, đột biến gen p53 có thể xảy ra do NST mất đi của hoặc do mất tính dị hợp tử. Gen p53 cũng bị mất chức năng khi có alen bị đột biến và dường như có chức năng chủ yếu đáp ứng lại tổn thương ADN, trong pha (G1), kích thích sửa chữa ADN và thúc đẩy chết tế bào theo chương trình (apoptosis). Khi gen p53 bị đột biến, cơ chế này mất đi và các dòng tế bào có thể có thêm những đột biến khác, tiến triển ung thư. Gen p53 như là một yếu tố phiên mã, gắn vào trình tự đặc hiệu trên ADN. Đột biến có thể xảy ra tại gen p53 ở vị trí gắn ADN của ADN polymerase, làm mất chức năng. Ngoài ra, gen P53 còn liên quan đến điều hòa sinh trưởng của tế bào, giải phóng Cytochrome c ở ty thể, hoạt hóa tế bào trong phản ứng miễn dịch như tế bào T, tế bào B, điều hòa phiên mã âm của promoter ARN polymerase II, điều hòa pH và vận chuyển các protein nội bào v.v., liên quan tới một số ung thư: ung thư biểu mô tuyến thượng thận, ung thư vú, papilloma đám rối màng mạch, UTĐTT, ung thư biểu mô gan, hội chứng Li-Fraumeni, ung thư biểu mô thực quản, sarcoma xương, ung thư tụy, ung thư biểu mô tuyến giáp v.v.

Trong thực tế, nhiều tác giả sử dụng kỹ thuật nghiên cứu biểu hiện gen khác nhau như RT-PCR, Western blot, hóa mô miễn dịch, Affymetric, SAGE, Macroarray MAGIC cADNA microarray, Agilen cADN microarray, Custom cADN microarray v.v. nên thu được các kết quả

rất khác nhau. Simon và CS, 2008 đã tiến hành thống kê so sánh 25 nghiên cứu khác nhau về biểu hiện gen trong UTĐTT giữa mô ung thư và mô lành với có sự khác biệt với $p < 0,05$ cũng cho thấy có khác biệt về biểu hiện gen. Những nghiên cứu này cũng chưa phát hiện thấy biệt đáng kể giữa mô ung thư và mô u tuyến.

KẾT LUẬN

Bằng công nghệ microarray đánh giá biểu hiện gen trên 62 mẫu mô ung thư và mô lành từ BN UTĐTT chúng tôi đã phát hiện 43 gen giảm biểu hiện ở mô ung thư so với mô lành ($p \leq 0,01$) Những gen này được dùng để thiết kế chip phục vụ sàng lọc và phát hiện sớm UTĐTT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Bianchini M, Levy E, Zucchini C, et al.* Comparative study of gene expression by cDNA microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa. *Int J Oncol.* 2006, 29, pp.83-94.
2. *Cardoso J, J. Boer, H. Morreau, R. Fodde.* Expression and genomic profiling of colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007, 1775, pp.103-137.
3. *Simon K. Chan,Obi L. Griffith, Isabella T. Tai, and Steven J.M. Jones1.* Meta- analysis of colorectal cancer gene expression profiling studies codentifies consistently, Reported candidate biomarkers. *Cancer epidemiology. Biomarkers & Prevention.* 2008, pp543-552.
4. *Vogstein B, Fearon E.R, Halmiton S.R. et al.* Genetic alteraion during colorectal- tumor development. *New England Journal of Medicine.* 2008, 319, pp.525-532.
5. www.ambion.com/tools/illumina.
6. *Zou TT, Selaru FM, Xu Y, et al.* Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene.* 2002, 21, pp4855-4862.