

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN DẤU ẤN PHÂN TỬ PML-RARA Ở BỆNH NHÂN BẠCH CẦU CẤP TIỀN TỬ BÀO

Ngô Tất Trung*; Nguyễn Việt Long*

Đào Hồng Nga*; Đào Phương Giang*; Lê Hữu Song*

TÓM TẮT

Hiện nay, tại Việt nam chưa có xét nghiệm phân tử định lượng bệnh tồn dư tối thiểu dùng trong theo dõi đáp ứng điều trị bệnh bạch cầu cấp tiền tủy bào (BCCTTB). Trong khi đó, các công trình nghiên cứu đã khẳng định: biểu hiện của gen PML-RAR đặc trưng cho sự có mặt của tế bào BCCTTB. Chúng tôi thiết kế bộ mồi đặc hiệu và tiến hành định lượng mức độ biểu hiện của gen này ở những nồng độ pha loãng khác nhau. Kết quả cho thấy: xét nghiệm chúng tôi thực hiện có thể phát hiện dấu ấn PML-RARA với độ nhạy kỹ thuật 10^{-4} , độ đặc hiệu 100%. Đường chuẩn để đánh giá có tính ổn định với hệ số tương quan (RR) là 0,98.

* Từ khóa: Bạch cầu cấp tiền tủy bào; PML-RARA.

ESTABLISHMENT OF DIAGNOSTIC ASSAY FOR PML-RARA MARKER IN PATIENTS WITH ACUTE PROMYELOGOUS LEUKEMIA

SUMMARY

In Vietnam, there is currently no availability of diagnostic tool for monitoring the minimal residual disease (MRD) for acute promyelocytic leukemia (APL) patients. Therefore, setting-up a molecular diagnostic protocol for detecting and quantifying the expression level of PML-RARA is needed. To do that cell lines NB4, HT29, THP-1, K562 and HL-60 were cultured by standard conditions and combined at various ratios. 10 samples from patients with APL and 5 samples from chronic myeloid leukemia (CML) as negative control were measured PML-RARA by using Real Time PCR with Sybr Green. The result showed that the specificity and sensitivity of our assay were 100% and one malignant acute promyelogenous leukemia cell out of 10,000 healthy white blood cells, respectively. The result was reproducible and the standard curve is acceptable enough with RR = 0.98.

* Key words: Acute promyelogenous leukemia; PML-RARA.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong các phân tủy của bạch cầu tủy cấp, phân tủy M3 hay còn gọi là BCCTTB (Acute promyeleocytic leukemia - APL) có đặc trưng là dịch chuyển nhiễm sắc thể t(15;17) tương ứng với sự hình thành dạng lai ghép protein PML-RARA (hoặc RARa với

protein cấu trúc nhân tế bào). Tuy chỉ chiếm 6 - 10% tổng số ca bạch cầu tủy cấp (tương đương với 0,3 - 1,0 ca/100.000 dân/năm) nhưng phân tủy M3 lại là tủy duy nhất mà hiện nay chúng ta có thể chữa khỏi được hoàn toàn bằng phác đồ sử dụng axit retinoic (một dẫn xuất của vitamin A) liều cao kết hợp với idarubicin - AIDA protocol [1].

* Bệnh viện TWQĐ 108

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: TS. Nguyễn Đặng Dũng

Việc chẩn đoán chính xác (ở mức độ phân tử) sự có mặt của những dạng lai ghép giữa gen mã hóa axit retinoid receptor alpha và PML hay protein cấu trúc nhân tế bào khác là vô cùng cần thiết. Vì vậy, theo hướng dẫn chẩn đoán và điều trị mới nhất của các tổ chức chuyên ngành quốc tế, người ta đưa dấu ấn PML-RARA vào trong phác đồ chẩn đoán và theo dõi điều trị bệnh này [2, 3], cho thấy mức độ biểu hiện của gen ghép PML-RARA hay những biến thể của nó có độ đặc hiệu 100% trong khẳng định sự tồn tại của tế bào BCCTTB. Hơn nữa, mức độ biểu hiện của PML-RARA (xác định thông qua tỷ số PML-RARA/ABL) được dùng làm tiêu chí đánh giá mức độ đáp ứng điều trị cũng như mật độ tế bào BCCTTB và nguy cơ tái phát bệnh sau điều trị.

Mặt khác, dược phẩm axit all trans-retinoid rất đặc hiệu trong việc tiêu diệt các tế bào mang PML-RARA. Vì thế, việc chẩn đoán chính xác sự có mặt của dấu ấn này giúp bác sỹ lâm sàng cân nhắc sử dụng all trans-retinoid một cách có hiệu quả trong điều trị đích.

Tại Việt Nam, chưa có nhiều cơ sở y tế triển khai xét nghiệm tìm dấu ấn PML-RARA trong chẩn đoán bệnh BCCTTB. Một số phòng thí nghiệm trong nước tuy đã thực hiện xét nghiệm này, nhưng chỉ dừng lại ở mức định tính. Điều này không đáp ứng được yêu cầu trong theo dõi điều trị cho bệnh nhân (BN). Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: *Xây dựng quy trình phát hiện dấu ấn PML-RARA không chỉ ở mức độ định tính mà còn ở mức độ định lượng, làm cơ sở chẩn đoán và theo dõi điều trị cho BN.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu.

Dòng tế bào mang gen PML-RARA (chuẩn dương) NB4 và các dòng tế bào không mang

gen PML-RARA như HT-29, K562, HL-60, THP-1, Master-Mix Sybr Green-AB Applied Biosystems (Mỹ); máy phân tích Real Time PCR - Cydler 7500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystems; buồng đếm hồng cầu, môi trường nuôi cấy tế bào RPMI (Invitrogen) có chứa 10% huyết thanh bê, 100 mg/ml streptomycine, 100 mg/ml ampiciline, dịch tách ARN tổng số - Trizol (Invitrogen), enzym phiên mã ngược reverse transcriptase (Fermentas, CHLB Đức); kính hiển vi pha đảo Nikon Eclipse TE2000 U.

2. Đối tượng nghiên cứu.

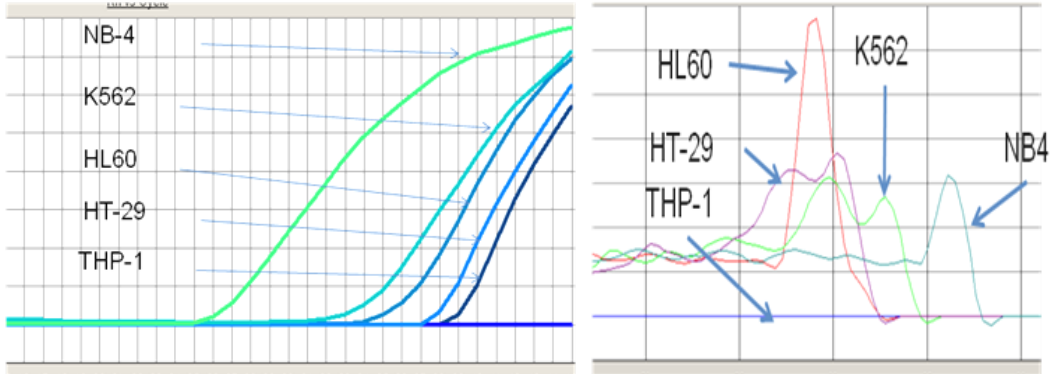
10 mẫu máu toàn phần lấy từ 10 BN BCCTTB điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai.

3. Phương pháp nghiên cứu.

Nuôi cấy các dòng tế bào theo phương pháp chuẩn, sau 4 - 7 ngày kiểm tra đạt mật độ khoảng $5 - 8 \times 10^5$ tế bào/ml thì thu hoạch. Thu gom toàn bộ tế bào (bao gồm cả tế bào chuẩn dương cho biểu hiện PML-RARA và chuẩn âm) và trộn lẫn theo tỷ lệ: 100%; 10%; 1%; 0,1%; 0,01% và 0%. Tách chiết ARN tổng số từ các mẫu trộn lẫn tế bào nói trên, tiến hành tổng hợp ADN bổ sung (cADN) bằng enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase). Các mẫu cADN được dùng làm khuôn cho phản ứng định lượng sử dụng hỗn hợp phản ứng thương mại Master-mix Sybr Green (Applied Biosystems, Mỹ) với cặp mồi đặc hiệu cho exon 1 - 2 của gen PML-RARA (trình tự mồi này sẽ được cung cấp nếu độc giả quan tâm và liên hệ với nhóm tác giả). Phân tích kết quả định tính dựa trên tín hiệu huỳnh quang qua chỉ số phổ tan chảy. Định lượng mức độ biểu hiện gen PML-RARA trên hệ thống RT-PCR (ABI 7500 Applied Biosystems, Mỹ). Đơn vị tính bằng tỷ lệ mARN PML-RARA/ABL.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

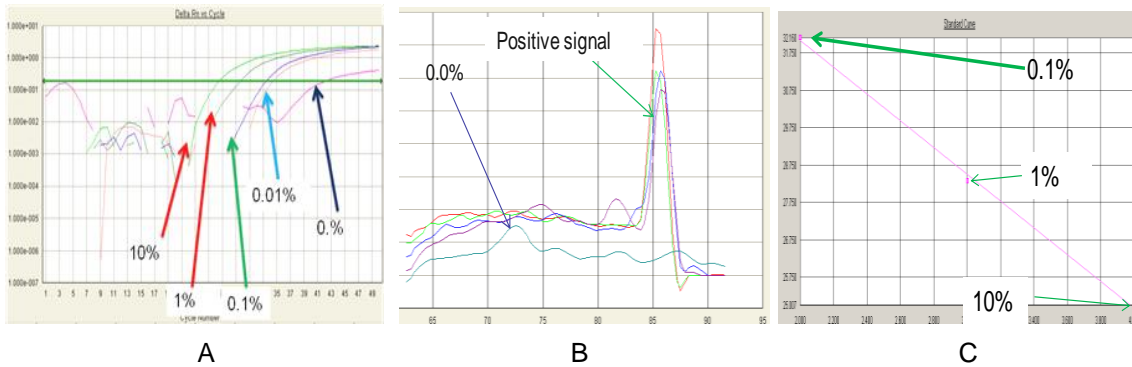
1. Độ đặc hiệu của phương pháp xác định dấu ấn phân tử PML-RARA.



Hình 1: Kết quả RT-PCR phát hiện dấu ấn phân tử PML-RARA trên tế bào BCCTTB.

Tín hiệu huỳnh quang của mẫu từ tế bào NB-4 xuất hiện sớm nhất và rất xa so với các tín hiệu từ những mẫu chứng âm (biểu đồ trái). Phân tích phổ tan chảy cho thấy, chỉ có mẫu chứng dương (NB-4) có điểm tan chảy phù hợp, trong đó, các phổ tan chảy của chứng âm (K562, HL60, HT-29 và THP-1) cho hình ảnh không điển hình, điểm tan chảy không phù hợp với lý thuyết (biểu đồ phải).

2. Độ nhạy kỹ thuật của xét nghiệm phát hiện dấu ấn PML-RARA.

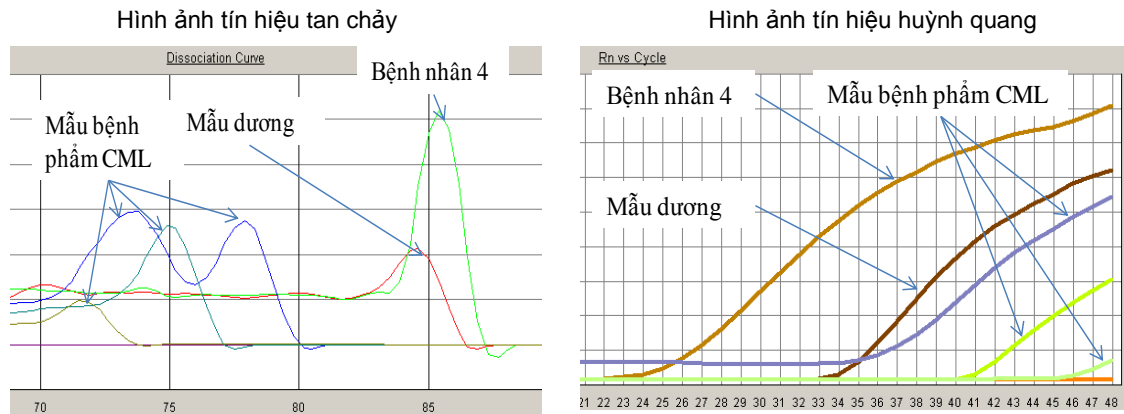


Hình 2: Đường chuẩn pha loãng xác định khả năng phát hiện dấu ấn phân tử PML-RARA (hình A tín hiệu huỳnh quang của các mẫu xét nghiệm; hình B là hình ảnh phân tích phổ tan chảy cho thấy hình ảnh đặc hiệu của các mẫu. Hình C là đường chuẩn).

Hình ảnh trên cho thấy bằng phương pháp RT-PCR, có thể phát hiện dấu ấn PML-RARA ở nồng độ rất thấp, chỉ 1 tế bào ung thư trong 10.000 tế bào bình thường (0,01%) với tương quan chặt chẽ (RR = 0,98).

3. Độ đặc hiệu của dấu ấn mARN PML-RARA trên mẫu BN.

Để khẳng định tính đặc hiệu của dấu ấn PML-RARA, chúng tôi tiến hành thử nghiệm trên 5 mẫu máu của 5 BN bạch cầu tủy mạn (dương tính với dấu ấn BCR-ABL) và 1 mẫu bệnh phẩm BCCTTB (BN 4) và 1 mẫu chuẩn.



Hình 3: Tính đặc hiệu của dấu ấn mARN PML-RARA trên mẫu BN.

Chỉ có mẫu chứng dương và mẫu BN BCCTTB có tín hiệu trên phổ tan chảy phù hợp, trong đó, 5 BN bạch cầu tủy mạn (CML) cho tín hiệu không phù hợp (*hình trái*). Tín hiệu của các mẫu chứng dương và mẫu BN BCCTTB xuất hiện sớm, mẫu CML xuất hiện muộn (*hình phải*).

4. Định lượng dấu ấn mARN PML-RARA trên BN.

Bảng 1: Nồng độ mARN PML-RARA trong máu ngoại vi của 10 BN.

Tên mẫu	PML-RARA	Tủy đồ	Tỷ số mARN PML-RARA/ABL
BN 1	Âm tính	M3	-
BN 2	Dương tính	M3	0,25
BN 3	Dương tính	M3	0,01
BN 4	Dương tính	M3	4
BN 5	Dương tính	M3	4
BN 6	Dương tính	M3	0,01
BN 7	Dương tính	M3	0,5
BN 8	Âm tính	M3	-
BN 9	Dương tính	M3	0,01
BN 10	Dương tính	M3	0,125

8/10 bệnh phẩm BCCTTB được phát hiện dương tính với dấu ấn PML-RARA. Mức độ biểu hiện gen mARN PML-RARA dao động từ 0,01 - 4, 2 mẫu âm tính với dấu ấn này.

BÀN LUẬN

Bạch cầu cấp tiền tủy bào là một phân týp hiếm gặp của bạch cầu tủy cấp (AML). Bệnh có nguy cơ tử vong cao do biến chứng đông máu. Tuy nhiên, bệnh này lại đáp ứng tốt với phác đồ điều trị đích sử dụng axit all-trans retinoid. Các kết quả nghiên cứu mới nhất cho thấy, dấu ấn mARN PML-RARA là một chỉ số giúp tiên lượng đáp ứng tốt với phác đồ điều trị đích sử dụng axit all-trans retinoid. Hơn nữa, 75 - 99% BN BCCTTB mang gen PML-RARA [4, 5]. Vì vậy, sự có mặt của gen này không những có giá trị tiên lượng điều trị, mà còn có giá trị chẩn đoán bệnh. Hướng dẫn thực hành lâm sàng mới nhất do Tổ chức Bạch cầu châu Âu (ELN) ban hành cũng yêu cầu chỉ định xét nghiệm chẩn đoán PML-RARA ngay khi BN bị nghi ngờ mắc BCCTTB [2]. Vì vậy, việc triển khai xây dựng xét nghiệm đánh giá mức độ biểu hiện dấu ấn phân tử mARN PML-RARA là nhu cầu cần thiết hiện nay. Kết quả cho thấy, công nghệ do chúng tôi xây dựng không chỉ xác định được sự có mặt của PML-RARA, mà còn định lượng dấu ấn này trong máu ngoại vi BN với độ nhạy kỹ thuật 10^{-4} , tương đương với hướng dẫn kỹ thuật do Tổ chức Bạch cầu châu Âu ban hành [6].

Để xác định độ đặc hiệu kỹ thuật của phương pháp, chúng tôi sử dụng cADN tổng hợp từ ARN tổng số của dòng tế bào chuẩn dương NB4 và dòng tế bào đối chứng âm (K562, HL-60, HT29, THP1) làm khuôn cho phản ứng RT-PCR xác định sự có mặt của PML-RARA. Kết quả hình 1 (panel trái) cho thấy, mặc dù tất cả mẫu cADN đều cho tín hiệu huỳnh quang, nhưng yếu hơn rất nhiều tín hiệu do mẫu chuẩn

dương NB4 phát ra. Ngoài ra, kết quả phân tích điểm tan chảy (*hình 1*, panel phải) cho thấy chỉ tín hiệu huỳnh quang từ mẫu NB4 đặc hiệu cho chuyển đoạn PML-RARA, trong khi đó, các tín hiệu huỳnh quang từ mẫu cADN khác là giả. Điều này cho thấy, bộ môi do chúng tôi thiết kế hoàn toàn đặc hiệu cho dấu ấn PML-RARA.

Một trong những yêu cầu kỹ thuật của xét nghiệm là phải xác định được tế bào ác tính có trong máu ngoại vi ở mật độ càng thấp càng tốt. Để có kết luận chính xác về độ nhạy kỹ thuật trong xét nghiệm chẩn đoán chuyển đoạn gen PML-RARA, chúng tôi pha loãng tế bào NB4 vào dòng tế bào đối chứng âm HL-60, các mẫu cADN tổng hợp từ ARN tổng số mẫu pha loãng này được dùng làm khuôn cho phản ứng định lượng RT-PCR. Kết quả cho thấy, ở mật độ 0,01%, kỹ thuật này có thể phát hiện được quần thể mang gen PML-RARA. Đường chuẩn pha loãng cũng phản ánh tính ổn định của kỹ thuật với hệ số tương quan cao ($RR \approx 0,98$).

Mặc dù có sự khác biệt giữa kết quả tủy đồ và biểu hiện PML-RARA. Tuy nhiên, do quy mô mẫu nhỏ, chưa thể kết luận độ nhạy của phương pháp trên mẫu bệnh phẩm. Hơn nữa, tùy từng cộng đồng dân cư mà chuyển đoạn PML-RARA xuất hiện trên BN BCCTTB khác nhau. Những thông kê trước đây cho thấy: 75 - 99% BN BCCTTB mang dấu ấn phân tử này [7]. Trong nghiên cứu này, 8/10 mẫu (80%) có biểu hiện dấu ấn PML-RARA, phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới. Để khẳng định tỷ lệ mang dấu ấn này trên quần thể BN Việt Nam là bao nhiêu, chúng ta cần phải tiến hành trên một nghiên cứu lớn hơn.

Như vậy, bên cạnh độ nhạy, độ đặc hiệu kỹ thuật mà chúng tôi đã chứng minh, với xét nghiệm này chúng ta có thể theo dõi hiệu quả điều trị nhắm đích một cách chính xác. Đó là một ưu điểm vượt trội mà cho đến nay chưa có phòng thí nghiệm nào trong nước có được. Từ đó, BN BCCTTB sẽ được chẩn đoán và theo dõi theo đúng hướng dẫn của Hội Chuyên ngành Quốc tế ngay tại Việt Nam mà không phải gửi mẫu ra nước ngoài.

KẾT LUẬN

Quy trình định lượng dấu ấn phân tử PML-RARA đã xây dựng thành công với độ đặc hiệu 100% và độ nhạy kỹ thuật ổn định ở mức 1 tế bào ung thư/10.000 tế bào bình thường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Avvisati, G, et al.* AIDA 0493 protocol for newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: very long-term results and role of maintenance. *Blood.* 2011, 117 (18), pp.4716-4725.
2. *Sanz, M.A, et al.* Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2009, 113 (9), pp.1875-1891.

3. *Milligan, D.W, et al.* Guidelines on the management of acute myeloid leukaemia in adults. *Br J Haematol.* 2006, 135 (4), pp.450-474.

4. *Iqbal, S, et al.* Identification of PML/RARalpha rearrangements in suspected acute promyelocytic leukemia using fluorescence in situ hybridization of bone marrow smears: a comparison with cytogenetics and RT-PCR in MRC ATRA trial patients. *MRC Adult Leukaemia Working Party. Leukemia.* 2000, 14 (5), pp.950-953.

5. *Grimwade, D, et al.* Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia: cytogenetic, molecular and PML immunofluorescence assessment of patients entered into the M.R.C. ATRA trial. *M.R.C. Adult Leukaemia Working Party. Br J Haematol.* 1996, 94 (3), pp.557-573.

6. *Gabert, J, et al.* Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 2003, 17 (12), pp.2318-2357.

7. *Grimwade, D, et al.* Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies. *Blood.* 2000, 96 (4), pp.1297-1308.

Ngày nhận bài: 30/10/2012

Ngày giao phản biện: 15/11/2012

Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012

