

TĂNG ĐIỀU HOÀ GEN TRONG MÔ UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG BẰNG CÔNG NGHỆ MICROARRAY

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

TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá và so sánh biểu hiện gen trên 62 bệnh nhân (BN) ung thư đại trực tràng (UTĐTT) được xác chẩn qua sinh thiết sau phẫu thuật. Tách chiết ARN tổng số từ mô ung thư (UT) và mô lành. Tổng hợp cADN, ARN, tinh sạch ARN sử dụng bộ kit Ambion Illumina TotalPrep ARN Amplification Kit theo quy trình của nhà sản xuất. Lai cARN lên chip Sentrix^(R)BeadChip HumanRef-8_V2 (Illumina 24000 Mỹ) 22.185 gen. Rửa và phát hiện tín hiệu bằng Stepavidin-Cy3. Scan hình ảnh lai cARN trên chip của 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. So sánh biểu hiện gen giữa các mẫu mô UT và mẫu mô xa tổ chức UT (mô lành), kết quả phát hiện 70 gen tăng biểu hiện ở mô UT so với mô lành ($p \leq 0,01$).

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

UP-REGULATED GENES IN COLORECTAL CANCER TISSUE USING MICROARRAY TECHNOLOGY

SUMMARY

The study was carried out on colorectal cancer patients, confirmed by biopsy analysis after operation. Total ARN were extracted from both tumor and normal tissues. cADN, ARN were synthesized and purified using Ambion Illumina TotalPrep ARN Amplification Kit according to manufacturer's procedure. Lai cARN hybridization 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 with Beadstudio V1.5.1.3 and online DAVID software. The result showed: 70 up-regulated genes in tumor tissues in comparison with the normal one of same type ($p \leq 0,01$).

* Key words: Colorectal cancer; Microarray technology.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, sinh học phân tử đóng một vai trò quan trọng trong lĩnh vực điều trị UT. Những biến đổi phân tử liên quan đến quá trình tiến triển của UT. Các phương pháp sinh học phân tử giúp chúng ta hiểu rõ hơn

về cơ chế, sàng lọc, phát hiện sớm và theo dõi điều trị UT một cách hiệu quả. Trong đó, UTĐTT đứng thứ ba trong số các loại UT. Công nghệ microarray giúp đánh giá biến đổi biểu hiện của hàng ngàn gen.

* Học viện Quân y

** Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Nam

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

Qua so sánh biểu hiện gen với tổ chức lành cùng loại sẽ giúp phát hiện các marker

phân tử có giá trị trong sàng lọc, phát hiện sớm, chẩn đoán và theo dõi quá trình điều

trị. Hầu hết các công trình nghiên cứu UT sử dụng công nghệ microarray tập trung vào UT vú đã cho thấy có những biến đổi. Nhiều tác giả cũng phát hiện mối tương quan giữa loại UT và biểu hiện gen, giữa UT có tính gia đình và UT rải rác.

Ở Việt Nam, hiện chưa có công trình nào nghiên cứu về biến đổi gen với số lượng lớn bằng công nghệ microarray. UTĐTT là loại UT hàng đầu ở Việt Nam, việc điều trị thường kém hiệu quả do phát hiện muộn và tính chất di căn. Những biến đổi gen trong UTĐTT được phát hiện trong quần thể người Việt Nam có thể góp phần tìm ra các marker phân tử có giá trị trong sàng lọc, chẩn đoán và theo dõi điều trị. Xuất phát từ thực tế đó, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục tiêu: *Khảo sát biểu hiện gen trong hệ gen người ở các tổ chức UTĐTT bằng kỹ thuật microarray.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

62 BN UTĐTT được khám, nội soi, sinh thiết, phẫu thuật, xét nghiệm mô bệnh học tại Bệnh viện K và Bệnh viện 103.

Tiêu chuẩn chọn BN: BN được xác định UTĐTT bằng chẩn đoán tế bào học. Lấy mô từ trung tâm khối u và tổ chức mô cùng loại xa khối u trong khi phẫu thuật, khối lượng: 5 - 10g/mẫu. Mô sau khi lấy, bảo quản ngay trong bình nitơ lỏng -80°C và tủ lạnh -80°C cho tới khi tách chiết ARN.

Tiêu chuẩn loại trừ: BN có kết quả giải phẫu bệnh không xác định là UT; BN u lành; viêm mãn tính; lao ruột; UTĐTT đã điều trị bằng tia xạ, hoá chất trước khi phẫu thuật.

2. Hoá chất và thiết bị.

Hoá chất: 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 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. Quá trình nghiền mẫu tiến hành bằng máy nghiền đồng thể trong nitơ lỏng. Các dụng cụ trước khi dùng được tráng dung dịch nước không có ase ADN, ase ARN, dung dịch chống ase ARN 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 trên được thực hiện trên hệ thống máy nhân gen ABI 9700, gồm: tổng hợp sợi thứ nhất sử dụng lượng ARN mẫu 50 - 500 ng ở điều kiện 42°C trong 2 giờ; tổng hợp sợi thứ hai trong điều kiện 16°C trong 2 giờ; tổng hợp cARN trong điều kiện 37°C . Tính toán các thành phần phản ứng tổng hợp cADN, cARN theo địa chỉ website trực tuyến: www.ambion.com/tools/illumina [5]. Kết thúc mỗi bước trên, các mẫu được để ngay vào trong đá chuyển 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^(R)BeadChip HumanRef-8_V2 (Illumina, Mỹ). Dùng đồng nhất lượng 1,5 μg ARN cho mỗi mẫu cùng GEX-HYB, nước cất không có ase ARN, GEX-HCB tại điều kiện 58°C 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 các chip cho tới khi scan. Scan hình ảnh lai cARN trên chip hệ thống Illumina Bead array reader, Bead Station 500X. Hình ảnh kết quả thu được là tín hiệu huỳnh quang các gen trên chip. Phân tích kết quả thu

được bằng phần mềm Beadstudio V1.5.1.3 và trong 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 Beadstudio V1.5.1.3 và phần mềm trực tuyến DAVID. So sánh biểu hiện gen giữa các mẫu mô UT và mẫu mô xa tổ chức UT (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 những mẫu UT và mẫu lành khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$), 3.727 gen biểu hiện cao và 285 gen biểu hiện thấp. Với $p \leq 0,01$, 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 70 gen biểu hiện rõ rệt nhất khi tăng điều hòa biểu hiện gen với mức khác biệt giữa mô lành và mô bệnh có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,01$).

Bảng 1: Các gen có biểu hiện cao ($p \leq 0,01$).

MÃ SỐ	KÝ HIỆU GEN	MỨC TÍN HIỆU TRUNG BÌNH MÔ LÀNH	MỨC TÍN HIỆU TRUNG BÌNH MÔ BỆNH	TỶ LỆ TÍN HIỆU MÔ BỆNH/MÔ LÀNH	p
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
ILMN_19915	COL11A1	159,91	908,54	5,68	0,009
ILMN_7684	ALG14	384,23	1.141,27	2,97	0,007
ILMN_26857	ZBTB33	81,96	854,00	10,42	0,004
ILMN_6032	GRK7	156,32	952,61	6,09	0,006
ILMN_10129	GNA11	208,27	1.005,81	4,83	0,003
ILMN_17286	CCDC3	191,02	999,49	5,23	0,003
ILMN_14179	WDR40B	330,37	1.142,68	3,46	0,008
ILMN_27537	LYN	267,71	1.113,43	4,16	0,008
ILMN_137452	MCTP1	94,74	946,64	9,99	0,004
ILMN_28121	FLJ30934	338,96	1.209,17	3,57	0,005
ILMN_2726	NXF5	243,08	1.117,81	4,60	0,007
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
ILMN_14351	KCTD12	237,30	1.164,72	4,91	0,007
ILMN_24410	UHMK1	228,30	1.157,41	5,07	0,007
ILMN_5039	CCNB3	444,97	1.446,17	3,25	0,009
ILMN_20681	WNT1	338,39	1.356,38	4,01	0,002
ILMN_16535	ZCCHC12	229,45	1.247,82	5,44	0,007
ILMN_28857	MGC15763	315,67	1.342,07	4,25	

ILMN_15875	SLC37A4	156,12	1.186,78	7,60	0,001
ILMN_28485	SNRPN	231,50	1.267,99	5,48	0,002
ILMN_27575	POLR3K	248,54	1.288,39	5,18	0,005
ILMN_139141	TMPRSS4	300,80	1.345,30	4,47	0,002
ILMN_138827	GFI1	112,91	1.164,97	10,32	0,000
ILMN_5544	PIAS2	379,97	1.434,36	3,77	0,003
ILMN_18051	TNFRSF19	84,13	1.144,34	13,60	0,000
ILMN_23525	TFAP2C	553,33	1.677,22	3,03	0,010
ILMN_15524	FOXP1	404,63	1.564,99	3,87	0,003
ILMN_8159	CLDN15	526,13	1.743,69	3,31	0,005
ILMN_24466	MBNL2	233,15	1.457,86	6,25	0,003
ILMN_139337	DNER	360,77	1.622,31	4,50	0,010
ILMN_29979	C3orf60	520,82	1.832,88	3,52	0,005
ILMN_26688	ANKRD17	542,24	1.868,03	3,45	0,006
ILMN_2612	KCNIP4	357,83	1.732,83	4,84	0,004
ILMN_29819	HAO1	600,16	2.042,58	3,40	0,009
ILMN_25431	SPATA9	282,84	1.734,26	6,13	0,004
ILMN_14915	PRIM2A	189,08	1.649,79	8,73	0,010
ILMN_27563	DNAH17	749,65	2.252,54	3,00	0,010
ILMN_138065	LOC442444	416,73	1.947,31	4,67	0,007
ILMN_24587	FGF6	259,54	2.074,17	7,99	0,004
ILMN_23476	ADAMTSL1	224,30	2.046,29	9,12	0,003
ILMN_12909	RPS29	774,17	2.791,59	3,61	0,007
ILMN_30298	ZNF439	1.033,87	3.094,66	2,99	0,008
ILMN_17596	CALML4	918,05	3.218,71	3,51	0,010
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
ILMN_1152	HLA-G	995,10	3.308,16	3,32	0,003
ILMN_28396	OR2AG1	719,29	3.239,61	4,50	0,007
ILMN_28729	RHBG	1.012,79	3.619,49	3,57	0,002
ILMN_20794	PNMA1	274,31	2.892,93	10,55	0,005
ILMN_9997	AHNAK	996,52	3.769,08	3,78	0,003
ILMN_13161	ZBTB12	1.707,93	4.599,99	2,69	0,005
ILMN_16298	USH2A	1.244,88	4.277,26	3,44	0,009
ILMN_777	PCOTH	463,69	3.576,59	7,71	0,000
ILMN_21866	FRAT2	921,22	4.281,15	4,65	0,001

ILMN_29080	MDK	1.569,33	5.127,14	3,27	0,007
ILMN_6502	LIX1	1.598,17	5.775,31	3,61	0,003
ILMN_30266	SMARCA3	3.086,43	7.528,05	2,44	0,007
ILMN_10011	SMAD7	9.899,21	3.250,87	3,05	0,001
ILMN_10817	TRFP	8.976,60	4.554,34	1,97	0,003
ILMN_11181	HRAS	4.756,74	3.017,64	1,58	0,003
ILMN_12176	TITF1	1.837,29	217,78	8,44	0,004
ILMN_13596	MLH1	2.463,70	995,21	2,48	0,001
ILMN_16930	DCC	2.567,49	123,42	20,80	0,009
ILMN_17732	MCC	1.683,42	565,67	2,98	0,001
ILMN_18417	PMS1	963,54	68,91	13,98	0,005
ILMN_18629	APC	2.343,86	231,91	10,11	0,004
ILMN_20018	SMAD4	956,75	70,40	13,59	0,002
ILMN_21386	CTNNB1	1.327,67	454,54	2,92	0,003
ILMN_23993	PMS2	1.654,65	876,20	1,89	0,008
ILMN_25988	KRAS	579,40	232,43	2,49	0,003
ILMN_3443	NRAS	899,78	277,34	3,24	0,006
ILMN_9008	MSH2	560,87	58,43	9,60	0,003
ILMN_10011	SMAD7	987,78	387,12	2,55	0,004

Nhiều gen có biểu hiện cao với tỷ lệ từ 1,89 - 20,8 lần ở mô UT so với mô lành. Ngoài ra, cũng thu được 38 gen khác giảm điều hòa biểu hiện với mức khác biệt giữa mô lành và mô bệnh có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,01$). Một số gen đã được xác định về cơ chế liên quan UT [4, 6].

Gen MTHFR (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase) nằm trên nhiễm sắc thể (NST) số 1, tại vị trí 1p36.3, mã hóa cho enzym xúc tác chuyển hóa 10-methylenetetrahydrofolate sang 5-methyltetrahydrofolate, liên quan tới UT đại trực tràng... Các gen PMS1 đóng vai trò quan trọng trong phát triển khối u, họ gen này nằm trên NST số 2, ở các vị trí 2q31-q33, 2q31-q33-2q31.1. Gen này mã cho một protein sửa sai việc bắt cặp mỗi của họ mutL/hexB. Gen PMS2 (postmeiotic segregation increased 2) nằm trên NST 7, vị trí 7p22.2. Đây là gen thuộc họ gen PMS2. Sản phẩm của gen liên quan đến sửa sai việc bắt cặp. Đột biến của gen này liên quan đến UTĐTT, hội chứng Turcot. Các gen sửa chữa ADN có vai trò quan trọng trong phát triển UT do mất chức năng protein. Sau khi mất chức năng ức chế UT, cùng với quá trình biến đổi, các gen dần phát triển thành UT. Gen SMAD4 - Mothers against DPP homolog 4, nằm trên NST số 18, tại vị trí 18q21.1, liên quan tới phiên mã, điều hòa phiên mã, điều hòa sinh trưởng của tế bào. Gen APC (adenomatous polyposis coli) nằm trên NST số 5, tại vị trí 5p21, có vai trò như gen gác cửa "gatekeeper". Đột biến gen APC gây bất hoạt sớm của gen APC với tần số cao trong u tuyến, nhưng không thấy có trong u nhày lân cận. Các thể đột biến di truyền có độ thâm xuyên cao, ngay cả khi chưa có số liệu thống kê đầy đủ cũng có nhiều bằng chứng về việc bất hoạt gen APC - là bước giới hạn tốc độ trong phát triển UT. Có thể biết rõ hơn qua xét nghiệm tổn thương ở các giai đoạn khác nhau. Đột biến gen APC và mất 5q thường được phát hiện thấy trong các mô UTĐTT ở giai đoạn phát triển từ khối u biểu mô tuyến nhỏ đến giai đoạn di căn. Đột biến APC thường kèm theo đột biến CTNNB1 - gen có chức năng liên quan đến gen APC. Ngay cả khi phân tích các tổn thương sớm hơn, những vị trí tổn thương kín đáo cũng phát hiện thấy mang đột biến gen APC. Nghiên cứu trên mô hình đều thống nhất là sự bất hoạt chức năng gen APC tạo ra một làn sóng ban đầu cho lan tràn dòng tế bào tiền UT. Gen DCC (deleted in colorectal carcinoma) nằm trên NST số 18, tại vị trí 18q21.3. Cả 2 đột biến trên NST số 17 liên quan gen p53 và trên NST số 18 liên quan gen DCC ít gặp trong u tuyến nhỏ, nhưng khi u tuyến phát triển thành UT, biểu mô tại chỗ thì tần số đột biến gặp lại tăng lên, tần số đột biến tiếp tục tăng cùng với sự phát triển xâm lấn của khối u. Mất tính dị hợp tử gen DCC có thể là dấu hiệu tiên lượng xấu. Mất một alen gen DCC ở 71% đột biến soma và 13% trong UTĐTT. Đây là gen ức chế UT. Gen này rất giống với gen mã hoá glycoprotein bề mặt màng tế bào, trong đó có phân tử gắn kết giữa các tế bào thần kinh. Có quan điểm cho rằng, vai trò của DCC trong UT là làm mất tương tác bình thường giữa các tế bào. Gen MLH1 nằm trên NST số 3, tại vị trí 3p21.3, liên quan đến sửa lỗi ghép cặp ADN. Gen này liên quan đến điều hòa phân chia nguyên nhiễm và điều hòa sau phiên mã để tạo đuôi polyA...

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, Macrogen MAGIC cADN microarray, Agilen cADN microarray, Custom cADN microarray... nên thu được những kết quả rất khác nhau [1, 2, 7]. Simon và CS (2008) thống kê so sánh 23 kết quả nghiên cứu khác nhau về biểu hiện gen trong UTĐTT giữa mô UT và mô lành cho thấy có sự khác biệt. Các nghiên cứu này chưa phát hiện thấy sự khác biệt đáng kể giữa mô UT và mô u tuyến (adenoma) [5, 8].

KẾT LUẬN

Bằng công nghệ microarray đánh giá biểu hiện gen trên 62 BN UTĐTT, chúng tôi đã phát hiện 70 gen có tăng biểu hiện ở mô UT so với mô lành ($p \leq 0,01$). Những gen này có thể được dùng cho thiết kế ADN-chip phục vụ sàng lọc và phát hiện sớm UTĐTT.

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 histoclinical parameters. *Oncogene*. Vol 23, pp.1377-1391.
2. Bianchini M., Levy E., Zucchini C. et al. Comparative study of gene expression by cADN microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa. *Int J Oncol*. 2004, Vol 29, pp.83-94.
3. Croner R.S., Foertsch T., Brueckl W.M. et al. Common denominator genes that distinguish colorectal carcinoma from normal mucosa. *Int J Colorectal Dis*. 2005, Vol 20, pp.353-362.
4. Fred Bunz. *Principle of cancer genetics*. Springer. USA. 2008.
5. Simon K. Chan, Obi L. Griffith, Isabella T. Tai, Steven J.M. Jones. Meta-analysis of Colorectal cancer gene expression profiling studies identifies consistently. Reported candidate biomarkers. *Cancer epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2008, pp.543-552.
6. Vogenstein B., Fearon E.R., Halmilton S.R. et al. Genetic alteraion during colorectal tumor development. *New England Journal of Medicine*. 1988, Vol 319, pp.525-532.
7. www.ambion.com/tools/illumina.
8. Zou T.T., Selaru F.M., Xu Y. et al. Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene*. 2002, Vol 21, pp.4855-4862.