

Thiết lập xét nghiệm xác định đột biến gene PIK3CA ứng dụng theo dõi đáp ứng aspirin trong điều trị dự phòng ung thư đại trực tràng

Establishing an assay for identifying PIK3CA gene mutation using in evaluating the response to aspirin in colorectal cancer patients

Ngô Tất Trung, Đào Thanh Quyên, Lê Hữu Song

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Thiết lập phương pháp xác định đột biến gene PIK3CA để ứng dụng trong tiên lượng điều trị ung thư đại trực tràng bằng aspirin. **Đối tượng và phương pháp:** Các dòng tế bào mang các điểm đột biến khác nhau của PIK3CA như MCF-7, H460, HTC116 được nuôi cấy và pha loãng nồng độ trong các dòng tế bào bình thường theo tỷ lệ 50%, 25%, 5%, 1%, 0,1% và 0%. Sau đó, được tách DNA để đánh giá độ nhạy. PCR đặc hiệu allele có tích hợp công nghệ Amplification refractory mutation system (ARMS) được sử dụng để phát hiện đột biến (PCR-ARMS). Giải trình tự gene được sử dụng để xác định độ đặc hiệu của PCR-ARMS. 26 mẫu bệnh phẩm máu từ bệnh nhân ung thư đại trực tràng được sử dụng để thử nghiệm sàng lọc bước đầu. **Kết quả:** Xét nghiệm PCR-ARMS đã được xây dựng thành công cho phép xác định các trạng thái đột biến 1633G > A (exon 9) và 3140A > G (exon 20) của gene PIK3CA khi DNA đột biến chỉ chiếm 1% trong DNA bệnh phẩm. Kết quả giải trình tự khẳng định độ đặc hiệu của PCR-ARMS. Trong số 26 bệnh phẩm ung thư đại trực tràng, chúng tôi phát hiện được 3 bệnh phẩm mang đột biến gene PIK3CA. **Kết luận:** Xét nghiệm xác định đột biến gene PIK3CA với độ nhạy kỹ thuật 1% đã được xây dựng thành công.

Từ khoá: Ung thư đại trực tràng, PIK3CA, aspirin.

Summary

Objective: To establish a molecular assay for identifying mutational status of PIK3CA in colorectal cancer patients who are in considering to use aspirin-based therapies. **Subject and method:** 26 colorectal cancer patient samples were recruited into this study. Whereas PIK3CA mutant carrier cell lines MCF-7, H460, HTC116 were cultured and mixed against wild-type PIK3CA cell lines Hela to form a dilution series of 50%, 25%, 5%, 1%, 0.1%, 0%. This dilution series was then subjected to total DNA extraction and latter for the defining the limit of detection (LoD) of the Amplification refractory mutation system (ARMS) based allele specific PCR approach for detecting 1633G > A (exon9) 3140A > G (exon 20) mutations of PIK3CA gene. **Result:** Our data revealed that PCR-ARMS for identifications of PIK3CA 1633G > A (exon 9) and 3140A > G (exon 20) was established with limits of detection at 1% mutant allele. Additionally, by using the newly established approach, 3 out of amongst 26 recruited samples, were detected to carry PIK3CA mutant alleles. **Conclusion:** The assay for molecular geneotyping of PIK3CA was established with detection limits of 1%.

Keywords: Colorectal cancer, PIK3CA, aspirin.

Ngày nhận bài: 22/5/2019, ngày chấp nhận đăng: 06/6/2019

Người phản hồi: Ngô Tất Trung, Email: tatrungngo@gmail.com - Bệnh viện TƯQĐ 108.

1. Đặt vấn đề

Ung thư đại trực tràng (UTĐTT) là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 2 sau ung thư phổi, tần suất của bệnh này thay đổi giữa các vùng địa lý khác nhau: Cao nhất là ở Bắc Mỹ, châu Âu, sau đó đến khu vực châu Á. Ở nước ta, tỷ lệ tử vong do UTĐTT đứng hàng thứ 4 trong số các bệnh lý ung thư, chiếm tỷ lệ từ 5 - 15% tùy từng khu vực dân cư [1].

Cho đến nay có 3 phương pháp chính trong điều trị UTĐTT đó là: i) Phẫu thuật cắt bỏ khối u, ii) Điều trị bằng hóa chất và iii) Điều trị đích sử dụng dược chất ức chế đặc hiệu các chu trình tín hiệu quyết định cơ chế bệnh sinh UTĐTT.

Tùy thuộc đặc điểm lâm sàng, giai đoạn bệnh và các đặc điểm di truyền học đặc trưng mà UTĐTT sẽ có một phác đồ điều trị tương ứng. Mặc dù, đã chính thức được FDA cấp phép, cũng như sự đồng thuận từ Hiệp hội Ung thư lâm sàng châu Âu - EMSO và Mạng lưới Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ NCCN - cho phép sử dụng, nhưng chỉ những bệnh nhân UTĐTT không mang một trong các đột biến gene: Kras, Braf, PIK3CA, Pten... có hy vọng đáp ứng tốt với phác đồ điều trị đích sử dụng kháng thể đơn dòng kháng EGFR như cetuximab hoặc panitumumab [3], [5]. Trong khi đó, tỷ lệ bệnh nhân mang đột biến các gene Kras và PIK3CA - yếu tố chống chỉ định sử dụng các dược chất này lại ở mức khá cao - tương ứng khoảng 40 - 45% (Kras) và 15 - 18% (PIK3CA) trong tổng số ca bệnh [6], [7].

Như vậy, nếu chỉ dừng lại ở việc áp dụng các phác đồ điều trị hóa chất truyền thống kết hợp kháng thể đặc hiệu kháng EGFR, thì có nhiều bệnh nhân UTĐTT mang đột biến gene Kras hoặc PIK3CA sẽ không có nhiều cơ hội được kéo dài sự sống.

Trong những năm gần đây, ngoài khái niệm điều trị đích được cho là mới mẻ trong thực hành lâm sàng điều trị ung thư còn xuất hiện khái niệm điều trị dự phòng, mà nổi bật là điều trị dự phòng UTĐTT sử dụng các dược phẩm kháng viêm nhóm

non-steroid như aspirin. Nghiên cứu đa trung tâm đã khẳng định nếu sử dụng lâu dài aspirin sẽ không những làm giảm nguy cơ mắc UTĐTT [9] mà nó còn làm giảm khả năng di căn của UTĐTT và một số ung thư khác như ung thư phổi, ung thư gan, ung thư dạ dày [10], [12]. Kết quả của các nghiên cứu nói trên đã phần nào gợi mở khả năng sử dụng aspirin như là một dược chất trong điều trị ung thư. Nghiên cứu cũng cho thấy nếu sử dụng đều đặn aspirin sẽ kéo dài thời gian sống cho các bệnh nhân UTĐTT mang đột biến gene PIK3CA, tuy nhiên aspirin lại không có tác dụng trên nhóm bệnh nhân không mang đột biến gene này [8]. Hiện nay, mặc dù ở Việt Nam xét nghiệm phát hiện đột biến gene PIK3CA chưa được chỉ định thường quy và chưa được chi trả bởi hệ thống bảo hiểm y tế, tuy nhiên ở nhiều nước phát triển trên thế giới, đột biến PIK3CA đã được dùng trong cân nhắc chỉ định các dược chất ức chế gene PARP trong điều trị ung thư vú, ung thư buồng trứng (ví dụ olaparib).

Vi vậy, chúng tôi tiến hành thiết kế xét nghiệm xác định đột biến PIK3CA để giúp các thầy thuốc lâm sàng có thêm thông tin khi điều trị UTĐTT bằng aspirin và cân nhắc ứng dụng trong điều trị ung thư vú, ung thư buồng trứng sau này.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Các dòng tế bào ung thư MCF-7, H460 và HCT 116 mang các đột biến gene PIK3CA tương ứng tại các vị trí 1633G > A và 1635 G > T (exon 9); 3140A > G (exon 20) được nuôi cấy và pha loãng trong các dòng tế bào bình thường không mang đột biến theo các nồng độ khác nhau 50%, 25%, 5%, 1%, 0,1% và 0%. Sau đó tách chiết DNA của các mẫu để xác định độ nhạy kỹ thuật và làm chứng dương và 26 mẫu bệnh phẩm mô UTĐTT thu thập tại Bệnh viện TƯQĐ 108.

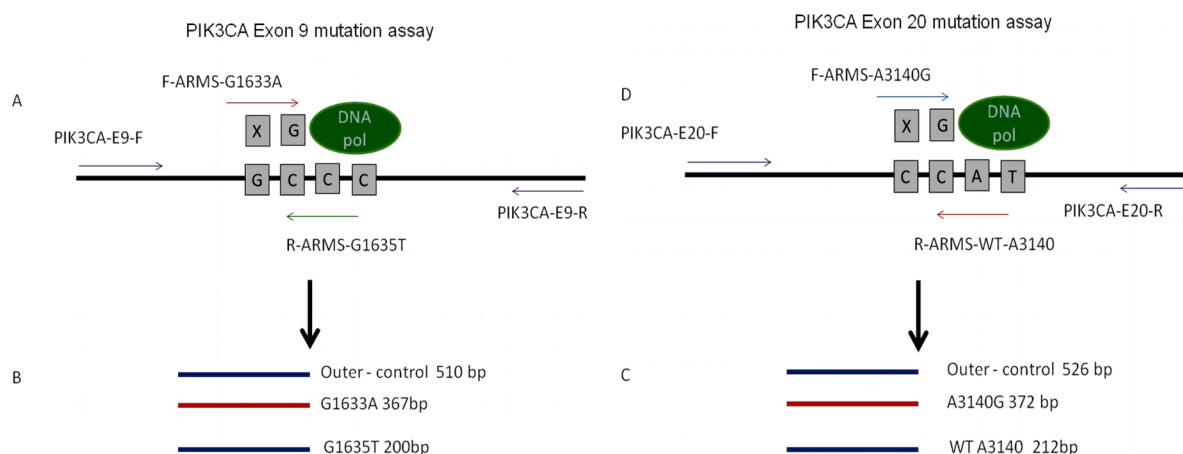
2.2. Phương pháp

PCR đặc hiệu allele tích hợp công nghệ phân tích điểm đột biến Amplification-refractory mutation system (ARMS).

Bộ mỗi của phản ứng PCR phát hiện đột biến gồm 4 chuỗi mỗi đơn, trong đó cặp mỗi vòng ngoài (PIK3CA-E9-F/ PIK3CA-E9-R2) hoặc (PIK3CA-E20-F/ PIK3CA-E20-R) nhân lên đoạn DNA có nghi ngờ chứa đột biến (trên exon 9 và 20 tương ứng), hình ảnh điện di các băng này có kích thước tương ứng là 510bp và 526bp và đồng thời được coi là tín hiệu nội chuẩn phản ánh sự có mặt của đoạn gene PIK3CA trong DNA mẫu bệnh phẩm. Các cặp mỗi đặc hiệu allele (F-ARMS-G1633A/ PIK3CA-E9-R2) và (R-ARMS-G1635T/ PIK3CA-E9-F) được sửa đổi về mặt hóa học

theo nguyên lý ARMS nhờ đó một mặt vẫn duy trì được tính bất mỗi đặc hiệu cho các vị trí có đột biến 1633G > A hoặc 1635 G > T hình thành các băng điện di có kích thước tương ứng là 367 và 200bp, mặt khác triệt tiêu sự bắt chéo của mỗi vào các trình tự không mong muốn vì vậy loại bỏ được hiện tượng dương tính giả. Tương tự như vậy, các cặp mỗi đặc hiệu allele (F-ARMS-A3140G/ PIK3CA-E20-R) và (R-ARMS-WT-A3140/ PIK3CA-E20-F) sẽ nhân lên băng đột biến 372bp và băng kiểu đại tương ứng 212bp tại vị trí A3140.

(Trình tự chi tiết các đoạn mỗi sẽ được cung cấp nếu bạn đọc quan tâm và liên hệ với nhóm tác giả).



Hình 1. Sơ đồ nguyên lý kỹ thuật PCR đặc hiệu allele tích hợp công nghệ phân tích điểm đột biến (Amplification-refractory mutation system - ARMS)

Để phát hiện đột biến tại mỗi vị trí nghi ngờ chúng tôi sử dụng một bộ gồm 4 mỗi đơn trong đó cặp mỗi ngoại nội chuẩn sẽ khuếch đại đoạn gene nghi ngờ mang đột biến và đóng vai trò như băng nội chuẩn trên hình ảnh điện di, trong khi đó các mỗi đặc hiệu cho các allele thể đột biến và thể đại sẽ khuếch đại các băng tương ứng (xem chú giải phần phương pháp).

Đánh giá độ nhạy phương pháp

Để khẳng định độ nhạy kỹ thuật của phương pháp chẩn đoán, chúng tôi tiến hành pha loãng các mẫu DNA tách ra từ tế bào chuẩn dương H460 hoặc

HTC-116 mang đột biến gene PIK3CA tại các vị trí exon 9, exon 20 vào mẫu DNA của tế bào không mang đột biến gene PIK3CA (HT-29) theo các tỷ lệ giảm dần 50%, 25%, 5%, 1%, 0,1% và 0% đột biến so với gene không đột biến và thực hiện phản ứng PCR đặc hiệu allele.

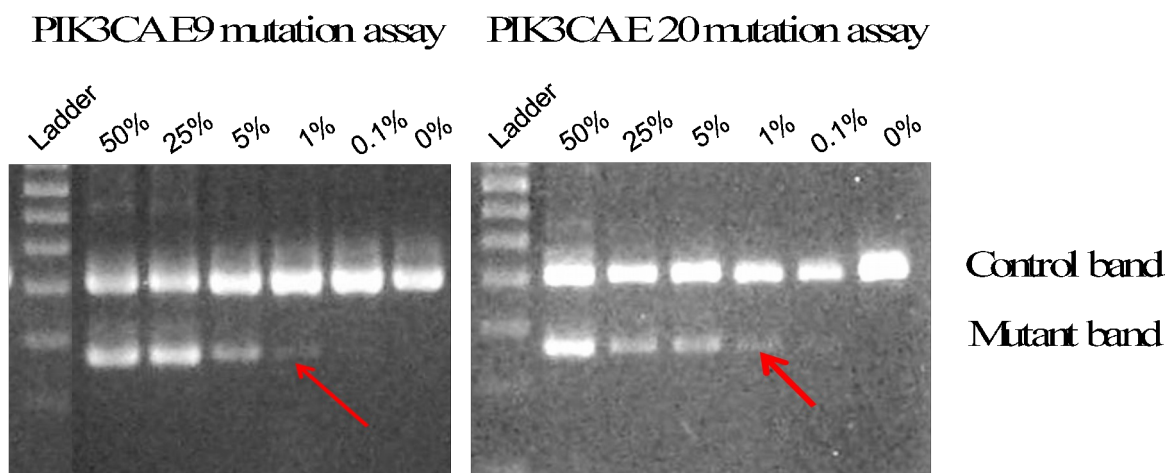
Đánh giá độ đặc hiệu kỹ thuật của phương pháp

Để khẳng định tính đặc hiệu kỹ thuật của phương pháp, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn gene PIK3CA được phân tách từ mẫu DNA dương tính với các vị trí đột biến 1633G > A (exon 9) và

3140A > G (exon 20), đồng thời so sánh với trình tự gene được đọc từ những mẫu tế bào không mang đột biến (mẫu DNA chân tóc người khỏe mạnh).

3. Kết quả

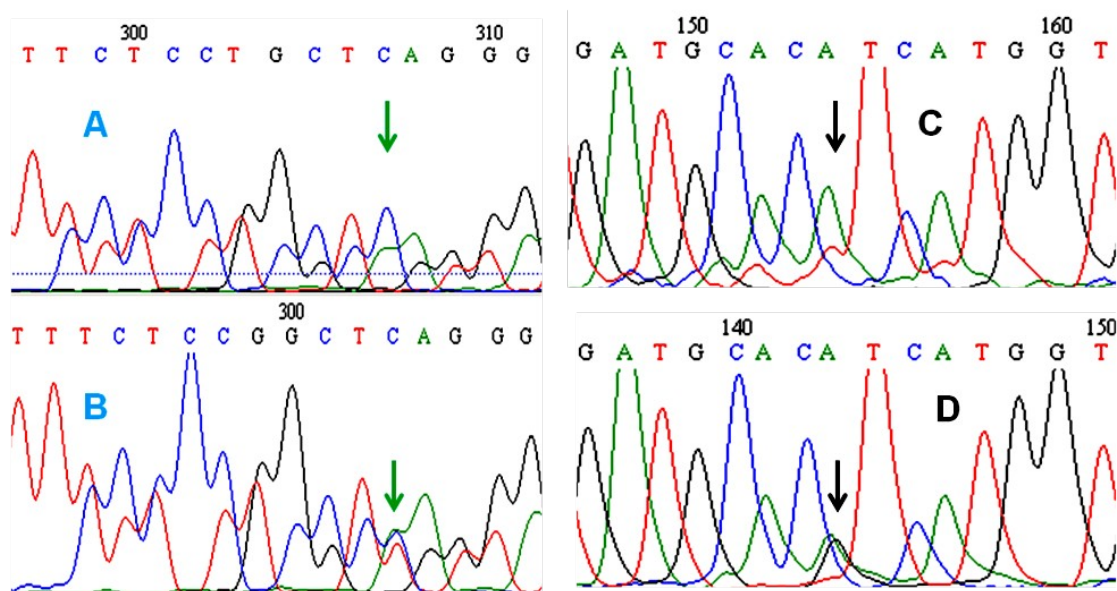
3.1. Xác định độ nhạy kỹ thuật của phương pháp



Hình 2. Độ nhạy kỹ thuật của phương pháp chẩn đoán đột biến gene PIK3CA

Nhận xét: Kết quả Hình 2 cho thấy phương pháp của chúng tôi có thể phát hiện được các đột biến 1633G > A, A3140G ở độ nhạy kỹ thuật 1% (mũi tên chỉ). **Chú thích:** Bảng trên là tín hiệu nội chuẩn; bảng dưới là tín hiệu đột biến.

3.2. Xác định độ đặc hiệu của phương pháp

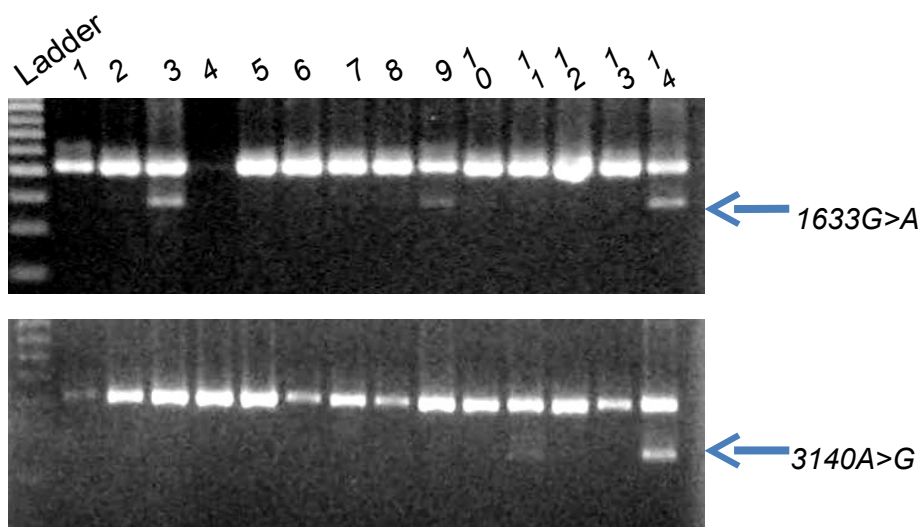


Hình 3. Kết quả giải trình tự gene các mẫu thể đại exon 9 (panel A), exon 20 (panel C) và thể đột biến 1633G > A – panel B và 3140A > G panel D trên các bệnh phẩm được chẩn đoán dương tính với đột biến gene PIK3CA

Nhận xét: Kết quả Hình 3 Panel A, B cho thấy nucleotide C (bắt cặp bổ sung với 1633G) tại vị trí 1633 (đầu mũi tên panel trên) đã chuyển thành nucleotide T (bắt cặp bổ sung với 1633A) tại vị trí 1633 - exon 9, trong khi đó nucleotide A tại vị trí 3140 panel C đã chuyển thành nucleotide G (panel D - exon 20).

3.3. Ứng dụng sàng lọc đột biến *PIK3CA* trên bệnh phẩm UTĐTT

Trên cơ sở quy trình vừa được thiết lập, chúng tôi tiến hành sàng lọc các đột biến *PIK3CA* trên 26 bệnh phẩm UTĐTT, kết quả bước đầu cho thấy có 3/26 bệnh phẩm mang đột biến gene *PIK3CA*, trong đó 2/26 dương tính với 1633G > A và 1/25 mang 3140A > G. Kết quả được thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. Sàng lọc đột biến *PIK3CA* trên mẫu bệnh phẩm UTĐTT

Nhận xét: Kết quả Hình 4 cho thấy có đột biến *PIK3CA* tại vị trí 1633G > A trên các mẫu bệnh phẩm số 3, 9 (panel trên) và đột biến 3140A > G ở mẫu bệnh phẩm số 11 (panel dưới). Mẫu 14 là hỗn hợp DNA dòng tế bào MCF7, H460 dùng làm chuẩn dương cho cả hai đột biến 1633G > A và 3140A > G.

4. Bàn luận

Mặc dù đã có nhiều tiến bộ, tuy nhiên điều trị UTĐTT vẫn còn nhiều khó khăn, kể cả khi có điều trị đích bằng các kháng thể đơn dòng. Lý do là một số lượng lớn bệnh nhân UTĐTT có mang các đột biến *Kras* (40 - 45%), *Braf* (15%), *PIK3CA* (18%), đây là những yếu tố tiên lượng xấu, chống chỉ định sử dụng kháng thể đơn dòng kháng EGFR [5]. Vì vậy, việc tìm ra các dược phẩm mới hướng đích tới nhóm bệnh nhân không đủ tiêu chuẩn sử dụng kháng thể đơn dòng kháng EGFR là điều cần thiết trong điều trị UTĐTT.

Aspirin, một hóa chất kháng viêm và là một trong số những dược phẩm được biết đến từ lâu của

y học hiện đại, nó cũng được biết đến với chức năng phòng ngừa nhiều loại ung thư khác như ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư tụy, ung thư đại trực tràng [10], [12], [14]. Các thử nghiệm lâm sàng mới nhất cho thấy aspirin liều cao thật sự có tác dụng giảm tỷ lệ tử vong bệnh nhân UTĐTT mang đột biến gene *PIK3CA* sau 5 năm từ 30% xuống còn khoảng 10% [8]. Điều này có nghĩa xét nghiệm chẩn đoán đột biến gene *PIK3CA* là cần thiết nhằm tiên lượng đáp ứng aspirin cho bệnh nhân UTĐTT.

Ngoài ra, đột biến gene *PIK3CA* còn là một dấu ấn tiên lượng tốt cho các bệnh nhân ung thư vú không bộc lộ thụ thể Her2 [15], nó cũng đồng thời là dấu ấn phân tử giúp tiên lượng đáp ứng điều trị của bệnh nhân ung thư vú với các dược phẩm ức chế chu trình tín hiệu đích (chất ức chế mTOR và con đường MAPK) [16]. Điều này có nghĩa xét nghiệm xác định đột biến gene *PIK3CA* có tiềm năng ứng dụng cả trong điều trị UTĐTT và điều trị ung thư vú. Xuất phát từ những yêu cầu đó chúng tôi tiến hành thiết lập xét nghiệm xác định đột biến gene *PIK3CA*.

Các nghiên cứu dịch tễ học trước đây cho thấy đa số các đột biến gene PIK3CA đều tập trung vào hai vị trí 1633G > A và 3140A > G. Vì vậy, xét nghiệm chúng tôi xây dựng cũng sẽ hướng đến việc phát hiện hai vị trí này. Thông thường ta có thể áp dụng phương pháp giải trình tự gene trực tiếp (Sanger sequencing) trong tìm kiếm các vị trí đột biến khác nhau, tuy nhiên giải pháp này chỉ có thể đưa ra được các thể đột biến khi nó có nồng độ vượt quá ít nhất 20% trong mẫu DNA cần phân tích [4]. Mặt khác, các vị trí đột biến 1633G > A và 3140A > G nằm trên 2 exon khác nhau (9 và 20) với khoảng cách trên 16000bp vì vậy phải tiến hành ít nhất 2 phản ứng giải trình tự gene khi phân tích đột biến gene này và vì vậy chi phí xét nghiệm cũng sẽ tăng lên.

Bằng thiết kế PCR đặc hiệu allele 2 hướng, ứng dụng lý thuyết amplification refractory mutation system (ARMS), chúng tôi đã xây dựng được phương pháp chẩn đoán đột biến PIK3CA với độ nhạy kỹ thuật 1%. Điều đó có nghĩa là kỹ thuật này có thể cho phép phát hiện đột biến PIK3CA khi bệnh phẩm xuất hiện 1 tế bào mang đột biến trong số 100 tế bào khỏe mạnh. Phương pháp này nhạy hơn 20 lần so với giải trình tự trực tiếp, đồng thời có giá thành thấp hơn (2 triệu đồng/bệnh nhân/lần xét nghiệm), thời gian phân tích kết quả ngắn hơn (4 giờ) so với giải trình tự gene (24 giờ).

Để bước đầu áp dụng dấu ấn PIK3CA trong thực hành lâm sàng, chúng tôi tiến hành xét sàng lọc đột biến gene này trên một số lượng nhỏ bệnh phẩm UTĐTT, kết quả ban đầu cho thấy có 3/26 bệnh phẩm mang đột biến PIK3CA. Như vậy, ở một quy mô mẫu nhỏ, chúng tôi ghi nhận tỷ lệ đột biến PIK3CA trên quần thể UTĐTT Việt Nam thấp hơn một số quần thể được công bố trước đây (15 - 18%) [5]. Tuy nhiên, đây là số liệu ban đầu tiến hành trên số lượng nhỏ bệnh nhân, chúng tôi sẽ tiến hành trên nhiều bệnh nhân hơn để có kết quả đại diện cho quần thể bệnh nhân người Việt Nam.

5. Kết luận

Xét nghiệm xác định đột biến gene PIK3CA tại các vị trí 1633G > A và 3140A > G đã được thiết lập thành công với độ nhạy kỹ thuật cho phép phát hiện đột biến khi lượng DNA mang đột biến trên mức 1% tổng lượng DNA bệnh phẩm.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyen Ba Duc, D.N.P (2008) *Epidemiology of cancer*.
2. Schmoll HJ et al (2012) *ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making*. Ann Oncol 23(10): 2479-2516.
3. Allegra CJ et al (2009) *American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: Testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy*. J Clin Oncol 27(12): 2091-2096.
4. Normanno N et al (2009) *Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC*. Nat Rev Clin Oncol 6(9): 519-527.
5. De Roock W et al (2011) *KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: Implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer*. Lancet Oncol 12(6): 594-603.
6. Karapetis CS et al (2008) *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. N Engl J Med 359(17): 1757-1765.
7. Amado RG et al (2008) *Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol 26(10): 1626-1634.
8. Liao X et al (2012) *Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival*. N Engl J Med 367(17): 1596-1606.
9. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS (2007) *Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2*. N Engl J Med 356(21): 2131-2142.
10. Algra AM and PM Rothwell (2012) *Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: A systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials*. Lancet Oncol 13(5): 518-527.
11. Rothwell PM et al (2010) *Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials*. Lancet 376(9754): 1741-1750.
12. Rothwell PM et al (2012) *Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: A study of incident cancers during randomised controlled trials*. Lancet, 2012. 379(9826): 1591-1601.
13. Martini M et al (2012) *Targeted therapies: how personal should we go?* Nat Rev Clin Oncol 9(2): 87-97.

14. Rothwell PM et al (2011) *Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: Analysis of individual patient data from randomised trials*. Lancet 377(9759): 31-41.
15. Kalinsky K et al (2009) *PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer*. Clin Cancer Res 15(16): 5049-5059.
16. Janku F et al (2012) *PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations*. J Clin Oncol 30(8): 777-782.