

Giá trị chẩn đoán ung thư phổi không tế bào nhỏ của mRNA VEGF huyết tương

Diagnostic value of plasma mRNA VEGF in identifying non-small cell lung cancer

Hồ Văn Sơn***, Ngô Tất Trung****,
Nguyễn Linh Toàn*

*Học viện Quân y,
**Bệnh viện Quân y 175,
***Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Nghiên cứu mức độ biểu hiện của gene VEGF huyết tương trong chẩn đoán sớm bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. **Đối tượng và phương pháp:** 100 bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ và 51 người bình thường (không ung thư) đã tham gia vào nghiên cứu này theo phương pháp mô tả cắt ngang có phân tích và so sánh. Biểu hiện mRNA VEGF được xác định trong huyết tương bằng phương pháp realtime PCR. **Kết quả:** Sự biểu hiện tương đối của gene VEGF ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm người bình thường ($p=0,007$). Biểu hiện mRNA của VEGF trong huyết tương có khả năng phân biệt nhóm bệnh nhân ung thư phổi và người bình thường, giá trị AUC đạt 0,615 ($p=0,028$). **Kết luận:** Mức độ biểu hiện mRNA của VEGF huyết tương ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ có thể góp phần chẩn đoán và tiên lượng bệnh.

Từ khóa: Ung thư phổi, ung thư phổi không tế bào nhỏ, VEGF.

Summary

Objective: This study aims to investigate the expression of VEGF mRNA in patients with non-small cell lung cancer in order to accurately diagnose the disease at an earlier stage. **Subject and method:** One hundred patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and 51 healthy subjects participated in this cross-sectional study. Relative expression of VEGF mRNA in plasma samples was assessed by realtime PCR. **Result:** The relative expression mRNA of the VEGF gene in patient group was significantly higher compared to that in the control group ($p=0.007$). The expression of plasma VEGF mRNA was capable to distinguish the patients with NSCLC from control individuals with the AUC value was 0.615 ($p=0.028$). **Conclusion:** The expression of VEGF mRNA in plasma maybe a potential biomarker that contributes to diagnosis of the disease.

Keywords: Lung cancer, non-small cell lung cancer, VEGF.

1. Đặt vấn đề

Ung thư phổi nguyên phát (UTPNP) là một trong những bệnh lý ác tính thường gặp nhất hiện

nay và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong các bệnh lý ung thư. Theo Tổ chức Nghiên cứu Ung thư Thế giới, ung thư phổi (UTP) chiếm khoảng 12%

Ngày nhận bài: 3/6/2019, ngày chấp nhận đăng: 16/6/2019

Người phản hồi: Nguyễn Linh Toàn, Email: toannl@vmmu.edu.vn - Học viện Quân y

ung thư các loại và tỷ lệ tử vong chiếm 18% trong các bệnh ung thư [1], [2]. Trong đó, ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN) chiếm hơn 80% các trường hợp UTPNP. Tại Việt Nam, UTPNP có sự gia tăng nhanh chóng, có liên quan đến tình trạng hút thuốc lá, nạn ô nhiễm không khí, khói bụi và chất thải công nghiệp. Khoảng 90% bệnh nhân UTPNP tử vong trong năm năm đầu [2]. Đặc điểm nổi bật của UTPKTBN là sự gia tăng mức độ biểu hiện của thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (Epithelial Growth Factor Receptor - EGFR) và các thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô mạch máu (Vascular Endothelium Growth Factor Receptor - VEGFR). Vùng nằm trong tế bào của các thụ thể này thường mang hoạt tính tyrosine kinase mà hoạt động của chúng lại phụ thuộc nhiều vào tương tác giữa khu vực ngoại bào với các tác nhân tăng trưởng hoặc tác nhân tạo mạch tự do trong bào tương. Khi VEGF bị kích hoạt và truyền tín hiệu tới nhân bào, hỗ trợ cho quá trình tăng sinh của tế bào đồng thời tăng khả năng di căn của tế bào ung thư tới các mô lân cận. Một số nghiên cứu cho thấy biểu hiện gene VEGFR có tiềm năng ứng dụng trong chẩn đoán UTPKTBN với độ nhạy và độ đặc hiệu khoảng 80 - 90% [3], [4]. Đây là một trong những dấu ấn sinh học đang được nghiên cứu ứng dụng trong hướng dẫn thực hành lâm sàng điều trị UTPNP ở các nước phát triển trên thế giới. Tuy nhiên, ở nước ta chưa có các công bố về nghiên cứu biểu hiện của các gene này ở bệnh nhân UTPKTBN. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá mối liên quan của biểu hiện mRNA của VEGFR ở bệnh nhân UTPKTBN.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

100 bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ được chẩn đoán bằng mô bệnh học hoặc tế bào học. Các bệnh nhân được phân nhóm theo giai đoạn bệnh theo tiêu chuẩn phân loại TNM [5]. Loại khỏi nhóm nghiên cứu những bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu, UTP tế bào nhỏ hoặc UTP do di căn. Nhóm chứng là nhóm bao gồm 51 người bình thường đến khám sức khỏe định kỳ có cùng nhóm tuổi với nhóm bệnh nhân UTPKTBN. Nhóm người bình thường được thăm khám sức khỏe và

được khẳng định là khỏe mạnh (HC) và đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp

Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang, so sánh có đối chứng, kết hợp xét nghiệm labo.

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu lâm sàng

Tất cả các bệnh nhân ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng đều được hỏi và khám lâm sàng. Làm các xét nghiệm cận lâm sàng: Huyết học, sinh hóa, chẩn đoán hình ảnh (X-quang phổi, CT ngực). Các thông số hỏi bệnh, thăm khám và cận lâm sàng được ghi vào bệnh án nghiên cứu. Tình trạng toàn thân, đánh giá tổng trạng theo thang điểm Karnofsky (KPI: Karnofsky Performance Index từ 0 - 100 điểm) [6]: Triệu chứng lâm sàng, các hội chứng (u, cận u) tại thời điểm nghiên cứu. Phân loại bệnh nhân theo các chỉ tiêu phân loại TNM [5]. Quy trình tiếp nhận và lưu mẫu bệnh phẩm được tiến hành tại Bệnh viện Quân y 175. Thu nhận 5ml máu từ mỗi bệnh UTPKTBN và HC, sau đó tiến hành lưu mẫu theo quy trình.

2.2.2. Phương pháp đánh giá biểu hiện mRNA của VEGF

Mức độ biểu hiện mRNA của gen *VEGF* trong huyết thanh của bệnh nhân UTPKTBN và HC được xác định bằng phương pháp realtime PCR. RNA tổng số được tách chiết từ mẫu huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN và HC bằng cách sử dụng bộ kit tách RNA của hãng Thermo Scientific (Hoa Kỳ), quy trình theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu cDNA được tổng hợp từ RNA bằng cách sử dụng bộ sinh phẩm tổng hợp cDNA của hãng Thermo Scientific.

Thành phần phản ứng real-time PCR cho từng phản ứng bao gồm master mix SYBR Maxima 2X, primers 5pm (VEGF và ABL), nước khử ion và cDNA template. Tổng thể tích của phản ứng là 12μl. Chu trình nhiệt cho phản ứng real-time PCR chạy chung cho ABL và VEGF là 50°C: 2 phút, 95°C: 10 phút, 95°C: 15 giây, 45 chu kỳ.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập và quản lý bằng Excel 2010 và được phân tích bằng phần mềm SPSS v.19. Kiểm định sự khác biệt giữa các biến định lượng phân bố

không chuẩn bằng phương pháp Mann-Whitney U test. Hệ số tương quan Spearman's rho được dùng để khảo sát mối tương quan giữa các biến liên tục.

Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong các phân tích so sánh khi giá trị $p < 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

- Đặc điểm về tuổi và giới

Bảng 1. Đặc điểm về tuổi và giới

Đặc điểm		Nhóm UTPKTBN (n = 100)	Nhóm HC (n = 51)	p
Tuổi (Mean $\pm$ SD) (Năm)		60 $\pm$ 10,5	53,8 $\pm$ 2,9	>0,05
Giới	Nam	73	35	>0,05
	Nữ	27	16	

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tuổi và giới giữa nhóm bệnh nhân UTPKTBN và nhóm HC ($p > 0,05$).

- Triệu chứng lâm sàng

Ho là triệu chứng phổ biến nhất chiếm đến 83%, sau đó là đau ngực chiếm đến 56%, khó thở chiếm đến 20%, sụt cân chiếm 17% và có hạch chiếm 8%.

- Vị trí khối ung thư

Khối ung thư gặp ở phổi phải nhiều hơn phổi trái: 61/100 (61%) bệnh nhân có khối u ở phổi phải (34 u ở thùy trên, 9 u thùy giữa, 18 u thùy dưới), 39/100 (39%) bệnh nhân có u phổi trái (26 có khối u ở thùy trên, 13 có khối u ở thùy dưới).

- Mô bệnh học

Kết quả mô bệnh học có 91/100 (91%) bệnh nhân carcinoma tuyến, 9/100 (9%) bệnh nhân carcinoma tế bào gai không có carcinoma tế bào lớn, và carcinoma tế bào gai-tuyến.

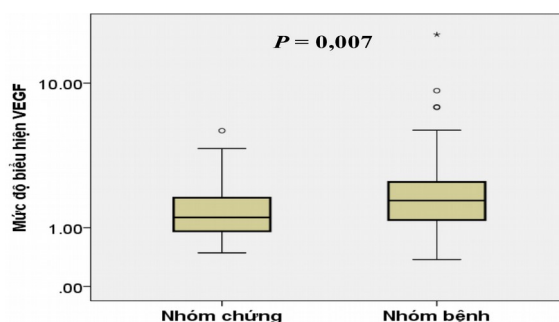
- Phân loại giai đoạn theo TNM

Trong 91 bệnh nhân UTPKTBN được đánh giá giai đoạn và phân thành các giai đoạn IA, IIA, IIIB và IV theo hệ thống phân loại TNM [5], đa số các bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu ở giai đoạn muộn IV (76%), 15% số bệnh nhân ở giai đoạn IIIB, 5% số bệnh nhân ở giai đoạn IIA, 2% số bệnh nhân ở các giai đoạn IA và 2% số bệnh nhân ở giai đoạn IIIA. Không thấy bệnh nhân ở giai đoạn IB và IIB.

3.2. Mức độ và mối liên quan của mRNA VEGF ở nhóm nghiên cứu

- Mức độ biểu hiện mRNA của VEGF ở nhóm nghiên cứu

Biểu hiện tương đối mRNA của gene VEGF ở nhóm UTPKTBN và nhóm HC được tính bằng ΔCt hiệu chỉnh với sự biểu hiện của gene nội chứng ALB. Kết quả phân tích cũng cho thấy sự biểu hiện tương đối của gene VEGF ở nhóm bệnh nhân UTPKTBN cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p = 0,007$) (Hình 1).



Hình 1. Mức độ biểu hiện mRNA của VEGF ở nhóm nghiên cứu

- Mối liên quan giữa biểu hiện mRNA của VEGF với một số chỉ số lâm sàng và cận lâm sàng

Độ biệt hóa của khối u phản ánh mức độ ác tính của các tế bào ung thư. Để đánh giá mối liên quan của biểu hiện gene VEGF với sự biệt hóa của khối u, chúng tôi phân tích so sánh mức độ biểu hiện của VEGF giữa những mức độ biệt hóa khác nhau bao gồm grade 1, grade 2 và grade 3. Mức độ biểu hiện tương đối của VEGF được so sánh giữa ba nhóm (Bảng 2).

Bảng 2. Mối liên quan giữa mRNA VEGF với độ biệt hóa của khối u

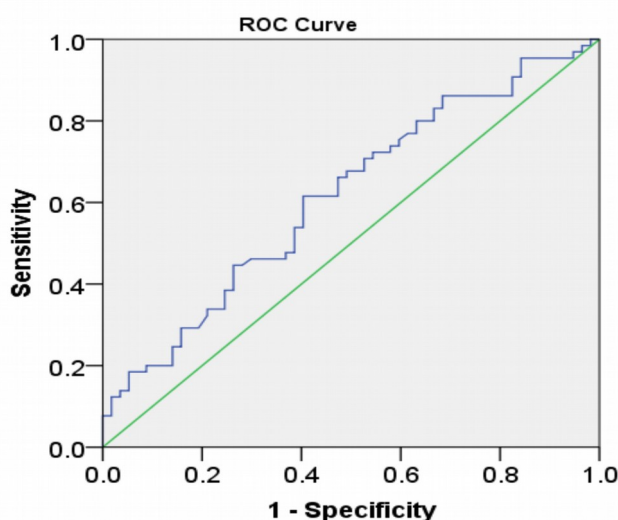
	UTPKTBN (n = 63)	Độ biệt hóa của khối u			p
		Grade 1 (n = 6)	Grade 2 (n = 35)	Grade 3 (n = 22)	
mRNA VEGF	2,3 ± 2,4	6,1 ± 6,5	1,9 ± 1,3	1,9 ± 0,9	>0,05

Mức độ biểu hiện mRNA của VEGF không khác biệt ở các bệnh nhân ung thư có mức độ biệt hóa khác nhau ($p>0,05$).

Phân tích mối liên quan của biểu hiện gene VEGF với các chỉ số cận lâm sàng khác thì không thấy có sự liên quan giữa biểu hiện mRNA của VEGF với chỉ số huyết học, nồng độ glucose, chỉ số điện giải như nồng độ Na^+ , K^+ và CL^- , chức năng gan và thận và giai đoạn bệnh ($p>0,05$).

- Giá trị chẩn đoán ung thư phổi của biểu hiện mRNA của VEGF

Để đánh giá giá trị chẩn đoán của biểu hiện mRNA của VEGF đối với ung thư phổi, chúng tôi phân tích diện tích dưới đường cong biểu hiện mRNA của VEGF phân biệt giữa bệnh nhân UTPKTBN và người bình thường không ung thư (Hình 2).



Hình 2. Diện tích dưới đường cong AUC biểu hiện mRNA của VEGF

Kết quả phân tích cho thấy giá trị diện tích dưới đường cong AUC là 0,615 ($p=0,028$). Với giá trị cut-off của mRNA VEGF là 1,586 thì độ nhạy là 0,62 và độ đặc hiệu là 0,6. Kết quả này cho thấy mức độ biểu hiện mRNA của VEGF trong huyết thanh có khả năng phân biệt các bệnh nhân UTPKTBN và nhóm HC.

4. Bàn luận

Ung thư phổi nguyên phát là một trong những bệnh lý ác tính thường gặp nhất hiện nay và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong các bệnh lý ung thư. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự biểu hiện mRNA của các gene VEGF trong huyết tương của các bệnh nhân ung thư phổi cao hơn hẳn so với những người khỏe mạnh. Điều này cho thấy

việc xác định mức độ biểu hiện của các gene VEGFR trong huyết tương có thể là một trong những phương pháp tiềm năng, không xâm lấn để chẩn đoán và sàng lọc ung thư phổi.

Trong số những yếu tố mạch tham gia vào quá trình hình thành mạch máu liên quan đến khối u thì VEGF được biết đến là một trong những yếu tố quan trọng nhất trong các điều kiện sinh lý bình thường và trong bệnh lý. Đánh giá sự biểu hiện của gene VEGF trong tế bào hoặc mô là rất quan trọng trong việc nghiên cứu vai trò của VEGF trong quá trình tạo mạch [7]. Nghiên cứu chỉ ra rằng biểu hiện của VEGF có liên quan mật thiết với UTPKTBN [8]. Một nghiên cứu đánh giá sự biểu hiện mRNA của VEGF trên ba nhóm bệnh nhân bao gồm ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư biểu mô tuyến, và ung thư biểu mô tế bào không biệt hóa. Kết quả cho thấy trong 65% trường hợp thì biểu hiện mRNA của VEGF cao hơn trong mô ung thư so với mô bình thường. Biểu hiện mRNA của VEGF cao hơn trong ung thư biểu mô không phải tế bào vảy và cao hơn ở khối u với di căn hạch [9]. Tương tự như vậy, nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra rằng biểu hiện mRNA của VEGF ở máu ngoại vi cũng cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm bệnh nhân UTPKTBN so với nhóm chứng không ung thư.

Trong một nghiên cứu phân tích tổng hợp trên 5.386 bệnh nhân ung thư phổi từ 51 nghiên cứu khác nhau trên thế giới đã chỉ ra rằng biểu hiện quá mức của VEGF có tác động tiêu cực đến thời gian sống thêm của cả các bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ và bệnh nhân UTPKTBN [4]. Một nghiên cứu đánh giá khả năng ứng dụng trong chẩn đoán của mRNA VEGF đối với ung thư phổi. Nghiên cứu chỉ ra rằng biểu hiện của mRNA VEGF tăng lên rất đáng kể ở nhóm ung thư so với nhóm lành tính và hiệu quả chẩn đoán của mRNA VEGF đạt độ nhạy trên 89% và độ chính xác trên 90% [10]. Một nghiên cứu khác đánh giá vai trò của VEGF trong quá trình tăng sinh và trưởng thành của ung thư phổi thì thấy rằng sự biểu hiện của VEGF không những tăng cường sự tăng sinh của các tế bào biểu bì mà còn kích thích sự biệt hóa của các tế bào ung thư phổi [11]. Trong nghiên cứu này, cho thấy có tăng cường biểu hiện rõ rệt của mRNA VEGF ở bệnh nhân

UTPKTBN so với người bình thường ($p=0,007$). Kết quả phân tích so sánh cho thấy gene VEGF có vai trò trong quá trình phát triển của UTPKTBN.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, phân tích giá trị chẩn đoán bệnh nhân UTPKTBN cho thấy biểu hiện mRNA của VEGF có khả năng chẩn đoán UTPKTBN so với người bình thường với giá trị $AUC = 0,615$ (độ nhạy 0,62, độ đặc hiệu 0,6, $p=0,028$). Do đó, nghiên cứu này cùng với các nghiên cứu trước đó chỉ ra rằng đánh giá sự biểu hiện mRNA của VEGF trong huyết tương là một biện pháp không can thiệp cho phép chẩn đoán sàng lọc sớm UTPKTBN ở những nhóm nguy cơ cao như ở những bệnh nhân có bệnh phổi, có tiền sử gia đình bị ung thư phổi, hay ở những nhóm thường xuyên tiếp xúc với các tác nhân độc hại như nhóm những người hút thuốc, nhóm lao động trong hầm mỏ.

5. Kết luận

Có sự tăng cao rõ rệt mức độ biểu hiện mRNA của gene VEGF huyết tương ở bệnh nhân UTPKTBN so với người bình thường ($p<0,05$). Biểu hiện mRNA của VEGF có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh nhân UTPKTBN với giá trị $AUC = 0,615$, (độ nhạy 0,62, độ đặc hiệu 0,6, $p=0,028$).

Tài liệu tham khảo

1. Bray F, Ferlay J et al (2018) *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin 68(6): 394-424.
2. William D, Travis MD (2010) *Histological classification of NSCLC in the small biopsy and molecular era*. Excellence In Oncology.
3. Lai Y, Wang X et al (2018) *Serum VEGF levels in the early diagnosis and severity assessment of non-small cell lung cancer*. J Cancer 9(9): 1538-1547.
4. Zhan P, Wang J et al (2009) *Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: A systematic review with meta-analysis*. J Thorac Oncol 4(9): 1094-1103.

5. William DT, Elisabeth B et al (2015) *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. WHO Classification of Tumours, Volume 7.
6. Buccheri G, D Ferrigno, and M Tamburini (1996) *Karnofsky and ECOG performance status scoring in lung cancer: A prospective, longitudinal study of 536 patients from a single institution*. Eur J Cancer 32(7): 1135-1141.
7. Khandekar MJ, Piotrowska Z, Willers H et al (2018) *Role of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors and radiation in the management of brain metastases from EGFR mutant lung cancers*. Oncologist.
8. Kim MS, Park TI, Lee YM et al (2013) *Expression of Id-1 and VEGF in non-small cell lung cancer*. Int J Clin Exp Pathol 6(10): 2102-2111.
9. Yuan A, Yu CJ, Luh KT et al (2000) *Quantification of VEGF mRNA expression in non-small cell lung cancer using a real-time quantitative reverse transcription-PCR assay and a comparison with quantitative competitive reverse transcription-PCR*. Lab Invest 80(11): 1671-1680.
10. Cha N, Lv M, Zhao YJ et al (2014) *Diagnostic utility of VEGF mRNA and SP1 mRNA expression in bronchial cells of patients with lung cancer*. Respirology 19(4): 544-548.
11. Usuda K et al (2018) *Expression and prognostic impact of VEGF, CD31 and alphaSMA in resected primary lung cancers*. Anticancer Res 38(7): 4057-4063.