

BƯỚC ĐẦU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÁT HIỆN EBNA-1 Ở CÁC MẪU MÔ THU NHẬN TỪ BỆNH NHÂN UNG THƯ Vòm HỌNG

Ngày nhận bài: 16/06/2015

Ngày nhận lại: 11/07/2015

Ngày duyệt đăng: 26/10/2015

Lao Đức Thuận¹
Nguyễn Hoàng Anh Tuấn²
Nguyễn Thị Yến Tuyết³
Nguyễn Hữu Dũng⁴
Lê Huyền Ái Thủy⁵

TÓM TẮT

Tại Việt Nam, ung thư vòm họng là dạng ung thư phổ biến nhất trong các bệnh ung thư thuộc vùng đầu và cổ. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng sự xâm nhiễm của Epstein – Barr virus (EBV) có mối quan hệ mật thiết và là một trong những nguyên nhân gây bệnh ung thư vòm họng. Nhằm hướng tới việc xây dựng quy trình chẩn đoán sớm bệnh ung thư vòm họng, chúng tôi lựa chọn gen EBNA-1 (Epstein – Barr nuclear antigen 1), một gen cần thiết cho sự xâm nhiễm của EBV, làm gen mục tiêu cho việc xây dựng quy trình phát hiện sự hiện diện của EBV. Trong nghiên cứu bước đầu, chúng tôi tiến hành thống kê tần số trung bình trọng số về sự hiện diện của EBV trong nhiều loại mẫu bệnh phẩm khác nhau. Đồng thời, chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình PCR phát hiện gen EBNA-1 trên các mẫu mô bệnh ung thư vòm họng thu nhận từ Bệnh Viện Chợ Rẫy. Kết quả nghiên cứu bước đầu này là tiền đề cho việc phát triển các phương pháp chẩn đoán không xâm lấn nhằm chẩn đoán sớm bệnh ung thư vòm họng dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử trên đối tượng các gen liên quan đến sự xâm nhiễm của EBV.

Từ khóa: EBV, EBNA-1, ung thư vòm họng.

ABSTRACT

In Viet Nam, Nasopharyngeal carcinoma (NPC), originating in the nasopharynx, is the most common cancer of the head and neck cancers. The association of NPC with Epstein – Barr virus (EBV) firmly demonstrated that EBV played an important role in nasopharynx carcinogenesis. For the aim to establish the method for early diagnosis and prognosis of NPC, EBNA-1 (Epstein – Barr nuclear antigen 1) which is necessary for infection of EBV, was chosen as target gene to establish the method for detection of EBV. In this study, we systematically analyzed the mean of percentage weighted of the presence of EBNA-1 in various sources of sample. Moreover, we initially succeed to establish the PCR method for detection of EBNA-1 in biopsy tissues collected from nasopharyngeal cancer patients in Cho Ray hospital. These results indicated that, in the future, it will be useful in developing a non-invasive method for early diagnosis and prognosis of NPC based on molecular techniques in detection of concerning genes which were EBV infection required.

Keyword: EBNA-1, EBV, Nasopharyngeal carcinoma.

¹ ThS, Trường Đại học Mở TP.HCM.

² Trường Đại học Mở TP.HCM.

³ Trường Đại học Mở TP.HCM.

⁴ TS. BS, Bệnh viện Chợ Rẫy TP.HCM.

⁵ PGS.TS, Trường Đại học Mở TP.HCM. Email: thuy.lha@ou.edu.vn

1. Giới thiệu

Ung thư vòm họng (Nasopharyngeal carcinoma) là một khối u ác tính xuất phát từ lớp biểu mô của vòm họng. Đồng thời, đây là loại ung thư phổ biến nhất trong các bệnh lý vùng đầu (Phúc và cộng sự, 2008; Yang và cộng sự, 2014). Tỷ lệ mắc bệnh ung thư vòm họng có sự khác biệt địa lý giữa các khu vực khác nhau. Trong đó, Việt Nam nằm trong khu vực có tỷ lệ mắc bệnh cao, cụ thể theo thống kê năm 2012 (WHO), thấy tỷ lệ mắc bệnh ung thư vòm họng và tử vong lần lượt lên đến 3,9% và 3,3% dân số (World Health Organization, 2012).

EBV (Epstein – Barr virus) là virus có tính nhiễm phổ rộng trong cộng đồng được phát hiện ở 90% người trưởng thành, thuộc nhóm *Herpes virus* type 4 và được nghiên cứu rất sớm từ năm 1980 (Phúc và cộng sự, 2008; Niedobitek, 2000). Sự xâm nhiễm của EBV là một trong ba nguyên nhân chính bao gồm: (1) sự xâm nhiễm của EBV; (2) môi trường sống thói quen sinh hoạt; (3) biến đổi di truyền dẫn đến hình thành ung thư vòm họng (Frappier, 2012; Tao và cộng sự, 2007). Trên thế giới, rất nhiều công trình nghiên cứu đã chứng minh sự hiện diện của phân tử DNA, RNA, các protein của virus biểu hiện ở các tế bào ung thư vòm họng và các tế bào bị nhiễm EBV có nguy cơ tiến triển thành ung thư vòm họng. Chẳng hạn, nghiên cứu của Chang và cộng sự (1990) thực hiện trên 50 mẫu mô vòm họng không biệt hóa, kết quả cho thấy EBV-DNA hiện diện trong các mẫu mô với lượng bản sao rất cao (Thompson và cộng sự, 2004). *EBNA-1* (Epstein – Barr nuclear antigen 1) là một gen thuộc họ EBNA nằm trong bộ gen của EBV, có vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm, nhân lên và duy trì bộ gen EBV trong mô ung thư vòm họng. Đồng thời, *EBNA-1* còn đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì trạng thái tiềm tàng của EBV (Chang và cộng sự, 1990; Frappier, 2012; Tao và cộng sự, 2007). Cụ thể hơn, *EBNA-1* mã hóa cho protein EBNA-1, EBNA-1 tương tác với vị trí OriP, điểm vị trí khởi đầu sao chép, khởi phát sự nhân lên của EBV-DNA

(Frappier, 2012; Thompson và cộng sự, 2004). Hơn nữa, EBNA-1 còn có vai trò trong việc kích hoạt sự biểu hiện của các gen khác trong giai đoạn tiềm tàng như *LMP-1*, *LMP-2*, *BARTs*,... (Brooks và cộng sự, 1992; Frappier, 2012; Thompson và cộng sự, 2004). Do đó, gen *EBNA-1* và sản phẩm của nó được tìm thấy hầu hết các khối u vòm họng liên quan đến EBV (Brooks và cộng sự, 1992; Phúc và cộng sự, 2008; Zhang và cộng sự, 2012). Chính đặc điểm này đã mở ra một khuynh hướng sử dụng EBV-DNA hay các gen liên quan nhằm phát triển một kỹ thuật chẩn đoán sớm không xâm lấn bệnh ung thư vòm họng, từ đó nâng cao hiệu quả điều trị và khả năng sống sót của bệnh nhân.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi hệ thống hóa lại các dữ liệu khoa học nghiên cứu liên quan trên đối tượng ung thư vòm họng và gen *EBNA-1* trong các loại bệnh phẩm khác nhau. Đồng thời, bước đầu xây dựng quy trình PCR phát hiện sự hiện diện của gen *EBNA-1* trong các mô sinh thiết từ bệnh nhân vòm họng được lưu giữ và bảo quản trong hai dung môi khác nhau là Formalin và PBS.

2. Vật liệu và phương pháp

Mẫu nghiên cứu

6 mẫu mô sinh thiết từ bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh ung thư vòm họng thu nhận từ bệnh viện Chợ Rẫy Thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu mô được lưu giữ bảo quản ở nhiệt độ 4 °C trong hai loại dung môi khác nhau: formalin và PBS (Phosphate buffer saline).

Khai thác dữ liệu

Các bài báo dữ liệu khoa học liên quan được khai thác trên cơ sở dữ liệu NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) bằng các từ khóa như: nasopharyngeal carcinoma (ung thư vòm họng), *EBNA-1*, EBV (Epstein – Barr virus), non-invasion method (phương pháp không xâm lấn), v.v... Dữ liệu khai thác được sử dụng để thống kê, xác định tần số trung bình có trọng số của sự hiện diện của gen *EBNA-1* trên nhiều loại mẫu bệnh phẩm ung thư khác nhau như mẫu dịch phết, mô sinh thiết, máu, v.v... bằng các kỹ thuật sinh học phân tử khác

nhau như PCR, Real-time PCR, v.v...

Tách chiết DNA

Các mẫu bệnh phẩm được tách chiết theo phương pháp Phenol/Chloroform theo quy trình tách chiết của Chomczynski và Sacchi (1987) có sự cải biến Phenol từ pH=4 thành pH=8 (Chomczynski, 1987). Nồng độ và độ tinh sạch DNA từ các mẫu bệnh phẩm sau tách chiết được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang thông qua tỉ lệ

A_{260}/A_{280} nm. Sau khi tách chiết, DNA mẫu được lưu giữ trong TE (Tris-EDTA) và bảo quản ở nhiệt độ -20 °C cho đến khi sử dụng sau này.

Phản ứng PCR khuếch đại gen *EBNA-1*

Trình tự cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR khuếch đại gen *EBNA-1* được tham khảo từ công trình nghiên cứu của Adam và cộng sự (2011). Trình tự cặp mồi được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Kí hiệu	Trình tự	Chiều dài sản phẩm
EBNA-F (Mồi xuôi)	TGAATACCACCAAGAAGGTG	223 bp
EBNA-R (Mồi ngược)	AGTTCCTTCGTCGGTAGTC	

Chu trình phản ứng PCR được thiết kế như sau: 1 chu kỳ với 95°C-5 phút, 40 chu kỳ lặp lại với 95°C-30 giây, 42,5°C-30 giây, 72°C-30 giây và 1 chu kỳ với 72°C-5 phút. Tổng thể tích phản ứng là 15 µl bao gồm: 7,5 µl Mastermix 2X, 1 µl mồi (0,5 µl mồi xuôi, 0,5 µl mồi ngược), 5,5 µl ddH₂O, 1 µl DNA. Sản phẩm phản ứng PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5% và gửi giải trình tự tại công ty Nam Khoa. Kết quả giải trình tự được tiến hành hiệu chỉnh và

kiểm tra mức độ tương đồng trên cơ sở dữ liệu Genbank (NCBI).

3. Kết quả và thảo luận

Khai thác dữ liệu

Cho đến nay, chúng tôi khai thác được 13 công trình nghiên cứu trên thế giới liên quan để tiến hành thống kê đánh giá về loại mẫu sử dụng, cỡ mẫu, phương pháp sử dụng nhằm phát hiện sự hiện diện của gen *EBNA-1* trên bệnh ung thư vòm họng. Kết quả thống kê được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Thống kê loại mẫu và phương pháp được sử dụng trong phát hiện *EBNA-1*

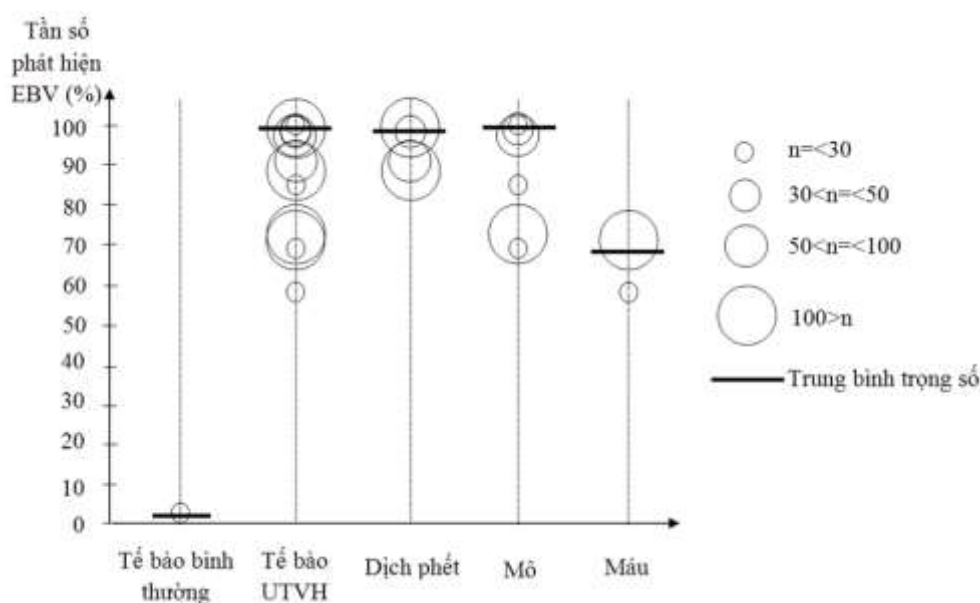
	Mô sinh thiết	Dịch phết	Máu	Mô đúc paraffin	Tổng cộng n(%)
Multiplex Methylation Specific PCR	1	1	-	-	2 (15,4)
Nucleic Acid Sequence – Based Amplification	1	-	-	-	1 (7,7)
Real – Time PCR	-	1	-	1	2 (15,4)
PCR	2	1	1	-	4 (30,7)
Nested PCR	-	-	1	-	1 (7,7)

	Mô sinh thiết	Dịch phết	Máu	Mô đúc paraffin	Tổng cộng n(%)
Nested PCR and Sequencing	1	-	-	-	1 (7,7)
Quantitative PCR	1	1	-	-	2 (15,4)
Tổng cộng	6 (46,1)	4 (30,8)	2 (15,4)	1 (7,7)	13 (100,0)

Ghi chú: - không có sử dụng trong nghiên cứu

Kết quả thống kê cho thấy phương pháp sử dụng chủ yếu trong việc phát hiện *EBNA-1* trong các nghiên cứu trên thế giới là phương pháp PCR (chiếm 30,7%). Bên cạnh đó, về loại mẫu sử dụng, chủ yếu là mô sinh thiết

(46,1%) và dịch phết (30,8%). Từ cơ sở dữ liệu thu thập được, chúng tôi tiến hành thống kê tần số trung bình phát hiện gen *EBNA-1* trong nhiều loại mẫu mô khác nhau được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Thống kê sự hiện diện của EBV trong tế bào bình thường, tế bào ung thư vòm họng (UTVH), trong các loại mẫu bằng thống kê trung bình có trọng số

Chú thích: tâm đường tròn thể hiện tần số của các bài báo nghiên cứu trên gen *EBNA-1* nhằm phát hiện EBV, kích thước đường tròn thể hiện số lượng mẫu trong các nghiên cứu, đường thẳng nằm ngang thể hiện tần số xuất hiện EBV trung bình có trọng số.

Kết quả thống kê tần số trung bình trọng số phát hiện gen *EBNA-1* ở tế bào ung thư vòm họng, dịch phết, mô và máu lần lượt là 99,24%, 99,70%, 98,55% và 68,85%. Ngoài ra, tần số trung bình trọng số ở các mẫu tế bào bình thường là 0%. Kết quả cho thấy có sự khác biệt rất lớn của sự hiện diện gen *EBNA-1* ở các mẫu

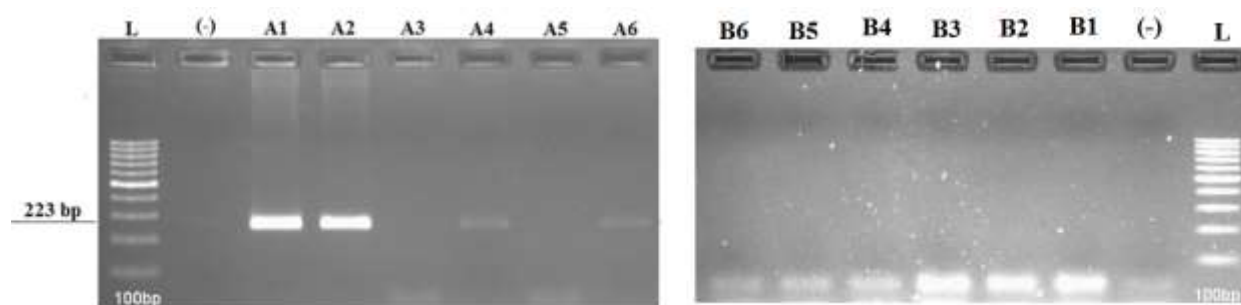
ung thư so với tế bào bình thường. Điều này cho thấy, sự hiện diện của gen *EBNA-1* là dấu hiệu đặc trưng cho bệnh nhân ung thư vòm họng và có thể hướng tới việc sử dụng như một dấu chứng sinh học trong chẩn đoán sớm ung thư vòm họng. Ngoài ra, chúng tôi nhận thấy tần số trung bình trọng số ở mẫu dịch phết và

mô rất cao và có giá trị tần số gần bằng nhau. Đồng thời, theo kết quả thống kê loại mẫu sử dụng thì mẫu dịch phết và mẫu mô là hai loại mẫu được sử dụng nhiều nhất. Do đó, việc sử dụng hai loại mẫu này là thích hợp cho việc phát hiện sự hiện diện của gen *EBNA-1* bằng kỹ thuật PCR. Tuy nhiên, trong giới hạn nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn sử dụng loại mẫu mô sinh thiết làm đối tượng nghiên cứu để phát hiện gen *EBNA-1* bằng kỹ thuật PCR. Một vấn đề cần lưu ý là khi thu nhận mẫu mô sinh thiết cần phải được lưu giữ và bảo quản bằng dung dịch nào thích hợp. Theo các nghiên cứu trên thế giới, hai loại dung dịch được sử dụng trong bảo quản nhiều nhất là dung dịch Formalin và PBS. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát trên các mẫu mô sinh thiết

được lưu giữ bằng hai dung dịch này.

Khuếch đại *EBNA-1*

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát việc khuếch đại gen *EBNA-1* từ các mẫu mô sinh thiết thu nhận từ bệnh nhân được chẩn đoán ung thư vòm họng được lưu giữ ở hai dung môi bảo quản là PBS (ký hiệu từ A1 đến A6) và Formalin (ký hiệu từ B1 đến B6). DNA sau khi tách chiết được tiến hành kiểm tra mức độ tinh sạch và nồng độ DNA bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260 nm và 280 nm. Nhìn chung, các mẫu tách chiết đều có tỷ số A_{260}/A_{280} nằm trong khoảng chấp nhận được, có thể sử dụng để thực hiện phản ứng PCR khuếch đại gen mục tiêu (Dữ liệu không trình bày).



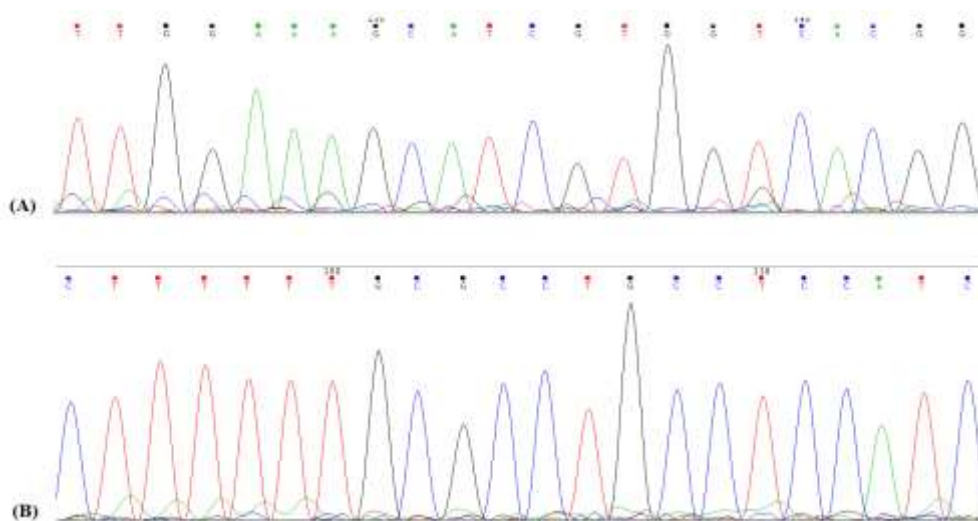
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen *EBNA-1* các mẫu mô sinh thiết ung thư vòm họng

Ghi chú: L: thang DNA 100 bp; (-): mẫu chứng âm; A1 đến A6: 6 mẫu mô sinh thiết được lưu giữ trong dung dịch PBS; B1 đến B6: 6 mẫu mô sinh thiết được lưu giữ trong dung môi Formalin.

Dựa trên kết quả điện di, tại các mẫu được lưu giữ bằng dung dịch PBS xuất hiện một băng với kích thước khoảng 223 bp ở các mẫu A1, A2, A4 và A6. Kích thước sản phẩm này phù hợp với kích thước gen *EBNA-1* được khuếch đại với cặp mồi EBNA-F và EBNA-R. Ở các giếng A3, A5 không ghi nhận được bất kỳ một băng nào. Đối với các mẫu được lưu giữ bằng dung dịch Formalin, ở các giếng từ B1 đến B6 không ghi nhận được bất kỳ một băng nào, chỉ ghi nhận được các băng ký sinh có kích thước dưới 100 bp, các băng này được dự đoán là các dạng cấu trúc thứ cấp của mồi. Từ kết quả PCR ghi nhận rằng việc bảo quản mô sinh thiết bằng dung dịch Formalin ảnh hưởng đến chất lượng của DNA-EBV. Điều

này có thể giải thích rằng: các mẫu mô sinh thiết lưu giữ trong dung dịch Formalin trong một khoảng thời gian dài hơn 12 – 24 tiếng, kết quả dẫn đến sự phân hủy của DNA thông qua việc bẻ gãy các liên kết của phân tử DNA. Điều này hoàn toàn phù hợp với nhận định của Campos và Gilbert (2012) (Campos và cộng sự, 2012). Do đó, chúng tôi lựa chọn dung dịch PBS làm dung dịch lưu giữ, bảo quản mẫu mô sinh thiết ung thư vòm họng ở nhiệt độ 4 °C.

Nhằm khẳng định các băng có kích thước 223 bp là gen *EBNA-1*, chúng tôi tiến hành giải trình tự một mẫu đại diện. Kết quả giải trình tự được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR: (A) mạch xuôi; (B) mạch ngược

Dựa trên kết quả giải trình tự cho thấy các peak của sản phẩm đều rất rõ ràng chỉ trừ một số nucleotide tại phần đầu của trình tự. Điều này được giải thích, tại vị trí mỗi bắt cặp, khi giải trình tự tín hiệu vùng này không rõ ràng. Vùng này sẽ được loại bỏ khi tiến hành hiệu chỉnh trình tự. Đoạn trình tự ở giữa rõ ràng được kiểm tra mức độ tương đồng bằng chương trình BLAST. Kết quả BLAST cho thấy, trình tự thu nhận được có độ tương đồng cao với trình tự gen *EBNA-1* của *human herpes virus 4* (Mã số truy cập: HQ827839) với các giá trị độ tương đồng 98%, giá trị e-value gần bằng 0 (Ident = 98%, E-value = 4e-101). Như vậy, chúng tôi đã khuếch đại thành công gen *EBNA-1* ở mẫu mô sinh thiết thu nhận từ bệnh nhân ung

thư vòm họng được lưu giữ bảo quản bằng dung dịch PBS.

4. Kết luận

Từ kết quả khai thác dữ liệu, chúng tôi ghi nhận rằng sự hiện diện của gen *EBNA-1* là một dấu chứng đặc trưng cho bệnh nhân ung thư vòm họng. Về thực nghiệm, chúng tôi đã bước đầu xây dựng thành công quy trình phát hiện gen *EBNA-1* bằng phương pháp PCR trên đối tượng mẫu mô sinh thiết được lưu giữ trong dung dịch PBS ở nhiệt độ 4 °C. Các kết quả bước đầu này cho phép chúng tôi hướng tới việc khảo sát sự hiện diện của gen *EBNA-1* trên số lượng mẫu bệnh phẩm lớn hơn để hướng tới việc ứng dụng xây dựng một phương pháp chẩn đoán sớm ung thư vòm họng ở người Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adam, A. A. M., Abdullah, N. E., Khalifa, E. H., Hassan, L. A. M., Elamin, E. M., Hamad, K. M., Ibrahim, M. E., & Hassan, E. H. (2011). Pathology of nasopharyngeal carcinoma in Sudanese patients and its Association with Epstein-Barr Virus: A Report from a single center in Khartou, *Advances in Tumor Virology*, 2, 1-6.
- Brooks, L., Yao, Q. Y., Rickinson, A. B., & Young, L. S. (1992). Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of *EBNA1*, *LMP1*, and *LMP2* transcripts, *J Virol.*, 66(5), 2689-2697.

- Campos, P. F., & Gilbert, T. M. (2012). DNA extraction from formalin-fixed material, *Methods in Molecular Biology*, 840, 81-85.
- Chang, Y. S., Tyan, Y. S., Liu, S. T., Tsai, M. S., & Pao, C. C. (1990). Detection of Epstein-Barr virus DNA sequences in nasopharyngeal carcinoma cells by enzymatic DNA amplification, *J Clin Microbiol.*, 28(11), 2398-2402.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159.
- Chu, E. A., Wu, J. M., Tunkel, D. E. & Ishman, S. L. (2008). Nasopharyngeal Carcinoma: The Role of the Epstein - Barr virus, *Medscape J Med*, 10(7), 165.
- Frappier, L. (2012). Role of EBNA1 in NPC tumorigenesis, *Semin Cancer Biol.*, 22(2), 154-61.
- Nguyễn Đình Phúc, Lê Thanh Hòa (2008). Virus Epstein-barr ung thư vòm mũi họng và một số phương pháp hiện đại ứng dụng trong chẩn đoán. *Tạp chí Công Nghệ sinh học*, 6(1), 1-18.
- Niedobitek, G. (2000). Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Pathol*, 53(5), 248-254.
- Sham, J. S., Poon, Y. F., Wei, W.I. & Choy, D. (1990). Nasopharyngeal carcinoma in young patients, *Cancer*, 65, 2606-2610.
- Tao, Q. & Chan, A. T. (2007). Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments, *Expert Rev Mol Med.*, 9(12), 1-24.
- Thompson, M. P. & Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr virus and cancer, *Clin Cancer Res.*, 10(3), 803-821.
- World Health Organization, (2012). Estimated cancer incidence, Mortality and prevalence worldwide in 2012, International agency for research on cancer.
- Yang, J., Zhou, M., Zhao, R., Peng, S., Luo, Z., Li, X., ... Li, G. (2014). Identification of candidate biomarkers for the early detection of nasopharyngeal carcinoma by quantitative proteomic analysis, *J Proteomics.*, 109, 162-175.
- Zhang, Z., Sun, D., Hutajulu, S. H., Nawaz, I., Nguyen Van, D., Huang, G., ... Hu, L. F. (2012). Development of a non-invasive method, multiplex methylation specific PCR (MMSP), for early diagnosis of nasopharyngeal carcinoma, *PLoS One.*, 7(11), e45908.