

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐẶNG THỊ TUYẾT MINH

**NGHIÊN CỨU SỰ THAY ĐỔI CỦA
HEPARANSULFATE INTERACTING PROTEIN (HIP) VÀ EPIDERMAL GROWTH
FACTOR RECEPTOR (EGFR) Ở MÔ UNG THƯ VÚ**

***Chuyên ngành :* Hóa sinh Y học**

Mã số : 62.72.04.01

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2010

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI :
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

Người hướng dẫn khoa học :

**PGS.TS. Tạ Thành Văn
PGS.TS. Nguyễn Thị Hà**

PHẢN BIỆN 1: GS. TSKH. Đái Duy Ban - Viện công nghệ sinh học

PHẢN BIỆN 2: PGS. TS. Bạch Vọng Hải - Học viện quân Y.

PHẢN BIỆN 3: PGS. TS. Ngô Thị Thu Thoa - Bệnh viện K

Luận án sẽ được bảo vệ trước hội đồng chấm luận án cấp Trường tại Trường Đại học Y Hà Nội.

Vào 15 giờ ngày 19 tháng 11 năm 2010

CÓ THỂ TÌM HIỂU LUẬN ÁN TẠI

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội
- Viện Thông tin – Thư viện Y học Trung ương

MỘT SỐ CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Tạ Thành Văn, **Đặng Thị Tuyết Minh** (2006), “Heparansulfate interacting protein (HIP) điều hòa sự phát triển tế bào thông qua mitogen – activated protein kinase (MAPK)”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, số 3(20), tr 49-54.
2. **Đặng Thị Tuyết Minh**, Trần Văn Khánh, Nguyễn Thị Hà, Tạ Thành Văn (2008), “Tăng cường sao chép Heparansulfate interacting protein (HIP) ở mô ung thư vú”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, số 53(1), tr 8-15.
3. **Đặng Thị Tuyết Minh**, Trần Văn Khánh, Trần Thị Chính, Tạ Thành Văn (2008), “Đánh giá mức độ sao chép mRNA của EGFR ở mô ung thư vú”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, số 59(6), tr 29-33.
4. **Đặng Thị Tuyết Minh**, Trần Văn Khánh, Nguyễn Thị Hà, Tạ Thành Văn (2009), “Đánh giá mức độ biểu hiện protein HIP ở mô ung thư vú theo các giai đoạn và các thể tế bào học khác nhau”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, số 354 (1), tr 27-32.

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Ung thư vú (UTV), một bệnh ung thư hay gặp nhất ở phụ nữ và là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư ở phụ nữ trên toàn thế giới. Năm 2006, UTV là loại ung thư thường gặp nhất ở phụ nữ Hoa Kỳ và Châu Âu. Ở Việt Nam, tỷ lệ mắc bệnh UTV có xu hướng tăng dần và trong những năm gần đây UTV cũng là loại thường gặp nhất ở phụ nữ. Mặc dù tỷ lệ mắc bệnh UTV có xu hướng tăng lên nhưng tỷ lệ tử vong lại giảm dần nhờ những thành tựu mới đạt được trong việc phát hiện sớm, chẩn đoán chính xác và điều trị có hiệu quả. Hiện nay bên cạnh các phương pháp đang được áp dụng trong chẩn đoán và điều trị UTV, các nhà khoa học đã và đang đi sâu vào nghiên cứu các gen, các marker ung thư đặc hiệu trong đó có nhóm các protein màng tế bào nhằm góp phần chẩn đoán sớm ở mức độ sinh học phân tử. Tiến bộ của khoa học kỹ thuật, đặc biệt trong lĩnh vực sinh học phân tử trong thập kỷ gần đây cho phép đi sâu nghiên cứu các đặc điểm sinh học, cấu trúc và chức năng của nhóm các protein mới này. Những bằng chứng khoa học đã chứng minh có sự tăng cường biểu hiện của Heparansulfate Interacting Protein (HIP) và Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ở mức độ mRNA và protein trong một số loại hình ung thư. Kết quả này đã mở ra một triển vọng nghiên cứu ứng dụng HIP và EGFR như một marker ung

thư để góp phần chẩn đoán sớm, tiên lượng và theo dõi điều trị bệnh lý ung thư.

2. Mục tiêu đề tài

1. Xác định sự thay đổi của HIP, EGFR ở mức độ mRNA và protein tại mô ung thư vú (so với u xơ tuyến vú lành tính).
2. Khảo sát sự thay đổi của HIP, EGFR ở mức độ mRNA và protein trong các thể ung thư vú phân loại theo mô bệnh học.

3. Ý nghĩa thực tiễn và đóng góp mới của đề tài

Ung thư cho đến nay vẫn được coi là một trong những căn bệnh nan y vì bệnh tiến triển tuần tiến và khó kiểm soát; cơ chế bệnh học chưa rõ ràng và trong nhiều trường hợp, khả năng can thiệp của người thầy thuốc rất hạn chế. *Một trong những giải pháp can thiệp hiệu quả nhất hiện nay đối với căn bệnh này là chẩn đoán sớm và điều trị can thiệp sớm.*

Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về HIP và EGFR ở bệnh nhân ung thư vú. Những kết quả nghiên cứu cho thấy mức độ sao chép mRNA và biểu lộ protein của HIP, EGFR tăng rõ rệt trong ung thư biểu mô tuyến vú, nhất là trong ung thư biểu mô tuyến vú thể ống. Trên cơ sở phát hiện này, HIP và EGFR không chỉ có thể là những marker mới trong chẩn đoán ung thư vú mà còn có thể được xem như một đích đầy hứa hẹn (khâu then chốt)

của liệu pháp điều trị nhằm ngăn chặn dòng thác tín hiệu được truyền vào trong tế bào.

4. Cấu trúc luận án

Luận án được trình bày trong 111 trang (không kể tài liệu tham khảo và phụ lục), bao gồm các phần: đặt vấn đề (3 trang); tổng quan tài liệu (31 trang); đối tượng và phương pháp nghiên cứu (18 trang); kết quả nghiên cứu (28 trang); bàn luận (29 trang); kết luận (1 trang); kiến nghị (1 trang).

Luận án gồm 11 bảng, 6 biểu đồ, 39 hình. Trong 128 tài liệu tham khảo có 23 tài liệu tiếng Việt, 105 tài liệu tiếng Anh. Phụ lục gồm các bảng kết quả tách chiết RNA, đậm độ vạch HIP, EGFR và GAPDH, danh sách bệnh nhân.

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1.3. Ung thư vú

Ung thư vú (UTV) là u ác tính phát sinh từ các tế bào biểu mô của ống tuyến vú (sinh sữa và dẫn sữa). Các đơn vị mô có chức năng sản xuất sữa được gọi là đơn vị *ống tạn - tiểu thụ* (ống tạn cùng - tiểu thụ tuyến). Trong vùng này các tế bào trở nên bất thường và có thể tiến triển thành UTV. UTV liên quan chặt chẽ với hoạt động của các tuyến nội tiết nên được gọi là bệnh phụ thuộc nội tiết.

1.1.4. Các phương pháp chẩn đoán ung thư vú

Các phương pháp chẩn đoán UTV có thể là chụp phim X quang với sự tập trung vào các vùng nghi ngờ, siêu âm sử dụng các sóng âm tần số cao để xác định rõ

các vùng nghi ngờ của vú. Siêu âm không gây đau và có thể phân biệt giữa các tổn thương lành tính và ác tính. Cho đến nay, sinh thiết là cách duy nhất để chẩn đoán xác định UTV. Tuy nhiên, điều quan trọng là phải chẩn đoán phân biệt u xơ tuyến vú và UTV. U xơ tuyến là một thể lành tính của bệnh vú, thường là một u đặc đơn độc (chỉ có một u) của mô xơ và tuyến. Loại u này rất phổ biến ở phụ nữ mọi lứa tuổi, nhưng u phổ biến hơn ở lứa tuổi 15 - 35 tuổi. Nếu u được phát hiện ở một phụ nữ trẻ, vì lý do tâm lý, họ thường muốn được theo dõi. Nếu u được phát hiện ở những phụ nữ lớn tuổi dù u lành tính cũng nên phẫu thuật cắt bỏ u.

Chính vì vậy, việc xác định từng trường hợp u xơ tuyến hay UTV luôn là thách thức đối với các nhà tế bào học. Hơn nữa, thông thường tế bào ung thư chỉ được phát hiện khi khối u đã thành hình rõ, vào thời điểm này hiệu quả của sự can thiệp bị hạn chế. Bởi vậy, trong những năm gần đây nhiều nhà nghiên cứu đã nghĩ đến xu hướng sử dụng kỹ thuật chẩn đoán sinh học phân tử nhằm phát hiện những biến đổi về gen sớm nhất trước khi có biến đổi về hình thái tế bào. Việc tìm hiểu các biến đổi gen trong quá trình phát sinh ung thư là cần thiết giúp tìm ra các dấu ấn ung thư mới, góp phần chẩn đoán sớm bệnh ung thư.

1.2.3. Cấu trúc HIP

*** Cấu trúc và chức năng sinh học của HIP**

HIP thuộc nhóm các protein gắn với ribosom L29, liên quan đến sự dịch mã của tế bào có nhân. Khoảng

80% trình tự nucleotid và protein của HIP giống L29, mRNA của HIP có chiều dài 1,3 kb và DNA của HIP mã hóa 159 acid amin có trọng lượng phân tử khoảng 24 kDa, pI là 11,75.

Một số chức năng sinh học của HIP đã được công bố: (1) Gắn đặc hiệu và chọn lọc với heparin/heparansulfate (HP/HS); (2) Tham gia quá trình liên kết tế bào - tế bào để qua đó tham gia quá trình làm tổ của trứng, quá trình phát triển, biệt hoá và di căn của tế bào; (3) Tham gia điều hoà quá trình đông máu

Khi HIP giảm tổng hợp hoặc bị loại bỏ hoàn toàn, ảnh hưởng trầm trọng đến quá trình phiên mã và hậu quả làm cho mức độ sinh tổng hợp protein trong tất cả các tế bào của các cơ quan bị giảm nghiêm trọng.

*** Vai trò của HIP trong ung thư**

Sự tổng hợp “dư thừa” của HIP ở mô ung thư đã giải phóng mạnh mẽ các yếu tố phát triển tế bào lưu giữ ở khoảng gian bào. Thông qua con đường tín hiệu MAPK, yếu tố phát triển sẽ tác động vào các thụ thể trên bề mặt tế bào để thông qua các con đường tín hiệu thông tin sẽ được truyền từ khoảng gian bào vào trong nhân để thúc đẩy quá trình phân bào. Điều này cho thấy HIP có thể thuộc trong nhóm các tác nhân hoạt hóa trong quá trình khởi phát và phát triển của ung thư. Con đường tín hiệu mà HIP tham gia có thể là một mắt xích quan trọng góp phần lý giải thêm cơ chế của quá trình hình thành phân chia, biệt hóa và phát triển vô hạn độ của tế bào ung thư.

Đa số các thể loại ung thư là ung thư biểu mô, trong đó dòng tế bào biểu mô là dòng tế bào có sự tổng hợp HIP cao hơn hẳn so với các dòng tế bào khác như là dòng tế bào sợi. Cấu trúc của khoảng gian bào trong các khối u cũng khác biệt hoàn toàn so với các mô bình thường về thành phần HS/HP cũng như sự phong phú về chủng loại và lượng các yếu tố phát triển. Thêm vào đó, sự tăng sinh mạch (angiogenesis) trong các khối u cũng khiến cho số lượng tế bào nội mạch (dòng tế bào có mức độ sao chép HIP rất mạnh) trong mô sinh thiết cũng cao hơn rất nhiều so với mô u xơ. Tất cả những điều đó đều dẫn đến một kết quả là tăng cường tổng hợp HIP được tăng cường mạnh ở các khối u ung thư so với các tổ chức lành tính khác, như là các khối u xơ.

1.2.4. Cấu trúc và chức năng của EGFR

*** Cấu trúc của thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR)**

EGFR là glycoprotein bề mặt màng, gia đình EGFR có bốn thành viên: HER1 (EGFr, ErbB1), HER2 (neu, ErbB2), HER3 (ErbB3) và HER4 (ErbB4). Trọng lượng phân tử của EGFR là 170 kDaltons (kDa), gồm một vùng gắn kết các phối tử nằm ngoài màng tế bào, một vùng xuyên màng đặc hiệu và một vùng trong tế bào với vai trò kích thích sự tăng sinh, biệt hoá của tế bào bình thường và các tế bào ác tính. Khi phối tử là yếu tố phát triển biểu mô (Epidermal Growth Factor: EGF) gắn với EGFR sẽ gây nên sự phân cực thụ thể và sự tự phosphoryl hoá vùng có hoạt tính enzym của thụ thể. Điều này khởi đầu cho một

loạt phản ứng tế bào dẫn đến sự tăng sinh và tiến triển ác tính của khối u: tăng sinh mạch máu, di căn và ức chế quá trình chết theo chương trình (apoptosis).

*** Chức năng của thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR)**

Các EGFR đều có phần để liên kết ngoài màng, phần xuyên màng và phần trong bào tương có hoạt tính tyrosin kinase. Phần ngoài màng, vùng III (domain III) chính là vùng để gắn kết các yếu tố hoạt hóa hay ức chế các thụ thể, để dẫn truyền tín hiệu vào trong tế bào làm tế bào có thể phát triển bình thường hoặc trở nên ác tính. Phần trong bào tương, đầu tận carboxy chính là phần đáp ứng trả lời hoạt tính tyrosin kinase và điều hòa chức năng tyrosin kinase. Phản ứng tự phosphoryl hóa của tyrosin kinase xảy ra ở vùng này nó đóng vai trò chính trong điều hòa sự phát triển tăng sinh của tế bào. Khi vắng mặt các phối tử (ví dụ GF, TGF...), vùng tyrosin kinase không phosphoryl hóa, chúng ở dạng đơn phân và vùng kinase không hoạt động. Vùng tyrosin kinase trở nên hoạt hóa khi phối tử gắn với vùng ngoại bào kết quả làm phân cực để lộ các góc phosphat và tự phosphoryl hóa tyrosin điều hòa trong vòng hoạt hóa của kinase. Sau khi hoạt hóa, việc tự phosphoryl hóa để lộ những vị trí gắn kết các protein tín hiệu và hoạt hóa các con đường tín hiệu.

*** Thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR) và các đích điều trị trong ung thư**

Tăng hoạt tính của EGFR cũng có thể thúc đẩy khả năng di căn của các tế bào ung thư. Sự gia tăng biểu lộ

EGFR liên quan với các loại hình ung thư. Ức chế quá trình biểu lộ EGFR là một trong những định hướng của liệu pháp điều trị gen cho một số loại hình ung thư. Từ các nghiên cứu này, hai hướng nghiên cứu chính gần đây tiếp cận sản xuất thuốc điều trị ung thư trên lâm sàng là: 1) sản xuất kháng thể đơn dòng ức chế các EGFR ở phần ngoài màng tế bào; 2) sản xuất chất ức chế tiểu phân tử tyrosin kinase EGFR đặc biệt là các EGFRvI-III. Các chất này hoặc ức chế phần ngoài màng tế bào hoặc phần trong tế bào của EGFR nhưng mục đích chính là ngăn chặn dòng thác tín hiệu được truyền vào trong tế bào của EGFR.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

47 mẫu của 47 bệnh nhân được chẩn đoán UTV và 15 mẫu của 15 bệnh nhân u xơ tuyến vú làm đối chứng. Chẩn đoán UTV và u xơ tuyến vú dựa trên kết quả mô bệnh học. Bệnh nhân được lấy mẫu mô nghiên cứu không mắc bất kỳ một ung thư phổi hợp nào khác. Các mẫu nghiên cứu (mẫu mô ung thư và mô u xơ tuyến vú) gồm hai dạng mẫu mô tươi và mẫu mô đúc trong block paraffin. Quy trình lấy mẫu được đảm bảo vô trùng mô tươi không bị hỏng và bảo quản ở nhiệt độ -80°C tại Trung tâm nghiên cứu Gen - protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu mô tả cắt ngang, có đối chứng.

2.3. CÁC KỸ THUẬT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

2.3.1. Quy trình tách chiết RNA tổng số

2.3.2. Xác định nồng độ, độ sạch RNA, cDNA bằng phương pháp quang phổ kế

2.3.3. Phương pháp điện di acid nucleic

2.3.4. Kỹ thuật RT-PCR tổng hợp cDNA

2.3.5. Kỹ thuật PCR xác định mức độ sao chép HIP và EGFR

* **PCR bán định lượng:** Sử dụng 3 cặp mồi để khuếch đại toàn bộ chiều dài đoạn gen HIP, EGFR và GAPDH. Sản phẩm sau PCR được điện di trên gel agarose 1,5%. Độ đậm độ mỗi vạch HIP, EGFR và GAPDH được xác định nhờ phần mềm chuyên dụng *ChemiDoc iQ, 76S0053*, đơn vị tính đậm độ vạch sao chép biểu lộ HIP là pixel. Mức độ sao chép của HIP và EGFR được tính bằng giá trị trung bình đậm độ vạch HIP và EGFR.

* **PCR định lượng:** Sản phẩm sau PCR của HIP, EGFR và GAPDH được điện di mao quản trên máy Agilent 2100 Bioanalyzer kết quả điện di có thể cho biết đồng thời cả kích thước và nồng độ đoạn DNA được phân tách. Xác định giá trị của HIP và EGFR thông qua tỷ lệ HIP/GAPDH và EGFR/GAPDH.

2.3.6. Kỹ thuật Western blot xác định mức độ biểu hiện protein HIP

2.3.7. Kỹ thuật hóa mô miễn dịch xác định biểu hiện protein EGFR

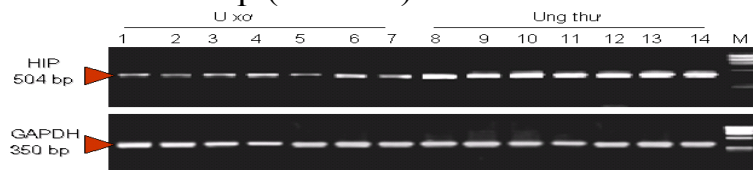
CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN GEN HIP TRONG UNG THƯ BIỂU MÔ VÚ

3.3.1. Kết quả sao chép mRNA của HIP ở mô u xơ tuyến vú và mô ung thư biểu mô tuyến vú

** Hình ảnh điện di trên gel agarose*

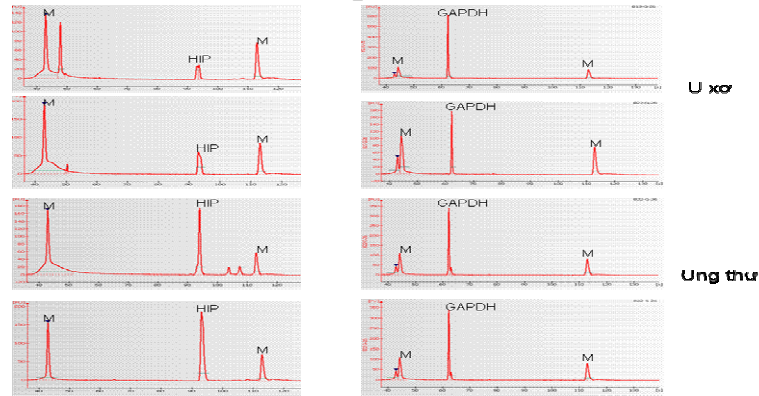
Mức độ sao chép của HIP và GAPDH thể hiện bởi mRNA, được thực hiện nhờ kỹ thuật PCR trên mẫu cDNA của mô u xơ tuyến vú lành tính và mô UTBM tuyến vú. Một cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự gen HIP và GAPDH đã được công bố ở GenBank. Đoạn gen HIP được nhân có kích thước 504 bp và GAPDH là 350 bp (hình 3.3).



Hình 3.3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của HIP và GAPDH trên gel agarose 1,5% của mô u xơ tuyến vú và mô UTBM tuyến vú. Mô u xơ vú (1-7) và mô ung thư (8-14). M (Marker): thang chuẩn DNA chuẩn 100 bp.

Nhận xét: Độ vạch sản phẩm PCR của HIP các mẫu mô UTBM tuyến vú rõ hơn nhiều so với mô u xơ tuyến vú lành tính. Độ vạch sản phẩm PCR của GAPDH khá đồng đều, không có sự khác biệt giữa mẫu ung thư và u xơ tuyến vú.

*** Hình ảnh điện di mao quản**



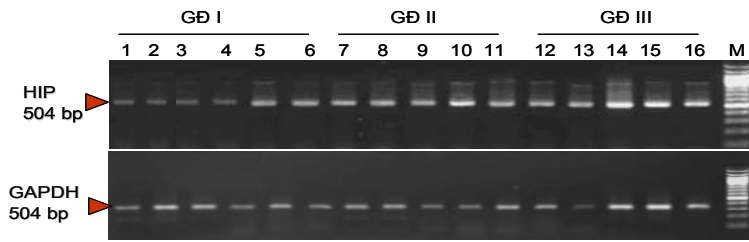
Hình 3.4. Hình ảnh điện di mao quản sản phẩm PCR của HIP và GAPDH mô u xơ tuyến vú và mô UTBM tuyến vú

Nhận xét: Trên hình ảnh điện di mao quản, các mẫu mô u xơ tuyến vú đỉnh sản phẩm PCR của HIP thấp hơn nhiều so với các mẫu mô UTBM. Tuy nhiên đỉnh sản phẩm PCR của GAPDH khá đồng đều không có sự khác biệt giữa các mẫu mô UTBM và u xơ tuyến vú.

Kết quả sao chép mRNA của HIP thu được từ điện di mao quản tương đương với hình ảnh thu được từ điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR

3.3.2. Kết quả sao chép mRNA HIP ở mô ung thư biểu mô tuyến vú thể ống

*** Hình ảnh điện di trên gel agarose**



Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của HIP và GAPDH ở các giai đoạn khác nhau của mô UTBM tuyến vú thể ống trên gel agarose 1,5%. Mẫu 1-6:GĐ I; mẫu 7-11:GĐ II; mẫu 12-16:GĐ III; M (Marker): Thang DNA chuẩn 100 bp

Nhận xét: Độ đậm vạch sản phẩm PCR của HIP tăng dần theo giai đoạn trên mô UTBM tuyến vú thể ống. Độ đậm vạch PCR sản phẩm của HIP tăng cao nhất ở các mẫu mô ung thư GĐ III, thấp dần ở GĐ II và GĐ I. Nhìn chung, độ đậm vạch PCR của GAPDH không có sự khác biệt giữa các mẫu mô ung thư ở các giai đoạn khác nhau.

Bảng 3.3. Giá trị trung bình độ đậm vạch PCR HIP của các mẫu mô u xơ và mô ung thư tuyến vú thể ống

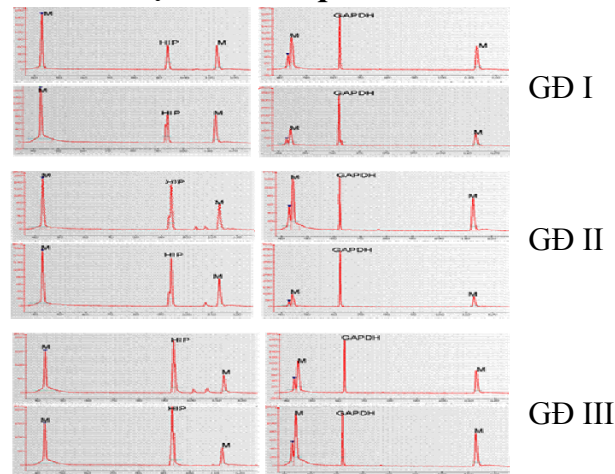
	Mô u xơ	Mô ung thư thể ống			p
		GĐ I (2a)	GĐ II (2b)	GĐ III (2c)	
Giai đoạn	(1)	GĐ I (2a)	GĐ II (2b)	GĐ III (2c)	p(1,2a) <0,05 p(1,2b) <0,01
Số lượng mẫu	15	6	16	14	p(1,2c) <0,01
Độ đậm vạch HIP trung bình (đơn vị pixel)	131	173	199	221	
± SD	± 10	± 6	± 11	± 10	

$$p(2a-2b) < 0,01; p(2a-2c) < 0,01; p(2b-2c) < 0,05.$$

Nhận xét:

Đậm độ trung bình vạch điện di sản phẩm PCR thể hiện sự sao chép mRNA của HIP ở mô u xơ vú là 131 trong khi đó ở mô UTV thể ống là 173, 199, 221 và tăng theo giai đoạn từ giai đoạn I đến giai đoạn III. Sự khác nhau này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ và $0,01$.

*** Hình ảnh điện di mao quản**



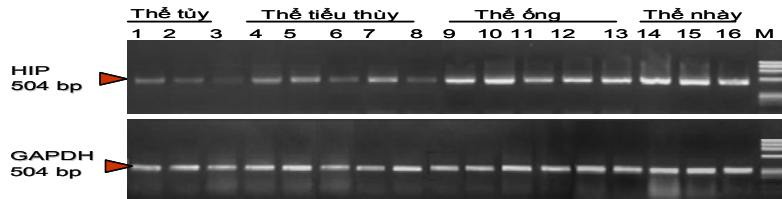
Hình 3.6. Hình ảnh điện di mao quản sản phẩm PCR của HIP và GAPDH theo giai đoạn UTBM tuyến vú thể ống

Nhận xét: Trên hình ảnh điện di mao quản, những mẫu mô UTBM tuyến vú thể ống ở các GD khác nhau mức độ sao chép gen HIP cũng khác nhau. Các đỉnh HIP tăng cao hơn rõ rệt ở GD III và thấp dần ở GD II, thấp nhất ở GD I. Kết quả này tương đồng với kết quả PCR bán định

lượng gen HIP. Đỉnh GAPDH khá đồng đều giữa các mẫu mô UTBM và u xơ vú, không có sự khác biệt.

3.3.2. Kết quả sao chép mRNA của HIP ở mô ung thư vú giai đoạn II theo các thể mô bệnh học

* Hình ảnh điện di trên gel agarose



Hình 3.7. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose của HIP và GAPDH ở mô ung thư vú giai đoạn II theo các thể mô bệnh học. *Thể tủy (1-3); thể tiểu thùy (4-8); thể ống (9-13) và thể nhày (14-16) M (marker): Thang DNA chuẩn 100 bp*

Nhận xét: Đậm độ vạch sản phẩm PCR của HIP ở các mẫu mô ung thư cùng ở GĐ II rõ nhất ở hai thể nhày và thể ống, thấp hơn ở hai thể tiểu thùy và thể tủy. Trong khi, đậm độ vạch PCR của GAPDH khá đồng đều, không có sự khác biệt giữa các mẫu mô UTBM ở các thể mô bệnh học.

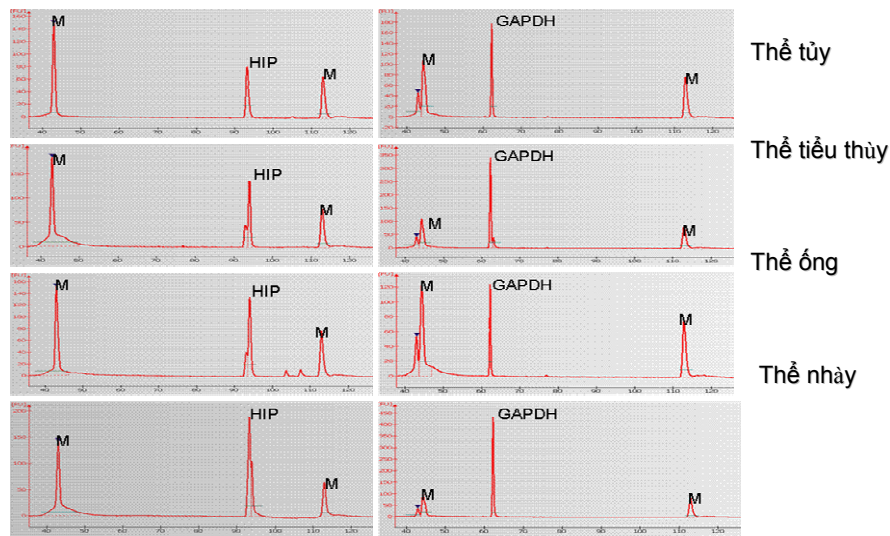
Bảng 3.4. Giá trị trung bình đậm độ vạch PCR HIP của các mẫu ung thư vú giai đoạn II theo phân loại mô bệnh học

Loại mô học	Mô u xơ	Mô ung thư			
		Thể tủy	Thể tiểu thùy	Thể ống	Thể nhày
SL mẫu	15	3	5	16	3

Đậm độ vạch HIP trung bình (đơn vị pixel)	131	141	174	199	254
SD	± 10	± 5	± 4	± 11	± 5

Nhận xét: Đậm độ vạch mRNA trung bình của HIP ở các mẫu mô ung thư cùng ở GD II cao hơn ở hai thể nhày và thể ống: 199 và 254, trong khi đó ở hai thể tiểu thùy và thể tủy: 141 và 131.

*** Hình ảnh điện di mao quản**



Hình 3.8. Hình ảnh điện di mao quản sản phẩm PCR của HIP và GAPDH theo các thể mô bệnh học

Nhận xét:- Trên hình ảnh điện di mao quản, những mẫu mô UTBM tuyến vú trên cùng giai đoạn II nhưng ở các thể mô bệnh học khác nhau có mức độ sao chép gen HIP

khác nhau. Các đỉnh sản phẩm PCR của HIP tăng cao rõ rệt ở UTV thể nhày và thể ống, giảm dần ở UTV thể tiểu thùy và thấp nhất ở UTV thể tủy. Đỉnh sản phẩm PCR của GAPDH khá đồng đều giữa mẫu mô UTBM tuyến vú, không có sự khác biệt giữa các thể mô bệnh học. Kết quả này tương đồng với kết quả PCR bán định lượng gen HIP.

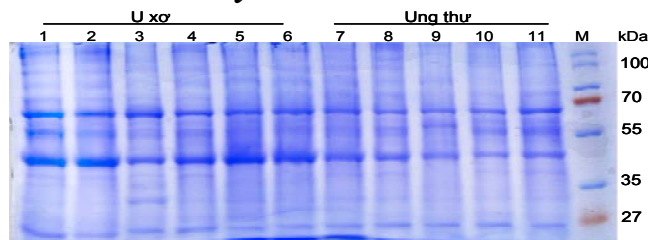
3.3.4. *Đánh giá tỷ lệ HIP/GAPDH của các mẫu nghiên cứu được định lượng bằng điện di mao quản*

Bảng 3.5. Giá trị tỷ lệ HIP /GAPDH trên điện di mao quản

Loại mô học	U xơ	Ung thư
Số lượng mẫu	4	21
Tỷ lệ HIP/GAPDH	0,40	1,26
SD	± 0,10	± 0,44

Nhận xét: Tỷ lệ HIP/GAPDH ở các mẫu mô UTV cao rõ rệt so với các mẫu mô u xơ tuyến vú. Tỷ lệ HIP/GAPDH ở các mẫu mô nghiên cứu kháng định HIP tăng cường sao chép rất rõ ở những mô ung thư.

3.3.5. *Mức độ biểu hiện protein HIP ở mô u xơ vú và mô ung thư biểu mô tuyến vú.*



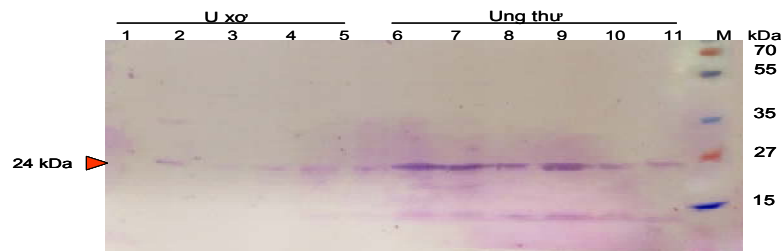
Hình 3.9. Hình ảnh điện di SDS-PAGE protein tổng số của mô u xơ và mô ung thư biểu mô tuyến vú (nhuộm Coomassie blue) .

*M: marker (protein ladder, SM 1811, Fermantas); 1- 6: mẫu u xơ;
7-11: mẫu ung thư*

Nhận xét: Trên bản gel polyacrylamid xuất hiện các vệt protein với các trọng lượng phân tử khác nhau. Không có khác biệt về sự phân bố và đậm độ các vệt protein giữa các mẫu mô ung thư và u xơ tuyến vú. Kết quả này cho thấy sự đồng nhất về lượng protein tổng số được tách chiết sử dụng trong mỗi giếng điện di

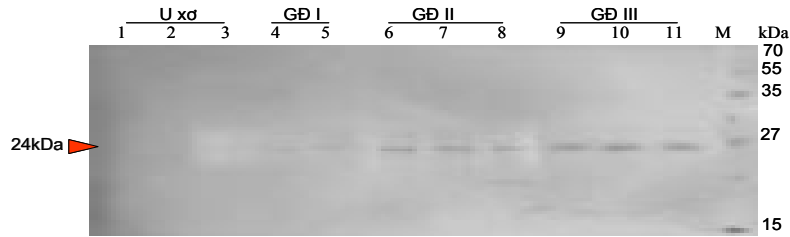
*** Mức độ biểu hiện protein HIP ở mô u xơ với mô ung thư vú bằng kỹ thuật Western blot**

Bản gel chuyển qua màng nitrocellulose ở điều kiện thích hợp sẽ cho ù với kháng thể bậc 1, bậc 2 theo đúng quy trình, phát hiện màu bằng cơ chất BCIP/NBT, kết quả được chụp bằng máy UV chuyên dụng, băng protein HIP thu được có trọng lượng phân tử bằng 24 kDa



Hình 3.10. Kết quả Western blot đánh giá mức độ biểu hiện protein HIP ở u xơ và mô ung thư biểu mô tuyến vú. M: marker (protein ladder, SM 1811, Fermantas); 1-5 : u xơ tuyến vú; 6-11: mẫu UTBM tuyến vú.

Nhận xét: Protein HIP biểu hiện ở vị trí marker ứng với trọng lượng phân tử khoảng 24kDa. Độ đậm vạch protein HIP rõ ở mô ung thư vú, trong khi đó ở mô u xơ đậm độ nhạt hơn rất nhiều.



Hình 3.11. Kết quả Western blot đánh giá mức độ biểu hiện protein HIP của mô ung thư thể ống theo từng giai đoạn.

M: marker (protein ladder, SM 1811, Fermentas); 1-3: mẫu u xơ tuyến vú; 4-5: mẫu ung thư GD I; 6-8: mẫu ung thư GD II; 9-11: mẫu ung thư GD III.

Nhận xét: Các vạch protein HIP biểu hiện rõ hơn ở mô ung thư so với mô u xơ tuyến vú và tăng theo giai đoạn trên lâm sàng của ung thư tuyến vú thể ống từ GD I – GD III

*** Mức độ biểu hiện protein HIP ở mô ung thư vú giai đoạn II theo phân loại mô bệnh học**



Hình 3.12. Kết quả Western blot đánh giá mức độ biểu hiện protein HIP của mô ung thư vú giai đoạn II theo phân loại mô bệnh học. *M: marker (protein ladder, SM 1811, Fermentas); 1-3: thể tủy; 4-6 thể tiểu thùy; 7-9: thể ống; 10 -11: thể nhày.*

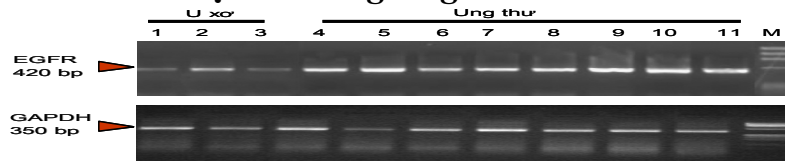
Nhận xét: Protein HIP biểu lộ khác nhau theo thể loại mô bệnh học của ung thư vú. Protein HIP biểu lộ cao hơn ở UTV thể ống và thể nhày, thấp hơn ở thể tiểu thùy và thể tủy.

3.4. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN EGFR TRONG UNG THƯ BIỂU MÔ TUYẾN VÚ

3.4.1. Kết quả sao chép mRNA EGFR ở mô u xơ so với mô ung thư vú biểu mô tuyến vú

Mức độ sao chép của EGFR cũng như HIP, được thực hiện nhờ kỹ thuật RT-PCR trên mẫu cDNA của mô u xơ vú và ung thư. Đoạn gen EGFR được nhân có kích thước 420 bp, gen GAPDH luôn được khuếch đại song song trên tất cả các mẫu nghiên cứu (hình 3.13).

* Hình ảnh điện di trên gel agarose

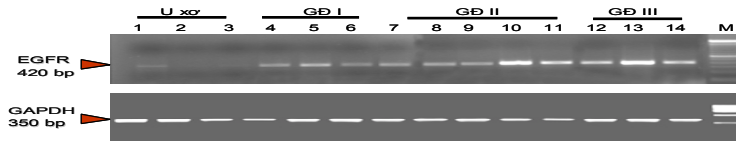


Hình 3.13. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của EGRF và GAPDH trên gel agarose 1,5% của mô u xơ và mô UTBM tuyến vú. *Mô u xơ vú (1-3) và mô ung thư vú (4-11); M (Marker): Thang DNA chuẩn 100 bp.*

Nhận xét: Độ đậm vạch sản phẩm PCR của EGFR các mẫu mô UTBM tuyến vú rõ hơn nhiều so với mô u xơ tuyến vú lành tính. Độ đậm vạch sản phẩm PCR của GAPDH khá đồng đều, không có sự khác biệt giữa mẫu ung thư và u xơ tuyến vú.

3.4.2. Kết quả sao chép mRNA EGFR ở mô ung thư biểu mô tuyến vú thể ống

* Hình ảnh điện di trên gel agarose



Hình 3.15. Hình ảnh điện di mRNA trên gel agarose của EGRF và GAPDH trên mô u xơ vú và mô UTBM tuyến vú thể ống. Mô u xơ vú (1-3) và mô ung thư thể ống GĐ I (4 - 6), GĐ II (7-10), GĐ III (11-14). M (Marker): Thang DNA chuẩn 100 bp.

Nhận xét: Độ đậm vạch của EGFR ở những mẫu ung thư rõ hơn những mẫu u xơ và độ đậm tăng dần theo các giai đoạn của UTV thể ống. EGFR được tăng cường sao chép ở mô ung thư so với mô u xơ tuyến vú. Trên cùng một thể mô bệnh học sự tăng cường sao chép của EGFR tăng theo giai đoạn lâm sàng của ung thư biểu mô tuyến vú.

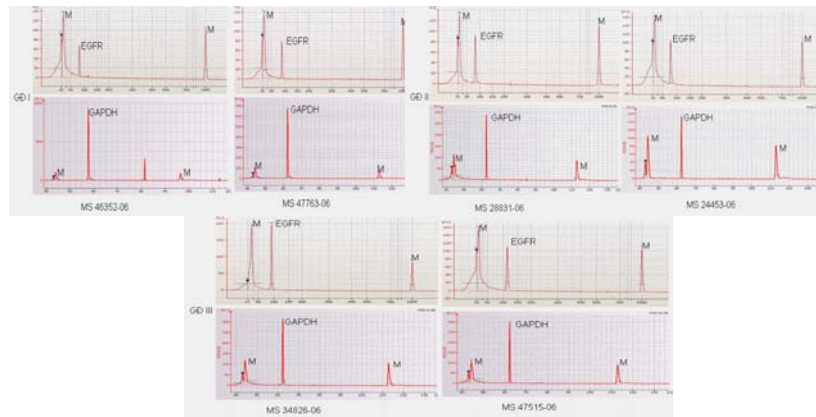
Bảng 3.8. Giá trị trung bình độ đậm vạch PCR EGFR của các mẫu u xơ và ung thư vú thể ống

	Mô u lành	Mô UTV thể ống			p
		GĐ II	GĐ II	GĐ III	

Số lượng mẫu	15(1)	6(2a)	16(2b)	14(2c)	p (1,2a)
ĐD vạch EGFR trung bình (đơn vị pixel)	100	122	191	217	<0,05 p (1,2b) < 0,01 p (1,2c) < 0,01
± SD	± 11	± 13	± 33	± 33	0,01
p (2a-2b) < 0,01; p (2a-2c) < 0,01; p (2b-2c) < 0,05.					

Nhận xét: Độ đậm trung bình vạch điện di sản phẩm PCR thể hiện sự sao chép mRNA của EGFR ở mô u xơ vú là 100 trong khi đó ở mô UTV thể ống là 122, 191, 217 và tăng theo giai đoạn từ giai đoạn I đến giai đoạn III. Sự khác nhau này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ và $0,01$.

*** Hình ảnh điện di mao quản**



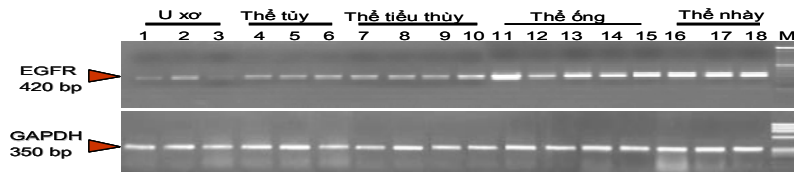
Hình 3.16. Hình ảnh điện di mao quản sản phẩm PCR của EGFR và GAPDH theo GD UBTM tuyến vú thể ống

Nhận xét: Trên hình ảnh điện di mao quản, những mẫu mô UBTM tuyến vú thể ống ở các GD khác nhau có mức

độ sao chép gen EGFR cũng khác nhau. Các đỉnh sản phẩm PCR của EGFR tăng cao hơn rõ rệt ở GĐ III, giảm dần ở GĐ II và thấp nhất ở GĐ I. Kết quả này tương đồng với kết quả PCR bán định lượng sản phẩm PCR của gen EGFR. Đỉnh sản phẩm PCR của GAPDH khá đồng đều giữa các mẫu mô UTBM và u xơ vú, không có sự khác biệt.

3.4.3. Kết quả sao chép mRNA EGFR ở mô ung thư vú giai đoạn II theo phân loại mô bệnh học

* Hình ảnh điện di trên gel agarose



Hình 3.17. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của EGFR và GAPDH mô ung thư vú GĐ II theo phân loại mô bệnh học ống trên gel agarose 1,5%. U xơ vú (1-3); thể tủy (4-6), thể tiểu thùy (7-10), thể ống (11-15), thể nhày (16-18). M (Marker): thang DNA chuẩn 100 bp.

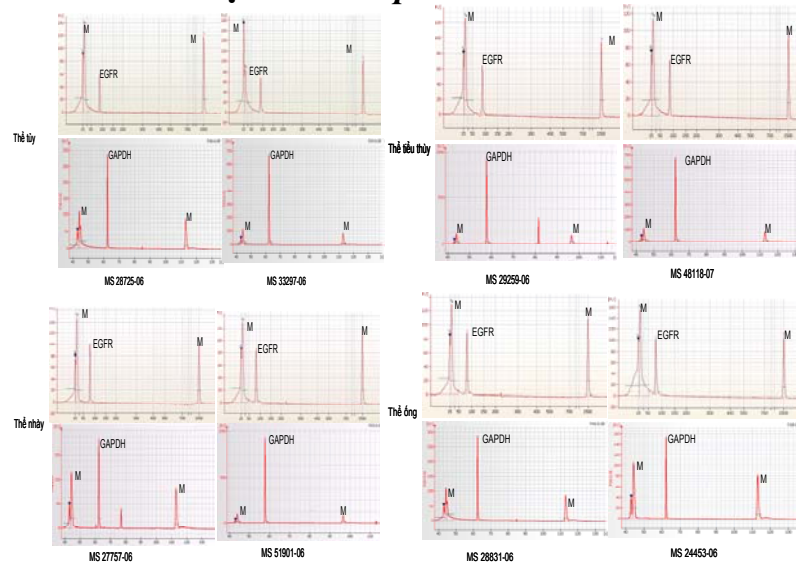
Nhận xét: Độ đậm vạch sản phẩm PCR của EGFR ở các mẫu mô ung thư cùng ở GĐ II rõ nhất ở hai thể nhày và thể ống, thấp hơn ở hai thể tiểu thùy và thể tủy. Trong khi độ đậm vạch PCR của GAPDH khá đồng đều, không có sự khác biệt giữa các mẫu mô UTBM ở các thể mô bệnh học

Bảng 3.9. Giá trị trung bình độ đậm vạch PCR EGFR của các mẫu ung thư vú giai đoạn II theo phân loại mô bệnh học

Loại mô học	U xơ	Ung thư			
		Thể tủy	Thể tiểu thùy	Thể ống	Thể nhày
SL mẫu	15	3	5	16	3
ĐD vạch EGFR TB (đơn vị pixel)	100	154	168	191	207
± SD	± 11	± 4	± 47	± 33	± 10

Nhận xét: Mật độ vạch mRNA trung bình của EGFR ở các mẫu mô ung thư cùng ở GD II cao hơn ở hai thể nhày và thể ống: 191 và 207, trong khi đó ở hai thể tiểu thùy và thể tủy: 168 và 154.

*** Hình ảnh điện di mao quản**



Hình 3.18. Hình ảnh điện di mao quản sản phẩm PCR của EGFR và GAPDH theo các thể mô bệnh học

Nhận xét:

- Trên hình ảnh điện di mao quản, những mẫu mô UTBM tuyến vú trên cùng giai đoạn II nhưng ở các thể mô bệnh học khác nhau có mức độ sao chép gen EGFR khác nhau. Các đỉnh sản phẩm PCR của EGFR tăng cao rõ rệt ở UTV thể nhày và thể ống, thấp hơn ở UTV thể tiêu thùy và thấp nhất ở UTV thể tủy. Đỉnh sản phẩm PCR của GAPDH khá đồng đều giữa mẫu mô UTBM tuyến vú, không có sự khác biệt giữa các thể mô bệnh học. Kết quả này tương đồng với kết quả PCR bán định lượng gen EGFR.

3.4.4. Đánh giá tỷ lệ EGFR/GAPDH của các mẫu nghiên cứu được định lượng bằng điện di mao quản

Bảng 3.10. Giá trị tỷ lệ EGFR/GAPDH trên điện di mao quản

Loại mô học	U xơ	Ung thư
Số lượng mẫu	2	14
Tỷ lệ EGFR/GAPDH	0,73	1,09
SD	± 0,09	± 0,25

Nhận xét: Tỷ lệ EGFR/GAPDH ở các mẫu mô UTV cao rõ hơn so với các mẫu mô u xơ tuyến vú. Tỷ lệ EGFR/GAPDH ở các mẫu mô nghiên cứu khẳng định EGFR tăng cường sao chép ở những mô ung thư.

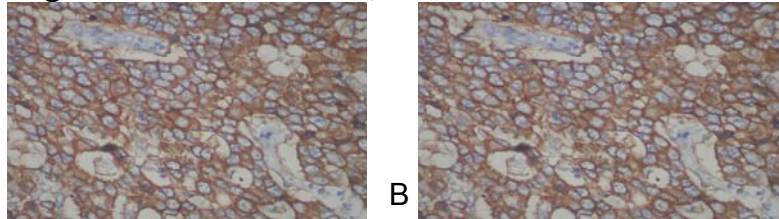
3.4.5. Mức độ biểu lộ EGFR ở mô u xơ vú và mô ung thư biểu mô tuyến vú

Ngoài kỹ thuật Western blot xác định mức độ biểu lộ protein tách chiết từ mô tươi hoặc mô sinh thiết, kỹ thuật hóa mô miễn dịch được sử dụng để xác định mức độ biểu lộ protein trên các mô lưu trữ trong block paraffin.

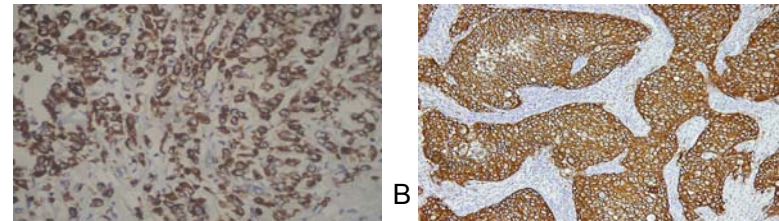
Bảng 3.11. Sự biểu hiện EGFR trong các mẫu mô nghiên cứu

Mức độ	Số trường hợp	Tỷ lệ %
0	21	33,9
1+	17	27,4
2+	10	16,2
3+	14	22,5
Tổng	62	100

Nhận xét: EGFR dương tính chiếm 38,7%, trong đó dương tính mạnh chiếm 22,5%.



A. Hình 3.21. UTBM ống nhuộm HMMD với EGFR dương tính 3 (+). Mã số GFB: 30681-06. **B. Hình 3.22.** UTBM ống nhuộm HMMD với EGFR dương tính 2(+). Mã số GFB 35498 - 06. HMMD x 200.



A. Hình 3.23. UTBM thể tiểu thùy nhuộm HMMD với EGFR dương tính 2(+). Mã số GFB Mã số GFB: 30128 - 06. **B. Hình 3.24.** UTBM thể trụ nhuộm HMMD với EGFR dương tính 2(+). Mã số: 30329 - 06. HMMD x 200.

CHƯƠNG 4 BÀN LUẬN

4.3. XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ THAY ĐỔI GEN HIP TRONG UNG THƯ BIỂU MÔ TUYẾN VÚ

** Mức độ sao chép mRNA của HIP ở mô u xơ vú và mô ung thư biểu mô tuyến vú*

Kết quả quan sát đậm độ vạch PCR sau khi điện di trên gel agarose cho thấy ở các mẫu mô ung thư vạch xuất hiện rõ hơn nhiều so với mẫu mô u xơ vú (hình 3.3). Điều này chứng tỏ rằng ở mô ung thư HIP được tăng cường sao chép, trong khi sản phẩm sao chép của gen này ở mô u xơ vú yếu hơn rõ rệt. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây trong đó các tác giả cũng chứng minh rằng mRNA của HIP được tăng cường sao chép mạnh các dòng ung thư biểu mô hơn là dòng tế bào sợi, đặc biệt là các dòng tế bào biểu mô ác tính, chưa biệt hóa. Sự tăng cường sao chép HIP ở mô ung thư biểu mô tuyến vú so với u xơ vú đã chứng tỏ HIP có ý nghĩa trong loại hình ung thư này.

Một câu hỏi đặt ra: mức độ sao chép của HIP trên cùng một thể loại mô bệnh học có khác nhau thì có phụ thuộc vào giai đoạn tiến triển của khối u hay không? Chúng tôi đã tiến hành khuếch đại đoạn gen HIP của 36 mẫu mô ung thư vú thể ống ở ba giai đoạn và cùng tiến hành so sánh với các mẫu u xơ vú đối chứng. Kết quả bước đầu cho thấy HIP được tăng cường sao chép ở những mô ung thư biểu mô thể ống trong khi đó xuất hiện kém hơn ở các mẫu mô u xơ lành tính. Các mẫu mô ung thư ở các giai đoạn khác nhau thì sự sao chép của HIP

cũng ở những mức độ khác nhau. Độ đậm vạch của mẫu ung thư giai đoạn III có giá trị cao nhất và giảm ở các mẫu ung thư giai đoạn trước đó (giai đoạn II và giai đoạn I) (hình 3.5).

Độ đậm vạch PCR của HIP và GAPDH được xác định sử dụng phần mềm *iChemidocQ*, 76SOO530. Kết quả ở bảng 3.3, độ đậm vạch trung bình của mẫu mô u xơ vú là 131 (đơn vị pixel) trong khi ở mô ung thư vú thể ống theo giai đoạn từ I- II và III là 173, 199 và 221. Điều này khẳng định một lần nữa sự khác biệt rõ rệt mức độ sao chép của HIP ở ung thư biểu mô tuyến vú so với u xơ vú. Thêm vào đó, ở cùng một loại mô bệnh học, sự khác biệt này cũng khá rõ rệt theo giai đoạn tiến triển của bệnh.

Kết quả tương tự khi phân tích định lượng trên máy Agilent 2100 Bionalyzer (hình 3.4), đỉnh HIP ở các mẫu mô ung thư cao hơn rõ rệt so với các mẫu mô u xơ, có sự khác biệt giữa các giai đoạn của UTBM tuyến vú thể ống, trong khi đó đỉnh GAPDH khá đồng đều ở các mẫu u xơ và UTBM tuyến vú thể ống ở các giai đoạn (hình 3.6). Kết quả RT-PCR bán định lượng và định lượng gen HIP trên điện di mao quản luôn có sự tương đồng. Nếu một khi nghiên cứu với một số lượng mẫu đủ lớn, thì có thể đưa ra giá trị cut-off của HIP đối với ung thư vú nói riêng và ung thư nói chung và có thể ứng dụng giá trị này trong chẩn đoán, theo dõi điều trị đối với bệnh nhân ung thư

*** *Mức độ sao chép mRNA và protein HIP ở các thể mô bệnh học khác nhau của ung thư vú trong cùng một giai đoạn lâm sàng***

Kết quả nghiên cứu trên 27 mẫu mô ung thư vú cùng giai đoạn 2 gồm thể ống, thể nhày, thể tiểu thùy và thể tủy cho thấy độ đậm vạch PCR điện di trên gel agarose 1,5%

tăng ở các thể ống và thể nhày giảm hơn ở thể tiểu thùy và thể tủy. Giá trị trung bình đậm độ vạch PCR cao nhất ở thể nhày (254) và giảm dần từ thể ống (199), thể tiểu thùy (174) và thấp nhất ở thể tủy (141), (biểu đồ 3.2). Cũng trong nghiên cứu này, kết quả đã chỉ ra rằng sự biểu hiện gen HIP ở thể nhày là cao nhất, phải chăng đây cũng là thực tế trong chẩn đoán ung thư vú, bệnh nhân ung thư vú thể nhày đơn thuần rất ít gặp trong khi đó thể nhày phối hợp với các thể khác đặc biệt là thể ống hay gặp hơn, nên biểu hiện gen HIP của ba mẫu thể nhày tăng hơn so với các thể khác. Với kết quả nghiên cứu, cho thấy sự biểu hiện của HIP không những thay đổi theo giai đoạn của ung thư mà còn có sự khác biệt giữa các thể mô bệnh học. HIP tăng cường tổng hợp ở các thể mô bệnh học có độ ác tính cao và giảm ở các thể độ ác tính thấp hơn. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với nghiên cứu của các tác giả nước ngoài. Theo Carson D và cộng sự, biểu hiện của HIP phụ thuộc vào độ ác tính của tế bào ung thư vú. Ở các dòng tế bào ung thư có độ ác tính và di căn cao sự biểu hiện của HIP được tăng cường hơn các dòng tế bào có độ ác tính thấp. Việc phát hiện biểu hiện gen HIP trên các thể mô bệnh học của ung thư vú cũng luôn được tiến hành đồng thời song song bằng hai kỹ thuật bán định lượng và định lượng bằng điện di mao quản nhằm so sánh đánh giá sự tương đồng về kết quả của hai kỹ thuật. Gen GAPDH được coi như một gen nội chuẩn, sự sao chép gen này không chỉ không phụ thuộc vào chu kỳ phân chia cũng như quá trình biệt hóa của tế bào mà còn không có tính đặc hiệu tế bào và đặc hiệu tổ chức. Tỷ lệ HIP/GAPDH (bảng 3.5) đối với các mẫu u xơ tuyến vú là 0,40 thấp hơn rõ rệt so với các mẫu UTBM tuyến vú là 1,26 - minh

chứng bổ xung cho sự biểu lộ gen HIP ở các mẫu mô nghiên cứu. Kết quả cho thấy cả hai phương pháp đều có một kết quả tương đồng tuy rằng độ nhạy có khác nhau. Điều này có ý nghĩa thực tiễn bởi lẽ một khi HIP được sử dụng như một dấu ấn sinh học mới trong chẩn đoán và tiên lượng ung thư vú thì chúng ta có thể tiến hành bán định lượng ở các phòng xét nghiệm chỉ có thiết bị đơn giản hơn hoặc định lượng mẫu nếu phòng xét nghiệm có trang thiết bị tốt hơn.

Kỹ thuật Western blot được sử dụng để xác định mức độ biểu lộ protein HIP. Kháng thể đặc hiệu kháng HIP sử dụng trong nghiên cứu này do chính nhóm nghiên cứu sản xuất [1]. Nhóm tác giả đã tổng hợp kháng thể kháng HIP người từ thỏ theo một quy trình chuẩn sử dụng phân đoạn peptid HIP đặc hiệu có chiều dài 16 acid amin được liên kết với protein mang (KLH). Lượng protein tổng số được cho vào các giếng điện di trong kỹ thuật Western blot xác định mức độ biểu hiện protein HIP là 1,5 μ g. Trong quá trình làm luôn chạy song song hai bản gel, một bản gel dùng chuyển màng để làm Western blot, một bản nhuộm protein với Coomassie blue G250 để làm đối chứng. Bản gel polyacrylamid 12% sau khi chạy điện di và nhuộm Coomassie blue, xuất hiện các vệt protein với các trọng lượng phân tử khác nhau (hình 3.9). Không có sự khác biệt về sự phân bố và đậm độ các vệt protein giữa các mẫu mô ung thư và u xơ tuyến vú. Kết quả này cho thấy sự đồng nhất về lượng protein tổng số được tách chiết và sử dụng trong mỗi giếng điện di làm cơ sở cho sự so sánh và tính tỷ lệ HIP/tổng lượng protein toàn phần. Trong khi đó bản gel polyacrylamid 12%, được chuyển màng nitrocellulose, sử dụng kỹ thuật Western blot cho

thấy vạch protein HIP là một vạch rõ nét duy nhất, chứng tỏ kháng thể thu được có độ đặc hiệu cao (hình 3.10, hình 3.11, hình 3.12). Vạch protein HIP có trọng lượng phân tử 24 kD được quan sát rõ hơn ở các mẫu mô ung thư vú so với mẫu u xơ. Độ đậm của vạch này thay đổi theo các giai đoạn của ung thư vú thể ống với khuynh hướng tăng dần từ giai đoạn I đến giai đoạn III. Vạch protein HIP biểu hiện rõ hơn ở ung thư vú thể ống, thể nhày, thấp hơn ở thể tiểu thùy và thể tủy. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện protein HIP ở các thể loại tế bào học khác nhau và giai đoạn tiến triển khác nhau của mô ung thư vú tương đồng với kết quả sao chép mRNA của HIP ở các mô này. Phát hiện này phù hợp với nhận định của Jacobs và cộng sự về sự sao chép và biểu hiện HIP ở các dòng tế bào: sự biểu hiện của HIP ở các mức độ khác nhau tại các dòng tế bào ung thư và đặc biệt tăng cường tại các dòng tế bào có độ ác tính và di căn cao.

4.4. XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ THAY ĐỔI GEN EGFR TRONG UNG THƯ BIỂU MÔ TUYẾN VÚ

** Mức độ sao chép mRNA của EGFR ở u xơ vú so với mô ung thư biểu mô tuyến vú*

Trong nghiên cứu này, mức độ sao chép mRNA của EGFR ở mô ung thư vú đã được khảo sát một cách có hệ thống. Hình ảnh điện di trên gel agarose (hình 3.13) cho thấy, sản phẩm PCR của đoạn gen EGFR chỉ xuất hiện một băng duy nhất tương ứng với vị trí 420 bp. Đó chính là sản phẩm PCR của đoạn gen EGFR cần khuếch đại. Như vậy, điều kiện phản ứng RT-PCR (như đã mô tả trong phần phương pháp) để nhân đoạn gen EGFR là hoàn toàn thích hợp. Cũng như đối với gen HIP, sau nhiều

phản ứng thăm dò, nồng độ cDNA đưa vào phản ứng PCR khuếch đại gen EGFR là 800 ng và đảm bảo sự tương đương giữa các mẫu. Kết quả cho thấy, EGFR được tăng cường sao chép ở những mô ung thư biểu mô tuyến vú nhưng EGFR xuất hiện kém ở mô u xơ vú. Sự tăng cường sao chép gen EGFR còn thay đổi theo giai đoạn của ung thư vú thể ống, tăng dần từ giai đoạn I đến giai đoạn III (hình 3.15). Điều này khẳng định một lần nữa sự khác biệt rõ rệt mức độ sao chép của EGFR ở ung thư biểu mô tuyến vú có sự khác biệt rõ so với u xơ vú. Sự khác biệt này trên cùng loại mô học, theo giai đoạn bệnh trên lâm sàng cũng có sự khác biệt rõ rệt và sự sao chép của EGFR tăng theo giai đoạn của bệnh trên lâm sàng. Cũng giống như gen HIP, nghiên cứu cũng sử dụng kỹ thuật điện di mao quản bước đầu khảo sát sự tương đồng với kết quả RT-PCR bán định lượng. Kết quả điện di mao xác định giá trị của gen EGFR và gen GAPDH cũng cho kết quả tương đồng với RT-PCR bán định lượng. Đỉnh GAPDH khá đồng nhất giữa các mẫu ung thư và u xơ, trong khi đó khác biệt rõ giữa các mẫu u xơ và ung thư vú đỉnh EGFR tăng cao ở các mẫu mô ung thư, tăng theo giai đoạn của ung thư thể ống trong khi đó đỉnh EGFR của các mẫu mô u xơ thấp hơn rõ rệt trong điện di mao quản (hình 3.14; 3.16). Kết quả này cũng phù hợp với kết luận của Kersting C. rằng: sự khuếch đại gen EGFR có sự liên quan chặt chẽ với quá trình phát triển của khối u theo các giai đoạn trên lâm sàng.

**** Mức độ sao chép mRNA của EGFR mô ung thư vú cùng một giai đoạn trên lâm sàng ở các thể mô học khác nhau***

Sự tăng cường sao chép gen EGFR có thay đổi khác nhau giữa các thể loại tế bào học khác nhau trong cùng một giai đoạn II của ung thư biểu mô tuyến vú hay không? Trong nghiên cứu này, 27 mẫu mô ung thư vú cùng giai đoạn II trên lâm sàng, gồm thể ống, thể nhày, thể tiêu thùy và thể tủy đã được phân tích. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy đậm độ vạch PCR của mRNA EGFR điện di trên gel agarose (hình 3.17), cũng tương tự như mRNA HIP tăng ở các thể ống và thể nhày giảm hơn ở thể tiêu thùy và thể tủy. Tính trung bình đậm độ vạch PCR (đơn vị pixel) của từng thể giảm từ thể nhày (207), đến thể ống (191), thể tiêu thùy (168) và thấp nhất ở thể tủy (154). Việc phát hiện biểu hiện gen EGFR trên các thể mô bệnh học của ung thư vú được tiến hành đồng thời song song với phương pháp định lượng trên máy Agilent 2100 Bioanalyzer, kết quả điện di mao quản cũng cho một kết quả tương đồng, các mẫu mô ung thư ở các thể mô bệnh học khác nhau biểu hiện EGFR cũng khác nhau, đỉnh EGFR cao ở thể nhày và thể ống giảm dần ở thể tiêu thùy và thể tủy. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự biểu hiện của EGFR cũng như HIP không những thay đổi theo giai đoạn của ung thư mà còn có sự khác biệt giữa các thể mô học.

Cũng như gen HIP, kết quả thăm dò ban đầu xác định nồng độ gen EGFR với 14 mẫu ung thư và 2 mẫu u xơ, giá trị tỷ lệ EGFR/GAPDH ở các mẫu mô UTBM tuyến vú là $1,09 \pm 0,25$ cao hơn hẳn so với các mẫu u xơ là $0,73 \pm 0,09$ (bảng 3.10), kết quả này một lần nữa là chứng minh cho sự biểu lộ gen EGFR ở các mẫu mô nghiên cứu luôn có sự tăng cường ở các mô UTBM tuyến vú. Sự thành công bước đầu của nghiên cứu sẽ tạo tiền đề

cho việc nghiên cứu xác định một ngưỡng cut-off của cả gen HIP và gen EGFR để ứng dụng trong chẩn đoán, theo dõi điều trị ung thư nói chung và ung thư vú nói riêng trên lâm sàng.

*** *Mức độ biểu hiện protein EGFR trong ung thư biểu mô tuyến vú***

Kỹ thuật hóa mô miễn dịch được thực hiện để đánh giá mức độ biểu lộ protein trên các mô lưu trữ trong block paraffin của mô ung thư biểu mô tuyến vú. Mức độ biểu hiện của EGFR cao ở các mô ung thư, không có sự biểu hiện EGFR ở các mô u xơ. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của Meche A. và cộng sự: EGFR chỉ biểu hiện ở các mô ung thư không có biểu hiện ở mô u xơ tuyến vú và những khối u có hiện tượng quả sản tế bào tuyến vú. Sự biểu hiện ở các thể mô bệnh học trên cùng một giai đoạn không có sự khác nhau nhiều. Trong nghiên cứu của chúng tôi ở ba mẫu ung thư vú thể nhày tế bào bắt màu nâu ở mức độ 0 và độ 1 (được coi là có kết quả âm tính). Tại sao lại có sự khác nhau giữa mức độ khuếch đại của gen và bộc lộ protein của EGFR? Thông thường thì sự biểu hiện của các sản phẩm protein tương ứng với sự khuếch đại của gen. Tuy nhiên, nhiều giả thuyết vẫn cho rằng sự khuếch đại gen của gia đình EGFR liên quan trực tiếp đến tính chất của ung thư hơn là sự biểu hiện của thụ thể EGFR - tức sản phẩm protein của gen. Thêm nữa, mặc dù gen mã hóa protein EGFR thường bị khuếch đại khi có sự biểu hiện quá mức của protein này, nhưng ngược lại sự biểu hiện của protein này không phải lúc nào cũng tương ứng với sự khuếch đại gen. Điều này cũng tương tự như kết quả trong nghiên cứu mặc dù biểu hiện gen EGFR của thể nhày là cao nhất

trong bốn thể mô bệnh học ung thư vú của các mẫu mô nghiên cứu nhưng sự biểu hiện sản phẩm của gen là protein thấp.

Các kết quả nghiên cứu trên cho chúng ta một bức tranh tổng thể về cơ chế phân tử của HIP, EGF và EGFR trong bệnh sinh ung thư vú. Như vậy dưới sự tác động của các tác nhân nào đó hoạt hóa quá trình sao chép và phiên mã HIP trong tế bào, sau đó HIP sẽ được vận chuyển “tích cực” ra bề mặt ngoài tế bào để có thể cạnh tranh với vị trí gắn của EGF trên vị trí đặc hiệu của HP/HS. EGF được giải phóng sẽ gắn với thụ thể (EGFR) trên bề mặt tế bào để khởi động con đường tín hiệu (MAPK) vào trong nhân thúc đẩy quá trình phân chia và biệt hóa tế bào. Thêm vào đó, HIP cũng sẽ tác động trực tiếp và thúc đẩy quá trình phiên mã một protein đích nào đó đặc hiệu của quá trình bệnh học ung thư như các dấu ấn ung thư đặc hiệu trên bề mặt màng. Điều đó chứng tỏ HIP chưa chắc đã phải điểm đầu của con đường tín hiệu để có thể khởi phát sự phát triển bất thường của tế bào là tiền đề của quá trình khởi phát ung thư? Vậy phải chăng HIP sẽ có mối liên hệ nào đó với các gen ung thư? hoặc với những tác nhân gây đột biến hay các yếu tố tham gia quá trình sửa chữa DNA? Sẽ cần có nhiều nghiên cứu nữa mới có thể trả lời được những câu hỏi này. Song cho dù thế nào đi chăng nữa thì những kết quả nghiên cứu trên cũng đã cho thấy vai trò của HIP, EGFR trong bệnh học phân tử của ung thư biểu mô tuyến vú, mở ra một triển vọng ứng dụng HIP và EGFR không chỉ là một marker mới trong chẩn đoán ung thư vú mà còn có thể là một cái đích đầy hứa hẹn cho liệu pháp phân tử trị nhằm ngăn chặn dòng thác

tín hiệu được truyền vào trong tế bào mà HIP và EGFR là khâu then chốt.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu đánh giá mức độ sao chép mRNA và biểu hiện của protein tương tác với heparansulfat (HIP) và thụ thể yếu tố phát triển biểu mô trên 47 mẫu mô ung thư biểu mô tuyến vú và 15 mẫu mô u xơ tuyến vú chúng tôi có những kết luận sau :

1. Mức độ sao chép mRNA và biểu hiện protein của HIP và EGFR

+ Mức độ sao chép mRNA và biểu hiện protein HIP và EGFR ở mô UTBM tuyến vú cao hơn so với ở mô u xơ tuyến vú và tăng theo giai đoạn tiến triển trong ung thư vú thể ống.

+ Tỷ lệ HIP/GAPDH ở các mẫu ung thư là: $1,27 \pm 0,44$ cao hơn hẳn so với các mẫu u xơ tuyến vú là $0,40 \pm 0,10$. Tỷ lệ EGFR/GAPDH ở các mẫu ung thư là $1,09 \pm 0,25$ cao hơn so với các mẫu u xơ tuyến vú là $0,73 \pm 0,09$.

2. Ở giai đoạn II của UTBM tuyến vú:

+ Mức độ sao chép mRNA và biểu hiện protein HIP phụ thuộc vào các thể mô bệnh học: tăng cao ở UTV thể ống và thể nhày, thấp dần ở UTV thể tiểu thùy và thể tủy

+ Mức độ sao chép mRNA EGFR tăng cao nhất ở UTV thể ống, và thể nhày, thấp dần ở UTV thể tiểu thùy và thể tủy

Mức độ biểu hiện protein EGFR: kết quả HMMD tỷ lệ (+) cao ở UTV thể ống, thấp hơn ở thể tiểu thùy, thể tủy và thể nhày

KIẾN NGHỊ

Trong điều kiện có thể cùng với xét nghiệm mô bệnh học (tiêu bản mô bệnh học soi dưới kính hiển vi quang học) nên kết hợp các xét nghiệm đánh giá mức độ biểu thị của HIP và EGFR chẩn đoán sinh học phân tử để có thêm thông tin ở mức độ phân tử trong chẩn đoán tiên lượng bệnh và theo dõi hiệu quả điều trị bệnh ung thư vú.