

PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN EGFR TRONG MẪU HUYẾT TƯƠNG BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ TẠI BỆNH VIỆN CHỢ RẪY

Phan Thanh Thăng* Nguyễn Thị Lan Hương* Hồ Trọng Toàn* Phạm Văn Lợi*
Trần Thanh Tùng* Lê Tuấn Anh²* Lê Thị Thu Swong²* Lê Thượng Vũ³* Nguyễn
Thúy Hằng⁴* Hoàng Văn Thịnh⁴* Trần Bích Thu⁵* Nguyễn Trường Sơn⁶*

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Việc xác định đột biến gen EGFR ở bệnh nhân (BN) ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC - non-small cell lung cancer) cung cấp thông tin rất quan trọng cho bác sĩ lâm sàng trước khi quyết định điều trị bằng TKIs (TKIs - tyrosine kinase inhibitors) cho BN. Kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA để phát hiện đột biến EGFR trong mẫu mô được xem là tiêu chuẩn vàng hiện nay. Tuy nhiên phát hiện đột biến EGFR bằng mẫu huyết tương của BN NSCLC là phương pháp không xâm lấn, có nhiều ưu điểm vượt trội trong lâm sàng.

Mục tiêu: Đánh giá khả năng phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương của BN NSCLC so với phương pháp sử dụng mẫu mô.

Đối tượng nghiên cứu: 42 cặp mẫu máu và mô sinh thiết của 42 BN NSCLC giai đoạn IIIB-IV tại bệnh viện Chợ Rẫy.

Phương pháp nghiên cứu: Tiến cứu cắt ngang, mô tả hàng loạt ca, nhằm khảo sát 2 đột biến EGFR có tần suất cao gồm mất đoạn ở exon 19 (Del19), đột biến điểm L858R ở exon 21, và đột biến T790M ở exon 20 có liên quan đến kháng thuốc.

Kết quả: Độ tuổi trung bình của BN trong nghiên cứu là 58 tuổi (28 - 85), với tỉ lệ nam/nữ khoảng 2/1. Đa số các trường hợp được chẩn đoán carcinôm tuyến, thuộc giai đoạn IV theo TNM, và dương tính với dấu ấn CK7, TTF1. Có 17 trường hợp (40,5%) có đột biến EGFR trong mẫu huyết tương và 19 trường hợp (45,2%) có đột biến EGFR trong mẫu mô. Không có sự khác biệt về tỉ lệ đột biến trong mẫu huyết tương so với trong mẫu mô ($p > 0,05$). Tỉ lệ đột biến EGFR trong mẫu huyết tương và mẫu mô ở nữ là cao hơn so với ở nam ($p < 0,05$); và cao hơn ở nhóm thuộc giai đoạn IV so với ở nhóm giai đoạn IIIB ($p < 0,05$). Độ tương đồng kết quả xét nghiệm EGFR trong mẫu huyết tương so với trong mẫu mô là 81,0%, với độ nhạy 73,7 và độ đặc hiệu 87,0%.

Giá trị chẩn đoán âm và dương của xét nghiệm trong mẫu huyết tương lần lượt là 80,0% và 82,4%. Độ tương đồng, độ nhạy và đặc hiệu theo đột biến Del19 lần lượt là 85,7%, 54,6% và 96,8%; theo đột biến T790M lần lượt là 78,6%, 50% và 81,8%; và theo đột biến L858R lần lượt là 92,9%, 83,3%, và 94,4%.

Kết luận: Nghiên cứu 42 BN NSCLC cho thấy tỉ lệ đột biến EGFR trong mẫu huyết tương không khác biệt so với trong mẫu mô. So với sử dụng mẫu mô, phương pháp phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương bằng kỹ thuật scorpions ARMS có độ tương đồng, độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

Từ khóa: ung thư phổi không tế bào nhỏ, scorpions ARMS, cfDNA.

ABSTRACT

DETECTING EGFR MUTATIONS IN PLASMA SAMPLE FROM NON SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS AT CHO RAY HOSPITAL

Background: The determination of EGFR mutations in non-small cell lung cancer helps clinical doctors in choosing the targeted therapy by TKIs for patients. Today, sequencing technique applying on tissue sample has been being used as the gold standard in EGFR analysis. However, the detection method for EGFR mutations based on plasma sample is the non-invasive method with several advantages in clinical practice.

Objective: To evaluate the capability of detecting EGFR mutations in plasma sample by scorpions ARMS technique comparing to method based on tumor tissue.

Subjects: 42 pairs of plasma and tissue samples from NSCLC patients stage IIIB-IV at Cho Ray hospital.

Methods: Prospective cross-sectional study. Plasma and tumor tissue samples from each case were assessed for 2 EGFR mutations subtype with high prevalence (Del19, L858R) and a related resistance mutation in exon 20 (T790M).

Results: The median age of patients is 58 years (28 to 85 years). Male/female patient ratio is about 2/1. The majority of cases were diagnosed with adeno-carcinoma; stage IV following TNM classification system; and positive for CK7 and TTF1 markers. EGFR mutations were detected in 17 (40,5%) plasma samples and in 19 (45,2%) tumor tissue samples. there was no significant difference between the two groups (McNemar's test with $p > 0,05$). The EGFR mutations in plasma and tumor tissue samples show higher rate in female compared to male; and show higher rate in stage IV compared to stage IIIB group ($p < 0,05$). Compared with matched tumor tissue, the concordance rate of EGFR mutation status in plasma was 81.0%. The overall sensitivity and specificity of detecting EGFR mutations in plasma were 73,7% and 87,0% respectively. The negative and positive predictive values of EGFR mutation status detection were 80.0% and 82.4%, respectively. The concordance rate, sensitivity and specificity for Del19 mutant detection were 85.7%, 54.6%, 96.8%; for T790M mutant detection were 78.6%, 50.0%, 81.8%; and for L858R mutant detection were 92.9%, 83.3%, 94.4%, respectively.

Conclusions: studying on 42 NSCLC patients revealed that EGFR mutation rate in plasma and tumor tissue samples was not significant different. Comparing to tumor tissue method, the EGFR mutations detecting method using plasma samples by scorpions ARMS technique show the high concordance rate, sensitivity and specificity.

Key words: non-small cell lung cancer, NSCLC, scorpions ARMS, cfDNA.

*Đơn vị Sinh học phân tử - Di truyền, bệnh viện Chợ Rẫy Email: thanhthangphan@gmail.com

²*Trung tâm Ung bướu, bệnh viện Chợ Rẫy

³*Khoa Nội Hô hấp, bệnh viện Chợ Rẫy

⁴*Khoa Giải phẫu bệnh lý, bệnh viện Chợ Rẫy

⁵*Khoa Sinh học ĐH Khoa học Tự nhiên Tp.HCM

⁶*Bệnh viện Chợ Rẫy

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu tại Việt Nam và nhiều nước trên thế giới.^{1,2,7,9} Có tới 75 - 80% các trường hợp ung thư phổi nguyên phát là ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC - non-small cell lung cancer). Hầu hết bệnh nhân (BN) ($\approx 80\%$) khi được phát hiện đều ở giai đoạn tiến xa (giai đoạn IIIB và IV). Erlotinib và Gefitinib là thuốc ức chế đặc hiệu hoạt tính tyrosine kinase của thụ thể EGFR (epidermal growth factor receptor)- thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì; được mã hóa bởi gen EGFR, được chỉ định điều trị cho BN NSCLC khi có đột biến EGFR.

Việc xác định đột biến gen EGFR ở BN NSCLC có vai trò quyết định việc điều trị hay không điều trị bằng TKIs cho BN.¹¹ Hiện nay, kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA dựa trên mẫu mô ung thư được xem là tiêu chuẩn vàng trong phát hiện đột biến gen EGFR. Tuy nhiên, phương pháp này không khả thi trong một số trường hợp không đủ điều kiện cho phép sinh thiết, hoặc mẫu sinh thiết quá nhỏ, không đủ để giải trình tự gen, hoặc cần kiểm tra lại bằng mẫu huyết tương khi tín hiệu đột biến thấp.^{8,9,11,19} Phương pháp phát hiện đột biến gen EGFR bằng cách sử dụng cfDNA (circulating free DNA) có trong huyết tương BN NSCLC (mẫu “sinh thiết lỏng” - Liquid Biopsy) có nhiều ưu điểm vượt trội.^{5,6,8,9,19} Điều này cho phép BN có thêm cơ hội để làm xét nghiệm chẩn đoán, đồng thời có thể làm xét nghiệm lặp lại nhiều lần để theo dõi điều trị mà không cần can thiệp sâu như sinh thiết. Bên cạnh đó, phương pháp này khá đơn giản, dễ thực hiện, giảm được chi phí và thời gian cho BN, và không gây ra biến chứng.

Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu tổng quát: đánh giá khả năng phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương của BN NSCLC bằng kỹ thuật scorpions ARMS tại bệnh viện Chợ Rẫy.

Mục tiêu cụ thể:

- Mô tả, so sánh kết quả đột biến EGFR trong mẫu huyết tương với kết quả đột biến EGFR trong mẫu mô của BN NSCLC; trong mối liên quan với đặc điểm lâm sàng - giải phẫu bệnh.

- Đánh giá khả năng phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương so với phương pháp sử dụng mẫu mô.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng trong nghiên cứu này gồm 42 BN mới được chẩn đoán mắc NSCLC giai đoạn IIIB-IV tại bệnh viện Chợ Rẫy từ tháng 6/2016 - 12/2016. Bệnh nhân được chẩn đoán xác định NSCLC bằng kỹ thuật nhuộm mô học H&E và hóa mô miễn dịch; thuộc một trong các loại mô học: carcinôm tuyến; carcinôm gai tuyến; carcinôm tế bào gai; và carcinôm tế bào lớn. Trên lâm sàng, BN được xếp loại giai đoạn IIIB hoặc IV theo tiêu chí phân loại TNM 2010 (UICC). Tất cả các đối tượng đều được tư vấn và thể hiện sự đồng ý của mình khi tham gia vào nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp tiến cứu cắt ngang, mô tả hàng loạt ca, từ tháng 6/2016 đến tháng 12/2016. Với mỗi trường hợp, mẫu mô và mẫu huyết tương được phân tích đồng thời để tìm đột biến EGFR, trong đó giải trình tự chuỗi DNA trên mẫu mô (xem như tiêu chuẩn vàng) được lấy làm tiêu chuẩn để so sánh. So sánh kết quả xét nghiệm đột biến EGFR trong mẫu huyết tương với kết quả xét nghiệm đột biến EGFR trong mẫu mô. Đánh giá khả năng phát hiện đột biến EGFR của phương pháp sử dụng mẫu huyết tương so với sử dụng mẫu mô. Nghiên cứu được tiến hành nhằm khảo sát 2 dạng đột biến EGFR có tần suất cao gồm mất đoạn ở exon 19 (Del19) và đột biến điểm L858R ở exon 21, cùng với đột biến T790M ở exon 20, là đột biến được chứng minh có liên quan đến đề kháng với TKIs.

Kỹ thuật tách chiết DNA

Mẫu máu sau khi thu thập được xử lý liền bằng cách ly tâm ở 4°C/2000rpm trong 10 phút; sau đó là 4°C/12000rpm trong 10 phút để thu khoảng 4ml huyết tương. cfDNA trong mẫu huyết tương được tách chiết bằng bộ kit QIASymphony® Circulating DNA (Qiagen-Đức). Quy trình kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất, thực hiện trên máy QIASymphony, ứng dụng công nghệ tách chiết bằng hạt từ có độ tinh sạch và hiệu suất tách chiết cao.¹²

Mẫu mô vùi nên được thu thập từ khoa Giải phẫu bệnh lý (khoảng 03 lát cắt có độ dày 5µm hoặc thu từ tiêu bản đã được đánh dấu bởi bác sĩ giải phẫu bệnh). Khử parafin trong mẫu mô bằng

dung dịch xylene, sau đó khử xylene bằng ethanol 100%. Ly giải tế bào bằng 180µl dung dịch ATL và 20µl proteinase K, ủ 1 giờ ở 56°C và 1 giờ ở 90°C. Tách chiết genomic DNA bằng bộ kit QIAamp® FFPE Tissue, thực hiện trên máy QIAcube (Qiagen-Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.¹³ Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được xác định bằng máy NanoDrop 8000 (Thermo scientific-Mĩ). DNA sau tách chiết được lưu ở -80°C đến khi làm xét nghiệm.

Phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương bằng kỹ thuật scorpions ARMS

Kỹ thuật PCR được sử dụng trong nghiên cứu là sự kết hợp giữa công nghệ khuếch đại đặc hiệu alen đột biến (ARMS - Amplification Refractory Mutation System) và công nghệ scorpions sử dụng các cặp mồi thông minh trong phản ứng PCR để phát hiện các đột biến gen khi alen đột biến chiếm tỉ lệ rất nhỏ. Nghiên cứu sử dụng bộ kit theascreen® EGFR Plasma RGQ PCR (Qiagen-Đức) để phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương. Bộ Kit phát hiện được đột biến EGFR ở mức 4,24% T790M; 5,94% L858R; 1,45% Del19.¹⁴ Quy trình kỹ thuật được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, trên máy RotorGene Q 5Plex HRM.

Phát hiện đột biến EGFR trong mẫu mô bằng kỹ thuật pyrosequencing

Bộ kit theascreen® EGFR Pyro (Qiagen-Đức) được sử dụng để chạy phản ứng giải trình tự, phát hiện đột biến EGFR trong mẫu mô. Quy trình kỹ thuật gồm 3 bước: khuếch đại đoạn gen EGFR; tinh sạch sản phẩm sau PCR; và chạy phản ứng giải trình tự phát hiện đột biến EGFR. Khuếch đại đoạn gen EGFR bằng cách sử dụng các cặp mồi bắt lấy DNA ở 2 đầu từng exon 19, 20, và 21. Lượng DNA sử dụng cho phản ứng PCR khoảng 2 - 10ng. Bước tinh sạch sản phẩm sau PCR nhằm thu giữ các đoạn DNA mục tiêu có độ tinh sạch cao làm sản phẩm cho phản ứng giải trình tự. Phản ứng giải trình tự được thực hiện trên máy Pyromark Q24, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.¹⁵ Kết quả giải trình tự được phân tích tự động bằng phần mềm Pyromark Q24 2.0.6.

Phân tích thống kê

Dữ liệu từ nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm thống kê STATA 12.0 (Lakeway Drive, Texas, Mỹ). Các đặc điểm về lâm sàng - giải phẫu bệnh, bao gồm cả giới tính và loại mô học được

thống kê theo tình trạng (có hay không có) đột biến EGFR. Phép kiểm chi bình phương được sử dụng để đánh giá mối liên quan của việc xuất hiện đột biến EGFR với đặc điểm lâm sàng - giải phẫu bệnh. Phép kiểm có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$. Phép kiểm McNemar's được sử dụng để đánh giá sự khác biệt tỉ lệ đột biến EGFR phát hiện được trong mẫu huyết tương với trong mẫu mô. Độ tương đồng về kết quả xét nghiệm EGFR trong mẫu huyết tương so với trong mẫu mô được đánh giá bằng phép kiểm Kappa. Thống kê nhằm xác định độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị chẩn đoán âm tính, giá trị chẩn đoán dương tính của phương pháp phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương bằng kỹ thuật scorpions ARMS so với phương pháp sử dụng mẫu mô (khoảng tin cậy 95%); bao gồm thống kê chung và thống kê theo từng kiểu đột biến.

KẾT QUẢ

Từ tháng 6/2016 - 12/2016, chúng tôi chọn được 42 BN đủ tiêu chuẩn vào nghiên cứu, và thu nhận được 42 cặp mẫu huyết tương và mô. Kết quả của nghiên cứu như sau:

Đặc điểm lâm sàng - giải phẫu bệnh

Đặc điểm lâm sàng và giải phẫu bệnh của nhóm nghiên cứu được trình bày theo bảng 1 như sau:

Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng - giải phẫu bệnh của nhóm nghiên cứu

Tuổi	Nhóm	Số trường hợp (n = 42)	Tỉ lệ (%)	P
Trung bình: 58t (28 – 85)	≤ 60 tuổi	22	52,4	0,87
	>60 tuổi	20	47,6	
Giới tính	Nữ	14	33,3	0,04
	Nam	28	66,7	
Đặc điểm giải phẫu bệnh	Carcinôm tuyến	35	83,3	<0,01
	Khác*	7	16,7	
	CK7+	40/42	95,2	<0,01**
	CK20+	1/42	2,3	
TTF1+	37/42	88,1		
Giai đoạn bệnh (TNM 2010)	IIIB	14	33,3	0,04
	IV	28	66,7	

*Bao gồm: carcinôm gai tuyến, carcinôm tế bào gai, và carcinôm tế bào lớn;

**So sánh tỉ lệ CK7+, TTF1+ với CK20+.

Nhận xét: Tỉ lệ nam/nữ trong nghiên cứu khoảng 2/1; carcinôm tuyến và giai đoạn IV chiếm

đa số ($p < 0,05$); hầu hết trường hợp dương tính với dấu ấn CK7, TTF1 và âm tính với CK20 ($p < 0,05$).

Đặc điểm đột biến EGFR trong mẫu huyết tương và mẫu mô

Đặc điểm đột biến EGFR trong mẫu huyết tương và mẫu mô được ghi nhận theo bảng 2.

Nhận xét: Tỷ lệ đột biến EGFR trong mẫu huyết tương không khác biệt so với trong mẫu mô ($p > 0,05$). Tỷ lệ đột biến EGFR trong mẫu huyết tương và mẫu mô cao hơn ở nữ so với nam; và cao hơn ở nhóm thuộc giai đoạn IV so với giai đoạn IIIB ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt về tỷ lệ đột biến trong các loại mẫu theo độ tuổi như trên và theo dạng mô học.

Khả năng phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương so với trong mẫu mô

Khả năng phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương (kỹ thuật scorpions ARMS) so với trong mẫu mô (kỹ thuật pyrosequencing) được trình bày theo bảng 3 như sau:

Nhận xét: Tỷ lệ đột biến EGFR trong mẫu huyết tương là không khác biệt so với trong mẫu mô (thống kê McNema'r với p đều $> 0,05$). Kết quả xét nghiệm EGFR trong mẫu huyết tương có độ tương đồng cao so với kết quả xét nghiệm trong mẫu mô (tương đồng 81%; trị số Kappa $> 0,6$ với $p < 0,01$). So với xét nghiệm EGFR bằng mẫu mô, xét nghiệm EGFR sử dụng mẫu huyết tương có độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị chẩn đoán âm và chẩn đoán dương cao. Xét nghiệm đột biến L858R trong

mẫu huyết tương có độ nhạy, độ đặc hiệu và tương đồng so với trong mẫu mô cao nhất trong 3 kiểu đột biến được khảo sát.

BÀN LUẬN

Đặc điểm lâm sàng - giải phẫu bệnh

Tuổi trung bình của BN trong nghiên cứu này là 58 tuổi (khoảng tuổi từ 28 - 85). Số BN có độ tuổi ≤ 60 là 22 (52,4%), tương đương với nhóm > 60 tuổi ($p > 0,05$). Tỷ lệ nam/nữ trong nghiên cứu khoảng 2,2/1. Chúng tôi ghi nhận độ tuổi và tỷ lệ nam/nữ trong nghiên cứu là tương đương với các nghiên cứu trong và ngoài nước.^{4,16-18}

Trong 42 trường hợp, chúng tôi ghi nhận có 35 trường hợp (83,3%) carcinôm tuyến, nhiều hơn tổng cộng các dạng mô học khác như carcinôm tế bào gai, carcinôm gai tuyến và carcinôm tế bào lớn ($p < 0,01$). Có 40/42 trường hợp (95,2%) dương tính với dấu ấn CK7, và 37/42 trường hợp (88,1%) dương tính với dấu ấn TTF1, là các dấu ấn đặc trưng của ung thư phổi nguyên phát.²⁰ Chỉ có 1/42 trường hợp (2,3%) dương tính với dấu ấn CK20, là dấu ấn ung thư phổi thứ phát, thường thấy ở tế bào biểu mô đường tiêu hóa.²⁰ Có 28 trường hợp (66,7%) thuộc giai đoạn IV, nhiều hơn so với giai đoạn IIIB (14 trường hợp, 33,3%) ($p < 0,05$). Các kết quả này tương tự kết quả của các nghiên cứu ở trong và ngoài nước.^{4,16-18} Thói quen hút thuốc lá không được ghi nhận đầy đủ theo hồ sơ bệnh án.

Bảng 2. Đặc điểm đột biến EGFR

Đặc điểm		Mẫu huyết tương (n = 42)			Mẫu mô (n = 42)		
		Đột biến	Bình thường	P	Đột biến	Bình thường	P
Tổng (n = 42)		17	25	-	19	23	0,659*
Tuổi	≤ 60 tuổi	10	12	0,49	11	11	0,52
	> 60 tuổi	7	13		8	12	
Giới tính	Nữ	9	5	0,03	11	3	$< 0,01$
	Nam	8	20		8	20	
Loại mô học	Carcinôm tuyến	15	20	0,48	15	20	0,49
	Khác	2	5		4	3	
Giai đoạn bệnh	III _B	2	12	0,01	3	11	0,03
	IV	15	13		16	12	

*So sánh tỷ lệ có đột biến EGFR trong mẫu mô và huyết tương

Bảng 3. Độ tương đồng và giá trị chẩn đoán EGFR trong mẫu huyết tương so với mẫu mô

Mẫu		Mẫu mô (n=42)			Độ tương đồng % (95% CI)	Trị số Kappa (P)	Thông kê McNemar's P	Độ nhạy% (95% CI)	Độ đặc hiệu % (95% CI)	Giá trị chẩn đoán âm % (95% CI)	Giá trị chẩn đoán dương % (95% CI)
		Đột biến	Bình thường	Tổng							
Mẫu huyết tương (n=42)	Đột biến	14	3	17	81,0 (68,8-93,1)	0,61 (<0,01)	0,48	73,7 (48,8-90,9)	87,0 (66,4-97,2)	80,0 (65,0-89,6)	82,4 (61,1-93,3)
	Bình thường	5	20	25							
	Tổng	19	23	42							
<i>Theo đột biến Del19</i>											
Mẫu huyết tương (n=42)	Đột biến	6	1	7	85,7 (74,9-96,5)	0,58 (<0,01)	0,10	54,6 (23,4-83,3)	96,8 (83,3-100,0)	85,7 (75,8-92,0)	85,7 (44,8-97,8)
	Bình thường	5	30	35							
	Tổng	11	31	42							
<i>Theo đột biến T790M</i>											
Mẫu huyết tương (n=42)	Đột biến	2	7	9	78,6 (65,9-91,2)	0,20 (0,07)	0,10	50,0 (6,8-93,2)	81,6 (65,7-92,3)	93,9 (85,2-97,7)	22,2 (8,1-48,4)
	Bình thường	2	31	33							
	Tổng	4	38	42							
<i>Theo đột biến L858R</i>											
Mẫu huyết tương (n=42)	Đột biến	5	2	7	92,9 (84,9-100)	0,73 (<0,01)	0,56	83,3 (35,9-99,6)	94,4 (81,3-99,3)	97,1 (85,0-99,5)	71,4 (38,3-91,0)
	Bình thường	1	34	35							
	Tổng	6	36	42							

Đặc điểm đột biến EGFR trong mẫu huyết tương và mẫu mô

Tỉ lệ đột biến EGFR trong mẫu huyết tương và mẫu mô trong nghiên cứu lần lượt là 40,5% (17/42) và 45,2% (19/42) (bảng 2). Tỉ lệ này của chúng tôi tương đương với kết quả của nghiên cứu của tác giả Hoàng Anh Vũ.⁴ Chúng tôi ghi nhận tỉ lệ đột biến trong mẫu huyết tương thấp hơn so với trong mẫu mô khoảng 5% nhưng không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). Nhiều nghiên cứu ở nước ngoài cũng ghi nhận tỉ lệ đột biến này trong mẫu huyết tương thấp hơn nhiều so với trong mẫu mô.^{17,18}

Xét theo giới tính, đột biến EGFR trong mẫu huyết tương hay mẫu mô đều xảy ra với tỉ lệ cao hơn ở nữ so với nam (p < 0,05) (bảng 2). Tỉ lệ đột biến trong mẫu huyết tương ở nữ là 64,3% (9/14) và ở nam là 28,6% (8/28). Tỉ lệ đột biến trong mẫu mô ở nữ là 78,6% (11/14) và ở nam là 28,6% (8/28). Tỉ lệ đột biến EGFR ở nữ cao hơn so với nam là tương tự với kết quả của nhiều nghiên cứu trên thế giới.^{3,18}

Xét theo giai đoạn bệnh, đột biến EGFR trong mẫu huyết tương hay trong mẫu mô đều xảy ra với tỉ lệ cao hơn ở nhóm thuộc giai đoạn IV so với nhóm thuộc giai đoạn IIIB (p < 0,05). Tỉ lệ đột biến

trong mẫu huyết tương của nhóm thuộc giai đoạn IV là 53,6% (15/28), và của nhóm thuộc giai đoạn IIIB là 14,3% (2/14). Tỉ lệ đột biến trong mẫu mô của nhóm thuộc giai đoạn IV là 57,1% (16/28), và của nhóm thuộc giai đoạn IIIB là 21,4% (3/14).

Trong cả huyết tương và mẫu mô, tỉ lệ đột biến EGFR không có sự khác biệt giữa nhóm ≤ 60 tuổi so với > 60 tuổi; và giữa nhóm thuộc carcinôm tuyến so với dạng mô học khác (p > 0,05). Tỉ lệ đột biến EGFR ở carcinôm tuyến và các dạng mô học khác không có sự khác biệt là tương tự như kết quả nghiên cứu của tác giả Hoàng Anh Vũ,⁴ nhưng khác với nghiên cứu ở nước ngoài (tỉ lệ đột biến EGFR ở carcinôm tuyến cao hơn nhiều so với dạng mô học khác).

Khả năng phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương so với trong mẫu mô

Trong 42 trường hợp xét nghiệm đột biến EGFR ở 2 loại mẫu, có 14 trường hợp (33,3%) có đột biến và 20 trường hợp (47,7%) không có đột biến trong cả huyết tương và mẫu mô (bảng 3). Có 5 trường hợp (11,9%) có đột biến trong mẫu mô nhưng không phát hiện được trong mẫu huyết tương, và 3 trường hợp (7,1%) phát hiện được đột biến trong mẫu huyết tương nhưng không phát

hiện được bằng mẫu mô. Tỷ lệ đột biến EGFR trong huyết tương và mẫu mô không có sự khác biệt (thống kê McNemar's với p đều >0,05).

Nhiều nghiên cứu ghi nhận độ tương đồng kết quả xét nghiệm EGFR trong mẫu huyết tương so với trong mẫu mô dao động trong khoảng 58,3 - 94,4%. Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận độ tương đồng kết quả giữa 2 phương pháp là 81,0% (68,8 - 93,1%). Hệ số Kappa >0,6 cũng cho thấy phương pháp phát hiện đột biến trong mẫu huyết tương có độ tương đồng cao so với trong mẫu mô. Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của tác giả Xiao Zhao (71,2%)¹⁷ và Xuefei Li (73,6%).¹⁸ nhưng thấp hơn so với của tác giả Jean-Yves Douillard (94,3%).⁶

Qua nghiên cứu chúng tôi ghi nhận, so với phương pháp sử dụng mẫu mô, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương lần lượt là 73,7% (48,8 - 90,9%) và 87,0% (66,4 - 97,2%). So với một số nghiên cứu trên thế giới sử dụng kỹ thuật scorpions ARMS, độ nhạy trong nghiên cứu của chúng tôi có phần cao hơn, trong khi độ đặc hiệu có phần thấp hơn: Jean-Yves Douillard (nhạy 65,7%; đặc hiệu 99,8%);⁶ Jie Luo (nhạy 52,5%; đặc hiệu 94,7%);⁸ Xiao Zhao (nhạy 35,6%; đặc hiệu 95,5%);¹⁷ Xuefei Li (nhạy 48,2%; đặc hiệu 95,4%).¹⁸ Giá trị chẩn đoán âm tính và chẩn đoán dương tính trong nghiên cứu đều trên 80%.

Tỷ lệ âm tính giả khi sử dụng mẫu huyết tương trong nghiên cứu là 26,3% (5/19). Điều này cũng được ghi nhận trong các nghiên cứu khác.^{6,10,17,18} Hiện tượng này có thể do cfDNA có đột biến tồn tại trong mẫu huyết tương với tỷ lệ thấp hơn độ nhạy của kỹ thuật scorpions ARMS. Trong nghiên cứu có 3 trường hợp (7,1%) phát hiện được đột biến trong huyết tương nhưng có kết quả bình thường trong mẫu mô. Điều này cũng được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu,^{6,10,17,18} do đột biến EGFR trong huyết tương có thể bắt nguồn từ tế bào ở các vị trí khác nhau trong khối u. Như vậy, với những trường hợp cho kết quả xét nghiệm bình thường trong mẫu huyết tương (hoặc mẫu mô), chúng tôi cho rằng nếu có thể, nên thực hiện thêm xét nghiệm trong mẫu mô (hoặc huyết tương) để đánh giá tốt hơn cho BN.

Khi phân tích theo kiểu đột biến chúng tôi ghi nhận độ tương đồng là cao nhất ở đột biến L858R (92,9%); sau đó tới đột biến Del19 (85,7%), và đột

biến T790M (78,6%) (bảng 3). Độ nhạy cũng cao nhất ở đột biến L858R (83,3%); sau đó tới đột biến Del19 (54,6%), và đột biến T790M (50,0%). Độ đặc hiệu cao hơn ở đột biến L858R và đột biến Del19 (94,4% và 96,8%) so với đột biến T790M (81,6%). Độ tương đồng và đặc hiệu của 2 đột biến L858R và Del19 trong nghiên cứu của chúng tôi là tương đương với kết quả nghiên cứu của tác giả Jean-Yves Douillard (tương đồng khoảng 97%, đặc hiệu khoảng 99%).⁶ Giá trị chẩn đoán âm và chẩn đoán dương của từng kiểu đột biến trong nghiên cứu đều cao, trừ giá trị chẩn đoán dương của đột biến T790M, chỉ khoảng 22%. Có thể thấy, trong tổng số 9 trường hợp phát hiện được đột biến T790M trong huyết tương, chỉ có 2 trường hợp có đột biến này trong mẫu mô. Và như đã trình bày, đột biến trong huyết tương có thể xuất phát từ tế bào ở nhiều vị trí khác nhau trong khối u. Ở đây, có tới 7/9 trường hợp không phát hiện thấy đột biến T790M trong mẫu mô thu được từ sinh thiết.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên 42 BN NSCLC giai đoạn IIIB-IV được thực hiện xét nghiệm đột biến EGFR đồng thời bằng mẫu mô và mẫu huyết tương, chúng tôi đi đến kết luận như sau:

- Tỷ lệ đột biến EGFR trong mẫu huyết tương không khác biệt so với trong mẫu mô; cao hơn ở giai đoạn IV so với giai đoạn IIIB; và cao hơn ở nữ so với nam.

- So với phương pháp sử dụng mẫu mô, phương pháp phát hiện đột biến EGFR trong mẫu huyết tương bằng kỹ thuật scorpions ARMS có độ tương đồng, độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

- Ngày phản biện: 28/2/2017

- Ngày đăng báo: 10/03/2017

CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ kit để làm xét nghiệm miễn phí cho BN. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự đóng góp cho nghiên cứu bởi Qiagen Global, và các BN đã tham gia vào chương trình nghiên cứu này tại bệnh viện Chợ Rẫy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Chí Viết, Lê Văn Cường, Nguyễn Chấn Hùng (2010). Khảo sát những đặc điểm lâm sàng và điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ. H y học TP.Hồ Chí Minh, Tập 14: tr.386-396.
2. Ferlay J. et al. (2008). Cancer incidence and mortality Worldwide. IARC Cancer Base No.10.

3. Hisayuki Shigematsu, Adi F. Gazdar. (2006). Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int. J. Cancer*:118,257-262.
4. Hoàng Anh Vũ, Cao Văn Động, Ngô Thị Tuyết Hạnh, Đặng Hoàng Minh, Phan Thị Xinh, Hứa Thị Ngọc Hà (2011). Đột biến gen EGFR và KRAS trên BN ung thư phổi không tế bào nhỏ. *Y học TP.Hồ Chí Minh*, Tập 15: tr.166-172.
5. Hua Bai et al. (2009). Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV Non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 27(16):2653-9.
6. Jean-Yves Douillard et al. (2014). Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC circulating free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *Journal of Thoracic Oncology*, Volume 9, Number 9: 1345-1353.
7. Jemal A. et al. (2008). Cancer statistics in 2008. *Cancer J Clin*, 58(2):71-79.
8. Jie Luo, Li Shen, Di Zheng. (2014). Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 4:6269.
9. Kai guo et al. (2015). Detection of epidermal growth factor receptor mutation in plasma as a biomarker in chinese patients with early stage non-small cell lung cancer. *OncoTargets and Therapy*; 8:3289-3296.
10. Kimura H. et al. (2006). Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 12:3915-3921.
11. Nguyễn Minh Hà (2012). Vai trò của đột biến gen EGFR trong liệu pháp điều trị trúng đích bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ. *Y học TP.Hồ Chí Minh*, Tập 16, Phụ bản Số 1:1-6.
12. Qiagen (2015). QIAasymphony © Circulating DNA Kit Handbook. Qiagen GmbH, 40724 Hilden, Germany.
13. Qiagen (2012). QIAamp © DNA FFPE Tissue Kit Handbook. Qiagen Manchester Ltd, Manchester, M15 6SH, UK.
14. Qiagen (2014). Therascreen © EGFR Plasma RGQ PCR Kit Handbook, Version 1. Qiagen Manchester Ltd, Manchester, M15 6SH, UK.
15. Qiagen (2015). Therascreen © EGFR Pyro Kit Handbook, Version 1. Qiagen GmbH, 40724 Hilden, Germany.
16. Trần Minh Thông, Phạm Hùng Vân, Đoàn Trọng Nghĩa, Nguyễn Thúy Hằng (2013). Khảo sát đặc điểm giải phẫu bệnh và đột biến EGFR trong 116 trường hợp ung thư phổi không tế bào nhỏ. *Y học TP.HCM*, Tập 17, Phụ bản số 3: Tr.67-70.
17. Xiao Zhao et al. (2013). Comparison of epidermal growth factor receptor mutation statuses in tissue and plasma in stage I-IV non-small cell lung cancer patients. *Respiration*; 85:119-125.
18. Xuefei Li et al. (2014). Peripheral blood for epidermal growth factor receptor mutation detection in non-small cell lung cancer patients. *Translational Oncology*, 7:341-348.
19. Yahya I. Elshimali et al. (2013). The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *Int. J. Mol. Sci*, 14:18925-18958.
20. Yue-Chiu Su et al. (2006). Role of TTF-1, CK20, and CK7 Immunohistochemistry for diagnosis of primary and secondary lung adenocarcinoma. *Kaohsiung J Med Sci*, Vol 22; issue 1:14-19.