

Công nghệ sinh thiết lỏng trong sàng lọc phát hiện sớm các loại ung thư

Hồ Hữu Thọ, Triệu Thị Nguyệt

Phòng Công nghệ gen và Di truyền tế bào, Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự,
Học viện Quân y

Phát hiện sớm ung thư là mối quan tâm hàng đầu hiện nay, giúp tăng hiệu quả điều trị và giảm tỷ lệ tử vong. Sinh thiết lỏng là một công nghệ mới đầy tiềm năng đang được các nhà khoa học trên thế giới hướng đến ứng dụng trong phát hiện sớm nhiều loại ung thư. Bài viết đề cập đến những tiến bộ mới liên quan đến kỹ thuật sinh thiết lỏng trong sàng lọc phát hiện sớm các loại ung thư phổ biến hiện nay.

Đặt vấn đề

Các liệu pháp điều trị ung thư thường thành công khi bệnh được phát hiện và điều trị sớm. Sàng lọc ung thư nhằm mục đích phát hiện ung thư ở giai đoạn đầu, trước khi các triệu chứng xuất hiện, khi đó điều trị có khả năng đạt hiệu quả cao nhất. Sinh thiết khối u được coi là tiêu chuẩn “vàng” nhưng cũng bộc lộ nhiều hạn chế. Sinh thiết truyền thống và các thủ thuật phẫu thuật là các phương pháp xâm lấn, người bệnh có khả năng chịu các biến chứng tiềm ẩn, đôi khi các phương pháp này không thể lặp lại và không thể thực hiện khi tình trạng lâm sàng xấu đi hoặc khi khối u không thể tiếp cận được [1]. Thêm vào đó, khối u được phát hiện qua sinh thiết truyền thống thường ở giai đoạn trung hoặc muộn. Ngoài ra, mô hình bộ gen của các mô sinh thiết cung cấp một hình ảnh khối u giới hạn trong một thời điểm duy nhất và cũng có thể cho thấy sự không đồng nhất về di truyền của nhiều phân nhóm khối u [2]. Do đó, yêu cầu cần thiết đặt ra hiện nay là thiết lập và phát triển công nghệ mới có thể khắc phục những hạn chế này. “Sinh thiết lỏng” là

công nghệ mới đáp ứng được yêu cầu này do nguyên liệu cho công nghệ này là các chất lỏng (mẫu máu hoặc dịch cơ thể).

Các dấu ấn sinh học trong công nghệ sinh thiết lỏng

Công nghệ sinh thiết lỏng trong phát hiện sớm các loại ung thư dựa trên việc xác định sự hiện diện các dấu ấn khối u lưu hành trong máu ngoại vi hoặc dịch cơ thể. Mỗi một loại ung thư đặc trưng bởi một dấu ấn sinh học riêng; việc lựa chọn dấu ấn sinh học để phát hiện sớm ung thư là rất quan trọng. Các loại nhóm dấu ấn khối u thường được sử dụng hiện nay là:

Dấu ấn DNA tự do

Dấu ấn DNA tự do (Cell-free DNA, viết tắt là cfDNA) lần đầu được xác định trong máu của những người khỏe mạnh bởi Mandel và Me tals [3]. Gần đây, cfDNA đã nổi lên như một dấu ấn sinh học tiềm năng, đặc biệt là trong các nghiên cứu về ung thư và đang được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu lâm sàng. Nó có thể mang lại lợi ích chẩn đoán, theo dõi tái phát và đánh giá đáp ứng điều trị chỉ bằng cách

lấy máu không xâm lấn. Cho đến nay, một số nhóm đã nghiên cứu phát triển các xét nghiệm sàng lọc phát hiện sớm các loại ung thư khác nhau sử dụng cfDNA. Ví dụ, đối với ung thư đại trực tràng, nhiều báo cáo đã tập trung vào việc phát hiện gen Septin9 bị methyl hóa (mSeptin9) trong huyết tương được phát hiện ở bệnh nhân mắc ung thư đại trực tràng cao hơn đáng kể so với bệnh nhân không có bằng chứng của bệnh, mSeptin9 trở thành một dấu ấn sinh học tiềm năng cho loại ung thư này.

Ngoài ra, định lượng cfDNA đã nổi lên là một công cụ khả thi để chẩn đoán sớm ung thư, đã được xác nhận trong ung thư gan và ung thư phổi không tế bào nhỏ. Nhiều nghiên cứu lâm sàng đã nhấn mạnh rằng, nồng độ cfDNA có thể được sử dụng để phân biệt giữa ung thư vú ác tính và lành tính.

Dấu ấn tế bào u lưu hành

Dấu ấn tế bào u lưu hành (circulating tumor cells - CTC) có nguồn gốc khối u được giải phóng ra máu ngoại vi hoặc dịch cơ thể có tầm quan trọng hàng đầu và là

đối tượng được đặc biệt quan tâm nghiên cứu trong 20 năm qua. Kể từ mô tả đầu tiên vào năm 1869 về các tế bào khối u trong máu ngoại vi, những tiến bộ về kỹ thuật công nghệ sinh học trong mấy năm gần đây đã cho phép phân lập được CTC ra khỏi các thành phần trong máu. CTC được tách ra từ các vị trí khối u nguyên phát hoặc thứ phát; chúng di chuyển vào hệ thống tuần hoàn và chịu trách nhiệm về sự phát triển của di căn xa. CTC rất hiếm gặp, xảy ra với tần suất thấp nhất là 1 CTC trên 10^6 - 10^7 bạch cầu, với số lượng thấp hơn trong ung thư giai đoạn đầu. Thách thức trong phát hiện CTC liên quan đến yêu cầu về độ nhạy cao kết hợp với độ đặc hiệu cao, nhưng một số yếu tố vẫn cản trở các ứng dụng lâm sàng đạt được tiêu chuẩn này, bao gồm nồng độ thấp của CTC trong máu ngoại vi, khó khăn trong việc xác định công cụ đáng tin cậy và hiệu quả để phân biệt các CTC với các tế bào khác có trong máu. Mặc dù công nghệ tách chiết và phân tích CTC đã phát triển nhanh chóng, sự phức tạp và tín hiệu phân tích yếu có thể hạn chế tiện ích lâm sàng so với các phương pháp dựa trên cfDNA [4].

Các dấu ấn khác

Các dấu ấn sinh học lưu hành khác đã được nghiên cứu để phát hiện sớm ung thư, đó là các dấu ấn RNA tự do bao gồm miRNA, lncRNA và mRNA, có thể cung cấp thêm giá trị lâm sàng trong việc đánh giá các biến đổi đặc hiệu của khối u. Sự hiện diện của mRNA có nguồn gốc từ khối u lưu hành có thể cho phép xác định hồ sơ biểu hiện gen đặc hiệu của khối u. Tuy nhiên, mRNA ngoại bào khó phát hiện trong máu, chúng dễ bị phân hủy do hoạt động RNase. Ngược lại, miRNA ổn định hơn trong máu và thường

lưu hành ở dạng có sự bảo vệ của exosome, đó là các vi hạt mang các phân tử sinh học chức năng có khả năng di chuyển đến các tế bào nhận [5].

Các kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng trong công nghệ sinh thiết lỏng

Sinh thiết lỏng liên quan đến việc phân tích các acid nucleic tự do, chủ yếu là DNA tự do (cfDNA) trong máu và dịch cơ thể. Việc lấy bệnh phẩm dễ dàng hơn cho bệnh nhân và ít xâm lấn hơn so với sinh thiết mô, nhưng phương pháp này có những hạn chế nhất định do nồng độ của cfDNA trong huyết tương ít hơn 0,001%. Nồng độ cfDNA là một dấu ấn sinh học quan trọng trong phát hiện sớm ung thư, tuy nhiên để có thể sử dụng dấu ấn này còn một số vấn đề cần được quan tâm. Như đã bàn luận, ung thư liên quan đến sự phân chia tế bào không kiểm soát và sự xâm lấn mô (di căn) gây ra bởi một loạt các đột biến trong gen của các protein điều chỉnh chu kỳ tế bào. Dựa trên cơ sở này, các kỹ thuật sinh thiết lỏng trong phát hiện sớm các loại ung thư thường dựa vào nguyên lý chung là phát hiện đột biến ở các gen quan trọng liên quan đến ung thư. Để phát hiện đột biến điểm soma, các kỹ thuật dựa trên PCR như BEAMing (beads, emulsion, amplification, and magnetic) và droplet digital PCR (ddPCR) đã được áp dụng cho độ nhạy cao (từ 1-0,001%).

BEAMing là một quá trình được xây dựng trên phương pháp PCR nhũ tương bao gồm các hạt trong các ngăn và đảm bảo rằng một sợi của sản phẩm PCR được gắn vào hạt cho phép xác định các trình tự đột biến và kiểu hoang dại ngay cả khi chúng có tỷ lệ nhỏ hơn 1:10.000. Droplet digital PCR (ddPCR) với đặc trưng là phân vùng phản ứng PCR thành

hàng nghìn giọt phản ứng riêng lẻ trước khi khuếch đại và không sử dụng đường chuẩn [6] có thể được sử dụng để định lượng mục tiêu có tỷ lệ rất thấp. CAPP-Seq (Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing) [7] là phương pháp dựa trên sự bắt giữ để phát hiện ctDNA (DNA tự do có nguồn gốc từ khối u) bằng cách sử dụng các mẫu dò chọn lọc DNA oligonucleotide được biotatin hóa để gắn đặc hiệu vào các trình tự DNA đích là các vùng bị đột biến thường xuyên trong từng loại ung thư cụ thể; cho phép xác định nhiều loại ung thư chỉ trong một lần chạy. Tuy nhiên, nhược điểm tỷ lệ lỗi trong quá trình khuếch đại ở các công nghệ giải trình tự còn cao; do vậy công nghệ giải trình tự gen Safe-SeqS được Kinde và cộng sự mô tả vào năm 2011 [8], là phương pháp giúp giảm tỷ lệ lỗi của giải trình tự thế hệ mới (NGS) xuống nhiều lần, góp phần tăng độ nhạy của NGS với các đột biến hiếm.

Hướng tiếp cận sử dụng dấu ấn cfDNA trong phát hiện sớm ung thư

Dấu ấn cfDNA liên quan biến đổi di truyền ở các gen liên quan đến ung thư

Hầu hết các biến đổi di truyền trong ung thư thuộc các con đường tín hiệu trong kiểm soát chu kỳ tế bào, quá trình tăng sinh, biệt hóa, lão hóa, apoptosis và một số gen tiền ung thư proto-oncogens. Một số con đường tín hiệu quan trọng như: 1) APC/WNT/ β -catenin, bao gồm các gen quan trọng APC, TP53, CTNNB1 đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sinh ung thư do con đường này kiểm soát lỗi trong chu kỳ tế bào; 2) RAS/RAF/MAPK, bao gồm các gen chính BRAF, KRAS, NRAS, HRAS điều khiển sự tăng sinh tế bào, sự biệt hóa, lão hóa và apoptosis, do vậy đột biến ở các

gen thuộc con đường này là một yếu tố dự báo ung thư; 3) PI3K/AKT, PTEN, và TGF β RII bao gồm các gen quan trọng PIK3A, AKT1, PTEN, TGF β RII mã hóa cho các oncogenes là con đường không thể thiếu trong cơ chế gây ung thư. Sự siêu methyl hóa đảo CpG cũng đã được tìm thấy trong ung thư, xác định sự methyl hóa ở các gen liên quan đến ung thư là một công cụ mới đầy tiềm năng [9, 10].

Dấu ấn cfDNA liên quan đến hệ gen virus

Gần đây, nhóm của Dennis Lo đã xuất bản một nghiên cứu phát hiện sớm ung thư vòm mũi họng (UTVMH) gián tiếp thông qua phát hiện hệ gen virus Epstein-Barr. UTVMH liên quan mật thiết với nhiễm virus Epstein Barr (EBV), hệ gen của EBV đã được xác định trong hầu hết các tế bào của khối u. Triển vọng to lớn của dấu ấn EBV DNA lưu hành trong máu ngoại vi đối với sàng lọc phát hiện sớm, tiên lượng và đánh giá mức độ đáp ứng điều trị UTVMH đã được khẳng định qua hàng loạt các nghiên cứu trên thế giới trong hơn 15 năm qua. Công nghệ sinh thiết lỏng trong phát hiện sớm khối u vòm họng tập trung vào tìm kiếm DNA virus mà khối u giải phóng vào máu với số lượng lớn, thay vì các đoạn DNA ngắn của chính các tế bào ung thư [11]. DNA virus được tìm thấy trong 1.112 (hoặc 5,6%) trong nhóm 20.000 người. Trong số đó, 309 trường hợp vẫn phát hiện thấy DNA virus trong các xét nghiệm một tháng sau đó và 34 trường hợp xác nhận ung thư sau khi nội soi và kiểm tra MRI. Nhiều trường hợp đã được tìm thấy ở giai đoạn sớm nhất [12].

Dấu ấn cfDNA liên quan đến DNA của ty thể

DNA tự do trong máu ngoại vi không chỉ bao gồm DNA nhân

mà cả DNA ty thể (mtDNA). Các nghiên cứu khác đã công bố về ý nghĩa lâm sàng của nồng độ mtDNA và tính toàn vẹn trong máu ngoại vi ở các loại ung thư khác nhau như phổi, vú, đại trực tràng, ung thư hạch non - Hodgkin và một số loại ung thư khác. Lượng mtDNA có thể là yếu tố phân biệt giữa các đối tượng khỏe mạnh và bệnh nhân có nguy cơ ung thư [13], việc định lượng và đánh giá hàm lượng mtDNA cho phép phân biệt các đối tượng ung thư với những người khỏe mạnh.

Kết luận

Sinh thiết lỏng hoạt động bằng cách phân tích các dấu ấn từ khối u trong một mẫu chất lỏng từ cơ thể. Trong sinh thiết lỏng, dấu ấn quan trọng nhất là cfDNA đặc biệt là các ctDNA. Một dấu ấn có ý nghĩa quan trọng khác là CTCs được tách ra từ một khối u nguyên phát. Các con đường sử dụng dấu ấn cfDNA trong phát hiện sớm ung thư chủ yếu hiện nay là: phát hiện các biến đổi di truyền trong các gen liên quan đến ung thư; phát hiện bộ gen virus là con đường gián tiếp trong phát hiện sớm một số loại ung thư chuyên biệt; tính toàn vẹn của cfDNA. Sự tiến bộ về các phương pháp dựa trên PCR như qPCR, dPCR, BEAMing hay giải trình tự thế hệ mới là công cụ đắc lực cho công nghệ sinh thiết lỏng ✍

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Perakis, and M.R. Speicher (2017), "Emerging concepts in liquid biopsies", *B.M.C. Med.*, **15**(1), p.75.
- [2] G. Siravegna, et al. (2017), "Integrating liquid biopsies into the management of cancer", *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **14**(9), pp.531-548.
- [3] R. Young, et al. (2012), "Circulating tumor cells in lung cancer", *Acta. Cytol.*, **56**(6), pp.655-660.

- [4] N. Krishnamurthy, et al., "Liquid biopsies for cancer: coming to a patient near you", *J. Clin. Med.*, **6**(1).

- [5] H. Peinado, S. Lavotshkin, and D. Lyden (2011), "The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts", *Semin. Cancer Biol.*, **21**(2), pp.139-146.

- [6] S.C. Taylor, G. Laperriere, and H. Germain (2017), "Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data", *Sci. Rep.*, **7**(1), p.2409.

- [7] A.M. Newman, et al. (2014), "An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage", *Nat. Med.*, **20**(5), pp.548-554.

- [8] I. Kinde, et al. (2011), "Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**(23), pp.9530-9535.

- [9] N. Cancer Genome Atlas (2012), "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer", *Nature*, **487**(7407), pp.330-337.

- [10] T. Armaghany, et al. (2012), "Genetic alterations in colorectal cancer", *Gastrointest Cancer Res.*, **5**(1), pp.19-27.

- [11] K.C.A. Chan, et al. (2017), "Analysis of plasma epstein-Barr virus DNA to screen for nasopharyngeal cancer", *N. Engl. J. Med.*, **377**(6), pp.513-522.

- [12] F. Mouliere, et al. (2013), "Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high KRAS or BRAF mutation load", *Transl. Oncol.*, **6**(3), pp.319-328.

- [13] F. Mouliere, et al. (2014), "Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer", *Mol. Oncol.*, **8**(5), pp.927-941.