

Đặc điểm đột biến EGFR phát hiện trong huyết tương ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018

Phạm Cẩm Phương¹, Nguyễn Thuận Lợi¹, Nguyễn Hữu Thắng², Lê Thị Luyến^{2*}

¹Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai

²Khoa Y - Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 8/5/2019; ngày gửi phản biện 10/5/2019; ngày nhận phản biện 11/6/2019; ngày chấp nhận đăng 18/6/2019

Tóm tắt:

Xét nghiệm đột biến thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (epidermal growth factor receptor - EGFR) huyết tương trong ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN) gần đây được sử dụng rộng rãi nhằm đánh giá khả năng thích hợp sử dụng thuốc ức chế EGFR tyrosine kinase (TKIs) và theo dõi đáp ứng điều trị. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm mô tả tình trạng đột biến EGFR phát hiện ở mẫu huyết tương và phân tích một số yếu tố liên quan. Phương pháp nghiên cứu: phát hiện đột biến EGFR bằng kỹ thuật real-time PCR ở 136 mẫu huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018. Kết quả nghiên cứu: 56/136 mẫu (41,2%) có đột biến EGFR; đột biến T790M chiếm 24% trong tổng số 75 đột biến được phát hiện; tỷ lệ đột biến EGFR huyết tương ở nữ cao hơn ở nam ($p=0,045$), cao hơn ở nhóm người không hút thuốc lá so với nhóm người hút thuốc lá ($p=0,027$), nhóm thuộc giai đoạn IV cao hơn các giai đoạn còn lại ($p=0,003$); tỷ lệ đột biến T790M ở nhóm đã hoặc đang điều trị TKIs cao hơn nhóm chưa từng điều trị TKIs ($p=0,001$). Kết luận: xét nghiệm đột biến EGFR huyết tương có giá trị trong phát hiện đột biến EGFR và đột biến kháng thuốc T790M; ngoài ra, xét nghiệm EGFR huyết tương cũng giúp theo dõi tiến triển của bệnh.

Từ khóa: ctDNA, đột biến gen EGFR, ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Ung thư phổi là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu tại Việt Nam và nhiều nước trên thế giới. Dựa vào mô bệnh học, có tới 85% các trường hợp ung thư phổi nguyên phát là UTPKTBN [1]. Hiện nay, có nhiều phương pháp điều trị ung thư phổi như phẫu thuật, hoá trị, xạ trị, điều trị đích; trong đó nhiều nghiên cứu đã chứng minh các thuốc TKIs có thể giúp trì hoãn bệnh tiến triển và cải thiện chất lượng sống tốt hơn so với hoá trị ở những bệnh nhân có đột biến thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì [1].

EGFR là một yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của ung thư, trong đó có ung thư phổi, được Carpenter và cộng sự nghiên cứu phát hiện vào năm 1978 [2]. Đột biến trên vùng tyrosine kinase của EGFR là rất quan trọng đối với việc xác định độ nhạy thuốc TKIs. 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 xét nghiệm đột biến EGFR trên mẫu mô trong một số trường hợp không khả thi: 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 [3-5].

Phương pháp phát hiện đột biến gen EGFR bằng cách sử dụng

ctDNA (circulating tumor DNA) có trong huyết tương bệnh nhân UTPKTBN có nhiều ưu điểm vượt trội [4, 5], cho phép bệnh nhân 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 bệnh nhân, không gây biến chứng [6].

Như vậy, việc phân tích, đánh giá tình trạng đột biến EGFR mẫu huyết tương rất cần thiết, giúp các bác sĩ lâm sàng trong việc điều trị nhằm kéo dài thời gian sống và nâng cao chất lượng sống của bệnh nhân. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm mô tả được tình trạng đột biến gen EGFR phát hiện ở mẫu huyết tương và phân tích được một số yếu tố liên quan trên bệnh nhân UTPKTBN điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng trong nghiên cứu này gồm 136 bệnh nhân được chẩn đoán UTPKTBN có chỉ định xét nghiệm đột biến gen EGFR huyết tương, điều trị tại Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 5/2017 đến tháng 8/2018 đáp ứng các tiêu

*Tác giả liên hệ: Email: luyenle66@gmail.com

Characteristics of EGFR mutations in plasma samples from non-small cell lung cancer patients at Bach Mai Hospital during 2017-2018

Cam Phuong Pham¹, Thuan Loi Nguyen¹,
Huu Thang Nguyen², Thi Luyen Le^{2*}

¹The Nuclear Medicine and Oncology Center, Bach Mai Hospital
²School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi

Received 8 May 2019; accepted 18 June 2019

Abstract:

EGFR mutation plasma analysis on non-small cell lung cancer (NSCLC) has recently been widely used to assess the suitability of targeted therapy by TKIs and follow treatment responses. This study aims to describe EGFR mutation status detected in plasma samples and analyse some related factors. The study was conducted by detecting EGFR mutations using real-time PCR technique in 136 plasma samples of NSCLC patients at Bach Mai Hospital during 2017-2018. Results: EGFR mutations were detected in 56/136 (41.2%) plasma samples; the T790M mutation accounted for 24% of 75 mutations detected; the rate of EGFR mutations, respectively, in females was higher than in males ($p=0.045$), in non-smokers was higher than in smokers ($p=0.027$), and in the stage IV group was higher than in other stages ($p=0.003$); the T790M mutation ratio in treated patients with TKIs was more common than in non-treated patients ($p=0.001$). Conclusions: EGFR mutation plasma analysis is valuable in the detection of EGFR mutations, especially T790M mutations; in addition, EGFR mutation plasma tests help to monitor the disease progression.

Keywords: ctDNA, EGFR mutations, non-small cell lung cancer.

Classification number: 3.1

chuẩn chọn lựa và tiêu chuẩn loại trừ.

Tiêu chuẩn chọn lựa:

- Bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định UTPKTBN dựa vào kết quả mô bệnh học.
- Bệnh nhân có đầy đủ hồ sơ bệnh án bao gồm thông tin hành chính, kết quả mô bệnh học, giai đoạn bệnh.
- Bệnh nhân được chỉ định xét nghiệm EGFR huyết tương.

Tiêu chuẩn loại trừ: không xác định được đột biến EGFR huyết tương do chất lượng mẫu kém.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp mô tả hồi cứu.

Mẫu nghiên cứu: được chọn theo phương pháp chọn mẫu thuận tiện.

Các biến số, chỉ số trong nghiên cứu: thông tin chung của đối tượng nghiên cứu (tuổi, giới, địa chỉ, tiền sử hút thuốc lá, tiền sử điều trị thuốc đích, kết quả xét nghiệm mô bệnh học, giai đoạn bệnh); kết quả xét nghiệm đột biến gen EGFR huyết tương (có hay không có đột biến, loại đột biến, vị trí đột biến).

Kỹ thuật tách chiết DNA: 5 ml mẫu máu được thu thập trong ống EDTA, sau đó ly tâm ở $4000 \times g$ trong 10 phút để tách huyết tương ra khỏi máu, khoảng 2 ml huyết tương được thu thập sẽ sử dụng để tách ctDNA bằng bộ kit cobas® Sample Preparation (Roche - Mỹ).

Phát hiện, phân tích kết quả đột biến EGFR huyết tương bằng kỹ thuật real-time PCR: nghiên cứu sử dụng bộ kit Cobas® EGFR mutation Test v2 (Roche - Mỹ) để phát hiện và phân tích đột biến EGFR trong mẫu huyết tương.

Phân tích thống kê: số liệu được thu thập, nhập và mã hoá bằng phần mềm Excel 2010. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS 20.0 với các test thống kê y học, các yếu tố liên quan đến đột biến gen EGFR có ý nghĩa khi giá trị $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu

Từ tháng 5/2017 đến tháng 8/2018, chúng tôi chọn được 136 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn vào nghiên cứu và thu nhận được 136 mẫu huyết tương.

Đặc điểm lâm sàng - giải phẫu bệnh của nhóm bệnh nhân nghiên cứu (bảng 1)

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

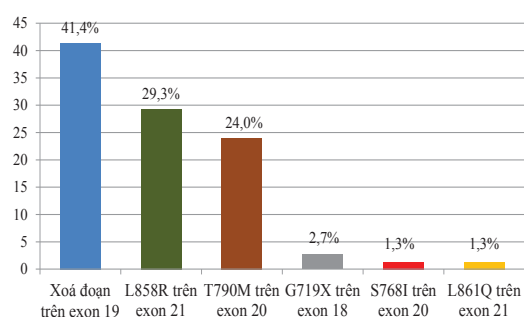
Đặc điểm		Số lượng	Tỷ lệ (%)
Giới tính	Nam	77	56,6
	Nữ	59	43,4
Nhóm tuổi	<60	47	34,6
	≥60	89	65,4
Tiền sử hút thuốc lá	Chưa từng	77	56,6
	Đã hoặc đang hút	59	43,4
Tiền sử điều trị TKIs	Chưa từng	48	35,3
	Đã hoặc đang	88	64,7
Mô bệnh học	Ung thư biểu mô tuyến	131	96,3
	Ung thư biểu mô vảy	5	3,7
Giai đoạn	I	2	1,5
	II	2	1,5
	III	21	15,4
	IV	111	81,6

Tỷ lệ nam/nữ trong nghiên cứu khoảng 1,3/1; tỷ lệ nhóm chưa từng hút thuốc lá cao hơn nhóm hút thuốc lá (bao gồm cả hút thụ động), đã hoặc đang điều trị TKIs cao hơn nhóm chưa từng điều trị.

Ung thư biểu mô tuyến chiếm đa số với tỷ lệ 96,3%, còn lại là ung thư biểu mô vảy - 3,7%; nhóm bệnh nhân ở giai đoạn IV là chủ yếu - 81,6%; giai đoạn III chiếm 15,4%, còn lại giai đoạn II và I - cùng chiếm 1,5%.

Đặc điểm đột biến EGFR mẫu huyết tương

Trong 136 bệnh nhân nghiên cứu, 56/136 bệnh nhân mang đột biến gen EGFR mẫu huyết tương (41,2%); 19 bệnh nhân mang 2 đột biến (14,0%). Phân bố các loại đột biến được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Phân bố các đột biến trên exon 18-21 của gen EGFR.

Trong 75 đột biến được phát hiện, đột biến xóa đoạn trên exon 19 và đột biến L858R trên exon 21 chiếm tỷ lệ cao nhất, đáng chú ý là tỷ lệ đột biến T790M khá cao (24%).

Một số yếu tố liên quan giữa đột biến EGFR huyết tương, đột biến T790M với đặc điểm lâm sàng (bảng 2)

Bảng 2. Mối liên quan giữa đột biến EGFR huyết tương, đột biến T790M với lâm sàng.

Đặc điểm	N	EGFR (+)			T790M (+)		
		n	%	p	n	%	p
Nhóm tuổi	<60	47	17	36,2	4	8,5	0,237
	≥60	89	39	43,8	14	15,7	
Giới tính	Nam	77	26	33,8	9	11,7	0,543
	Nữ	59	30	50,8	9	15,3	
Tiền sử hút thuốc lá	Chưa từng	77	38	49,4	10	13,0	0,922
	Đã hoặc đang	59	18	30,5	8	13,6	
Tiền sử điều trị TKIs	Chưa từng	48	6	12,5	0	0,0	<0,001
	Đã hoặc đang	88	50	56,8	18	20,5	

Tỷ lệ đột biến EGFR huyết tương ở nữ cao hơn nam ($p=0,045$), tỷ lệ đột biến EGFR ở người chưa từng hút thuốc lá cao hơn người đã hoặc đang hút ($p=0,027$), tỷ lệ đột biến EGFR ở người đã hoặc đang điều trị đích cao hơn người chưa từng điều trị đích ($p<0,001$).

Tỷ lệ đột biến T790M ở người đã hoặc đang điều trị TKIs cao hơn so với người chưa từng điều trị bằng TKIs ($p=0,001$).

Một số yếu tố liên quan giữa đột biến EGFR huyết tương, đột biến T790M với mô bệnh học - giai đoạn bệnh (bảng 3)

Bảng 3. Một số yếu tố liên quan giữa đột biến EGFR huyết tương, đột biến T790M với mô bệnh học - giai đoạn bệnh.

Đặc điểm	N	EGFR (+)			T790M (+)		
		n	%	p	n	%	p
Mô bệnh học	Ung thư biểu mô tuyến	137	56	42,7	18	13,7	0,374
	Ung thư biểu mô vảy	5	0	0,0	0	0,0	
Giai đoạn	I	2	0	0	0	0,0	0,505
	II	2	0	0	0	0,0	
	III	21	2	9,5	1	4,8	
	IV	111	54	48,6	17	15,3	

Tất cả những bệnh nhân có đột biến EGFR huyết tương đều nằm trong nhóm ung thư biểu mô tuyến (42,7%); tỷ lệ bệnh nhân đột biến EGFR ở giai đoạn IV chiếm tỷ lệ cao hơn giai đoạn III (48,6% so với 9,5%), trong khi không có bệnh nhân đột biến gen ở giai đoạn I, II.

Đột biến T790M cũng chỉ gặp ở nhóm ung thư biểu mô tuyến (13,7%); tỷ lệ đột biến T790M ở nhóm bệnh nhân giai đoạn IV (15,3%) cao hơn các giai đoạn khác nhưng sự khác biệt về tỷ lệ chưa có ý nghĩa thống kê ($p=0,374$ và $p=0,505$).

Bàn luận

Đặc điểm lâm sàng - giải phẫu bệnh của đối tượng nghiên cứu

Trong 136 bệnh nhân được nghiên cứu, độ tuổi từ 60 trở lên chiếm 65,4%. Đây là độ tuổi có nguy cơ tiếp xúc và tích lũy với các yếu tố sinh bệnh cao hơn so với các lứa tuổi khác. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu trong và ngoài nước [7-9]. Tỷ lệ nam/nữ trong nghiên cứu khoảng 1,3/1 và tỷ lệ nhóm bệnh nhân chưa từng hút thuốc lá cao hơn nhóm đã hoặc đang hút (56,6% so với 43,4%); điều này cho thấy tỷ lệ đột biến EGFR gặp ngày càng nhiều ở nữ giới, không hút thuốc, tương đương với các nghiên cứu trong và ngoài nước khác [6, 7]. Tỷ lệ bệnh nhân trong nghiên cứu đã hoặc đang điều trị đích cao hơn nhóm chưa từng điều trị đích (64,7% so với 35,3%), tương đương với nghiên cứu ngoài nước [10].

Dựa trên kết quả mô bệnh học cho thấy, tỷ lệ bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến chiếm đa số (96,3%), bệnh nhân ở giai đoạn IV chiếm tỷ lệ cao hơn các giai đoạn khác (81,6%), tương đương với các nghiên cứu trong và ngoài nước [11, 12].

Đặc điểm đột biến EGFR mẫu huyết tương

Kết quả phân tích đột biến gen EGFR huyết tương cho thấy 56/136 (41,2%) bệnh nhân có đột biến. Trong đó, 19 bệnh nhân

(14,0%) mang đột biến kép. Nhiều nghiên cứu cũng ghi nhận kết quả đột biến tương đương [6, 12].

Tỷ lệ đột biến xóa đoạn trên exon 19 và đột biến L858R trên exon 21 chiếm đa số (41,4% và 29,3%); tỷ lệ đột biến T790M chiếm 24,0%. Sự xuất hiện tỷ lệ cao của đột biến kháng thuốc T790M có thể được lý giải bằng việc trong đối tượng nghiên cứu của chúng tôi có một số lượng lớn bệnh nhân đã được điều trị bằng TKIs trước đó, dẫn đến tình trạng kháng thuốc thứ phát.

Mối liên quan giữa đột biến EGFR, đột biến T790M với lâm sàng - giải phẫu bệnh

Về đặc điểm giới tính và tiền sử hút thuốc lá, kết quả có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ đột biến EGFR ở nữ cao hơn nam ($p=0,045$) và ở nhóm không hút thuốc so với nhóm hút thuốc ($p=0,027$), tương đương với một số nghiên cứu trước đó [8].

Xét về giai đoạn bệnh, tỷ lệ đột biến EGFR huyết tương ở giai đoạn IV cao hơn các giai đoạn còn lại và sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê ($p=0,003$). Kết quả này phù hợp với nhận định chung là ung thư phổi thường phát hiện ở giai đoạn muộn. Hơn nữa, đối với những bệnh nhân ở giai đoạn tiến triển, nồng độ ctDNA lưu hành trong máu cao nên dễ dàng hơn trong việc phát hiện đột biến EGFR huyết tương ở những đối tượng này [13].

Những bệnh nhân đã hoặc đang điều trị TKIs có tỷ lệ đột biến EGFR huyết tương và tỷ lệ đột biến T790M cao hơn so với nhóm chưa từng điều trị TKIs ($p<0,001$ và $p=0,001$). Điều này cũng phù hợp với nhận định rằng điều trị ung thư phổi bằng TKIs cũng là một trong những nguyên nhân dẫn đến tình trạng kháng thuốc thứ phát [14].

Kết luận

Nghiên cứu xác định đột biến gen EGFR trong mẫu huyết tương thực hiện trên 136 bệnh nhân UTPKTBN tại Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu - Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 5/2017 đến tháng 8/2018 cho thấy:

- Đột biến gen EGFR thường gặp ở độ tuổi trên 60, nữ nhiều hơn nam, chủ yếu ở người không hút thuốc, giai đoạn IV gặp nhiều hơn các giai đoạn còn lại.

- Trong tất cả các đột biến EGFR huyết tương, tỷ lệ đột biến xóa đoạn trên exon 19 và đột biến L858R trên exon 21 vẫn thường gặp nhất, ngoài ra có một tỷ lệ lớn đột biến kháng thuốc T790M do một số lượng lớn bệnh nhân đã điều trị đích trước đó.

- Những bệnh nhân đã hoặc đang điều trị TKIs có tỷ lệ đột biến kháng thuốc T790M cao hơn hẳn những người chưa từng điều trị bằng TKIs.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn TS Nguyễn Thuận Lợi, ThS Nguyễn Tiến Lung cùng toàn thể các bác sỹ, điều dưỡng, kỹ thuật viên Đơn vị Gen - Tế bào gốc, Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu - Bệnh viện Bạch Mai đã hỗ trợ nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Văn Hiếu (2015), *Ung thư học*, Nhà xuất bản Y học.
- [2] G. Carpenter, L. King, S. Cohen (1978), "Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro", *Nature*, **276**(5686), pp.409-410.
- [3] Y.I. Elshimali, H. Khaddour, M. Sarkissyan, et al. (2013), "The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients", *International Journal of Molecular Sciences*, **14**(9), pp.18925-18958.
- [4] J. Luo, L. Shen, D. 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**, Doi: 10.1038/srep06269.
- [5] K. Guo, Z.P. Zhang, L. Han, 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**, pp.3289-3296.
- [6] Nguyễn Thị Lan Hương, Phan Thanh Thăng, Hồ Trọng Toàn và cộng sự (2017), "Phát hiện đột biến gen EGFR trong mẫu huyết tương bệnh nhân UTPKTBN tại bệnh viện Chợ Rẫy", *Thời sự Y học*, tr.82-88.
- [7] S. Zhang, L. Zhu, X. Chen, et al. (2018), "ctDNA assessment of EGFR mutation status in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer in real-world setting", *Journal of Thoracic Disease*, **10**(7), pp.4169-4177.
- [8] X. Zhao, R.B. Han, J. 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**(2), pp.119-125.
- [9] Nguyễn Thị Lan Anh (2017), *Nghiên cứu đặc điểm đột biến gen EGFR và mối liên quan với lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân ung thư phổi biểu mô tuyến*, Luận án tiến sĩ y học, Học viện Quân y.
- [10] T. Takahama, K. Sakai, M. Takeda, et al. (2016), "Detection of the T790M mutation of EGFR in plasma of advanced non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors (West Japan Oncology group 8014LTR study)", *Oncotarget*, **7**(36), pp.58492-58499.
- [11] Trần Đình Hà, Mai Trọng Khoa, Phạm Cẩm Phương, Nguyễn Tiến Lung, Nguyễn Tuấn Anh và cộng sự (2016), "Xác định đột biến gen EGFR trên bệnh nhân UTPKTBN tại Bệnh viện Bạch Mai", *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, **3**, tr.271-277.
- [12] H. Bai, L. Mao, H.S. Wang, 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", *Journal of Clinical Oncology*, **27**(16), pp.2653-2659.
- [13] S.A. Leon, B. Shapiro, D.M. Sklaroff, et al. (1977), "Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy", *Cancer Res.*, **37**(3), pp.646-650.
- [14] S.G. Wu, J.Y. Shih (2018), "Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer", *Molecular Cancer*, **17**(1), Doi: 10.1186/s12943-018-0777-1.