

Phân tích đột biến EGFR trong mẫu mô phủ paraffin và một số yếu tố liên quan ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ trên 60 tuổi

Dương Thanh Hiền¹, Phạm Cẩm Phương², Nguyễn Thuận Lợi², Lê Thị Luyện^{1*}

¹Khoa Y dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai

Ngày gửi bài 27/3/2020; ngày chuyển phản biện 31/3/2020; ngày nhận phản biện 25/4/2020; ngày chấp nhận đăng 5/5/2020

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định được tỷ lệ và phân tích một số yếu tố liên quan đến đột biến gen EGFR ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN) trên 60 tuổi. Phương pháp và đối tượng nghiên cứu: phát hiện đột biến EGFR bằng kỹ thuật Strip Assay từ mẫu mô của 351 bệnh nhân UTPKTBN điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018. Kết quả cho thấy, tỷ lệ đột biến gen EGFR là 38,2%, bao gồm: đột biến mất đoạn exon 19 (48,6%), đột biến điểm trên exon 21 (41,6%), đột biến điểm trên exon 18 (4,9%) và đột biến kháng thuốc T790M trên exon 20 (4,9%). Tỷ lệ đột biến ở nữ (66,7%) cao hơn ở nam (27,5%), ở người không hút thuốc lá (53,3%) cao hơn ở người hút thuốc (30,3%). Kết luận: tỷ lệ đột biến EGFR ở bệnh nhân UTPKTBN trên 60 tuổi tương đối cao, trong đó vị trí hay đột biến nhất là exon 19 và 21. Đột biến thường hay gặp ở nữ giới, người không hút thuốc lá, giá trị maxSUV khối u phổi nguyên phát của nhóm bệnh nhân có đột biến gen thấp hơn so với nhóm không đột biến.

Từ khóa: đột biến gen EGFR, trên 60 tuổi, ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Phần lớn các trường hợp UTPKTBN được chẩn đoán ở bệnh nhân cao tuổi, hơn 50% các trường hợp được chẩn đoán khi bệnh nhân trên 65 tuổi [1]. Chẩn đoán sớm UTPKTBN thường khó khăn do triệu chứng lâm sàng hạn chế và không đặc hiệu. Do đó, hầu hết bệnh nhân UTPKTBN khi được chẩn đoán đã ở giai đoạn muộn, có di căn xa, phương pháp điều trị chủ yếu là hóa trị và điều trị triệu chứng. Bệnh nhân cao tuổi có xu hướng dung nạp hóa trị kém vì thường mắc các bệnh kèm theo và sự suy yếu các cơ quan trong cơ thể, vì vậy phần lớn không thể hóa trị liệu tích cực, các lựa chọn thay thế cho hóa trị thông thường như điều trị nhắm trúng đích rất đáng được quan tâm [1].

Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì EGFR mang hoạt tính tyrosine kinase có vai trò quan trọng trong việc điều hòa các quá trình sinh trưởng, phát triển, trao đổi chất và sinh lý của tế bào. Khi EGFR hoạt hóa quá mức do đột biến gen có thể dẫn đến tăng sinh bất thường cũng như sự chuyển dạng tế bào gây ra bệnh lý ác tính [2]. Nhiều công trình nghiên cứu về liệu pháp điều trị đích bằng TKI (tyrosine kinase

inhibitor) [3] đã chứng tỏ hiệu quả tốt, đồng thời tác dụng phụ tương đối nhẹ so với những tác nhân gây độc tế bào thông thường nên các thuốc đích được coi là phù hợp cho bệnh nhân UTPKTBN cao tuổi có đột biến gen. Tuy nhiên, hiệu quả của TKI phụ thuộc vào tình trạng đột biến gen EGFR. Vì vậy, bệnh nhân UTPKTBN nên được xét nghiệm đột biến EGFR một cách thường quy để giúp các bác sĩ lâm sàng có thể lựa chọn phác đồ phù hợp, nâng cao hiệu quả điều trị và chất lượng sống của bệnh nhân.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 351 bệnh nhân UTPKTBN có chỉ định xét nghiệm đột biến gen EGFR mẫu mô, điều trị tại Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 1/2017 đến tháng 8/2018 đáp ứng các tiêu chuẩn chọn lựa và tiêu chuẩn loại trừ.

Tiêu chuẩn chọn lựa:

- Bệnh nhân trên 60 tuổi, được chẩn đoán xác định UTPKTBN dựa vào kết quả mô bệnh học.

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

Analysis of EGFR mutations in paraffin-covered tissue samples and some related factors from non-small cell lung cancer patients over 60 years old

Thanh Hien Duong¹, Cam Phuong Pham²,
Thuan Loi Nguyen², Thi Luyen Le^{1*}

¹School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi

²The Nuclear Medicine and Oncology Center, Bach Mai Hospital

Received 27 March 2020; accepted 5 May 2020

Abstract:

Objective: to describe EGFR mutation status detected in tissue samples and analyse some related factors in NSCLC patients over 60 years old. **Methodology:** detecting EGFR mutations by Strip Assay Kit from 351 tissue samples of NSCLC patients at Bach Mai Hospital 2017-2018. **Results:** ratio of EGFR is 38.2%, including exon 19 deletion mutation (48.6%), exon 21 point mutation (41.6%), exon 18 point mutation (4.9%), and T790M resistant mutation on exon 20 (4.9%). The mutant rate in females (66.7%) is higher than in males (27.5%), and shows a higher rate in non-smokers (53.3%) compared to smokers (30.3%). **Conclusions:** the EGFR mutation ratio in NSCLC patients over 60 years is relatively high, the frequent mutant sites are exon 19 and 21. Mutations are more common in women and non-smokers. The maxSUV value of primary lung tumors in patients with gene mutations is lower than in the non-mutant group.

Keywords: EGFR mutation, non-small cell lung cancer, over 60 years old.

Classification number: 3.2

- Bệnh nhân có đầy đủ hồ sơ bệnh án bao gồm: thông tin hành chính, kết quả mô bệnh học, giai đoạn bệnh và một số xét nghiệm cận lâm sàng.

Tiêu chuẩn loại trừ: loại trừ những trường hợp không xác định được đột biến EGFR do chất lượng mẫu bệnh phẩm 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 tính, địa chỉ, tiền sử hút thuốc lá, vị trí và phương pháp lấy mẫu, kết quả xét nghiệm mô bệnh học, giai đoạn bệnh, kết quả CEA, Cyfra 21-1, maxSUV); kết quả xét nghiệm đột biến gen EGFR mẫu mô (có hay không có đột biến, loại đột biến, vị trí đột biến); xác định mối liên quan giữa đột biến gen với các đặc điểm của đối tượng nghiên cứu.

Tách chiết DNA: tách DNA từ mẫu mô vùi paraffin sử dụng bộ kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen - Mỹ).

Phát hiện, phân tích kết quả đột biến EGFR mẫu mô: đầu tiên khuếch đại đoạn gen quan tâm bằng phản ứng PCR sử dụng bộ kit EGFR XL StripAssay® (ViennaLab - Áo). Sau đó, lai sản phẩm khuếch đại với đầu dò đặc hiệu sử dụng bộ kit EGFR XL StripAssay® (ViennaLab - Áo). Sau quá trình lai, các test strip được so sánh với thang chuẩn để đánh giá kết quả thông qua phần mềm StripAssay Evaluator® được cung cấp bởi ViennaLab.

Phân tích thống kê: số liệu được thu thập, nhập và mã hóa bằng phần mềm Excel 2013. 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

Đặc điểm nhóm bệnh nhân nghiên cứu

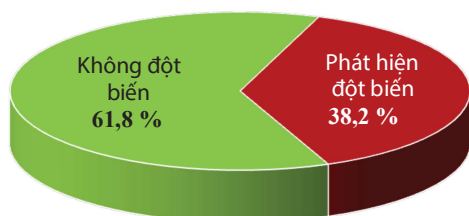
Tỷ lệ bệnh nhân nam trong nghiên cứu cao gấp 2,6 lần nữ. Phần lớn có hút thuốc lá (chiếm 65%). Mô bệnh học chủ yếu là ung thư biểu mô tuyến. Bệnh nhân phát hiện bệnh ở giai đoạn muộn, đã có di căn chiếm tỷ lệ cao hơn hẳn các giai đoạn trước (bảng 1).

Bảng 1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu.

Đặc điểm		Tổng số	
		Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Giới tính	Nam	255	72,6
	Nữ	96	27,4
Tiền sử hút thuốc lá	Không	120	34,2
	Đã hoặc đang hút	231	65,8
Mô bệnh học	Ung thư biểu mô tuyến	339	96,6
	Ung thư biểu mô vảy	11	3,1
	Ung thư biểu mô dạng sarcom	1	0,3
Giai đoạn	Giai đoạn I	4	1,1
	Giai đoạn II	26	7,4
	Giai đoạn III	55	15,7
	Giai đoạn IV	266	75,8

Tỷ lệ đột biến EGFR

Trong tổng số 351 đối tượng nghiên cứu, có 134 trường hợp phát hiện đột biến gen EGFR, chiếm tỷ lệ 38,2%, thể hiện trong hình 1.

**Hình 1. Tỷ lệ phát hiện đột biến.****Bảng 2. Tỷ lệ các loại đột biến.**

Đặc điểm đột biến EGFR		Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Số lượng đột biến (134 bệnh nhân)	01	126	94,0
	02	8	6,0
Vị trí đột biến (142 đột biến)	Exon 18	G719A	4
		G719C	2
		G719S	1
	Exon 19	E746_A750del	48
		L747_A750delinsP	10
		L747_T751del	2
		L747_P753delinsS	9
	Exon 20	T790M	7
	Exon 21	L858R	58
		L861Q	1

Trong 134 bệnh nhân phát hiện đột biến, có 8 bệnh nhân mang hai đột biến nên tổng số đột biến phát hiện được là 142. Trong đó, các đột biến xóa đoạn trên exon 19 là hay

gặp nhất (48,6%), đặc biệt là đột biến xóa đoạn E746_A750. Đột biến điểm trên exon 21 cũng rất thường gặp (41,6%), điển hình là đột biến L858R. Các đột biến điểm trên exon 18 tương đối hiếm gặp (4,9%). Đột biến kháng thuốc chiếm tỷ lệ 4,9% đều là T790M trên exon 20 (bảng 2).

Phân tích một số yếu tố liên quan**Bảng 3. Một số yếu tố liên quan đến đột biến gen EGFR.**

Đặc điểm		Số bệnh nhân nghiên cứu	Phát hiện đột biến		p
			Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)	
Giới tính	Nam	255	70	27,5	<0,001
	Nữ	96	64	66,7	
Tiền sử hút thuốc lá	Không	120	64	53,3	<0,001
	Đã hoặc đang hút	231	70	30,3	
Mô bệnh học	Ung thư biểu mô tuyến	339	132	38,9	0,119
	Ung thư biểu mô vảy	11	2	18,2	
	Ung thư biểu mô dạng sarcom	1	0	0	
Vị trí lấy mẫu	U phổi	215	81	37,7	0,298
	Tổ chức di căn hạch	30	13	43,3	
	Tổ chức di căn xa	77	25	32,5	
	Dịch màng phổi/màng tim	29	15	51,7	
Phương pháp lấy mẫu	Sinh thiết	298	114	38,3	0,081
	Phẫu thuật	29	7	24,1	
	Chọc dịch	24	13	54,2	
Giai đoạn	Giai đoạn I, II, III	85	31	36,5	0,710
	Giai đoạn IV	266	103	38,7	
CEA	Bình thường (<4,3 ng/ml)	115	43	37,4	0,833
	Tăng (≥4,3 ng/ml)	236	91	38,6	
Cyfra 21-1	Bình thường (<3,3 ng/ml)	145	58	40,0	0,555
	Tăng (≥3,3 ng/ml)	206	76	36,9	
maxSUV u phổi	Có đột biến EGFR	134	9,9±5,1		0,046
	Không đột biến	217	12,2±7,3		
maxSUV hạch	Có đột biến EGFR	134	8,4±5,1		0,761
	Không đột biến	217	8,7±5,8		
maxSUV tổ chức di căn	Có đột biến EGFR	134	8,0±6,0		0,442
	Không đột biến	217	9,0±6,8		

Kết quả phân tích ở bảng 3 cho thấy, tỷ lệ đột biến gen có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giới tính và tiền sử hút thuốc lá, đột biến thường gặp ở nữ giới, người không hút thuốc lá; không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ đột biến với mô bệnh học, giai đoạn bệnh, vị trí hay phương pháp lấy mẫu xét nghiệm cũng như giá trị định lượng CEA và Cyfra 21-1; maxSUV trung bình ở nhóm có đột biến EGFR thấp hơn so với nhóm không đột biến, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê đối với maxSUV tại khối u nguyên phát.

Bàn luận

Kết quả phân tích đột biến gen EGFR

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy 38,2% trường hợp phát hiện đột biến gen EGFR, phù hợp với một số nghiên cứu trước đây tại Việt Nam [4, 5]. Tuy nhiên, kết quả này thấp hơn nhiều nghiên cứu khác tại khu vực châu Á, nghiên cứu PIONEER [6] cho thấy tỷ lệ đột biến gen EGFR tại Việt Nam là 64,2%, cao nhất trong bảy nước tham gia nghiên cứu. Sự khác biệt này là do tiêu chuẩn lựa chọn không giống nhau. Chúng tôi chỉ tập trung nghiên cứu đối tượng UTPKTBN trên 60 tuổi, trong khi đó đã có nhiều công bố trên thế giới cũng như trong nước cho thấy bệnh nhân nữ, trẻ tuổi, không hút thuốc lá, khu vực Đông Á thường có tỷ lệ đột biến EGFR cao. Ngoài ra, phương pháp xét nghiệm đột biến khác nhau (giải trình tự gen, PCR kết hợp lai đầu dò, Scorpion ARMS, realtime PCR,...) cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phân tích.

Trong 142 đột biến phát hiện được ở 134 bệnh nhân (8 bệnh nhân mang 2 đột biến), đa số các đột biến phát hiện trên exon 19 (48,6%) và exon 21 (41,6%). Đột biến kháng thuốc T790M trên exon 20 chiếm 4,9%, thường kết hợp với một đột biến trên exon khác. Xét về tính đáp ứng với thuốc TKI, 95,1% đột biến trong nghiên cứu làm tăng tính nhạy cảm của khối u với TKI, chỉ có 7 trường hợp mang đột biến T790M liên quan đến kháng thuốc TKI thế hệ 1. Kết quả này phù hợp với đa số các nghiên cứu trên thế giới cũng như tại Việt Nam [4-6] với đột biến mất đoạn trên exon 19 và đột biến điểm (L858R) trên exon 21 là hai loại đột biến hay gặp nhất.

Một số yếu tố liên quan đến đột biến gen EGFR

Tình trạng đột biến gen EGFR có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giới tính và tiền sử hút thuốc lá, tỷ lệ đột biến ở nữ giới cao hơn ở nam giới (66,7 so với 27,5%), ở nhóm bệnh nhân không hút thuốc lá cao hơn nhóm có tiền sử hút thuốc lá (53,3% so với 30,3%). Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu khác [5, 6].

Không có sự khác biệt về vị trí hay phương pháp lấy mẫu bệnh phẩm xét nghiệm giữa nhóm có đột biến và không đột biến. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thị Lan Anh (2017) [4].

Tỷ lệ đột biến EGFR ở bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến là 38,9%, tương đồng với nghiên cứu trong nước của Nguyễn Thị Lan Anh (2017), Mai Trọng Khoa và cs (2016) [4, 5]. Không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ đột biến gen ở nhóm ung thư biểu mô tuyến và nhóm ung thư biểu mô khác (vây và dạng sarcom) là do cỡ mẫu của hai nhóm chênh lệch khá lớn (339 trường hợp ung thư biểu mô tuyến nhưng chỉ có 11 trường hợp ung thư biểu mô vảy và

1 trường hợp ung thư biểu mô dạng sarcom). Tuy nhiên, có thể thấy xu hướng gia tăng tỷ lệ đột biến ở nhóm bệnh nhân mô bệnh học là ung thư biểu mô tuyến (38,9%) so với nhóm ung thư biểu mô khác (18,2% ở nhóm ung thư biểu mô vảy và 0% ở nhóm ung thư biểu mô dạng sarcom).

Xét về mối liên quan giữa đột biến với giai đoạn bệnh, chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ đột biến gen ở nhóm bệnh nhân giai đoạn IV so với nhóm bệnh nhân các giai đoạn còn lại. Nhận xét này phù hợp với kết quả của Y. Liu và cs (2016) không thấy mối liên quan giữa đột biến gen EGFR với giai đoạn bệnh [7]. Từ đó có thể thấy đột biến gen đã xuất hiện từ rất sớm, ảnh hưởng tới tiên lượng và điều trị bệnh.

Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị maxSUV trung bình tại khối u phổi nguyên phát với tỷ lệ đột biến gen, cụ thể là giá trị maxSUV trung bình tại u phổi thấp hơn ở bệnh nhân UTPKTBN có đột biến gen EGFR, nhận định này tương đồng với một số nghiên cứu của tác giả I.L. Na và cs (2010), R.H. Mak và cs (2011) [8, 9].

Ngoài maxSUV, các chất chỉ điểm khối u cũng là một xét nghiệm hay sử dụng trên lâm sàng trong việc đánh giá mức độ tiến triển, theo dõi đáp ứng điều trị ung thư. Nghiên cứu của E.Y. Romero-Ventosa và cs (2015) [10] cho rằng CEA là một chỉ số tiên lượng độc lập trong việc tiên lượng đáp ứng của khối u với thuốc TKI. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi không nhận thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ CEA và Cyfra 21-1 với tình trạng đột biến gen EGFR. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu tại Việt Nam của Nguyễn Thị Lan Anh (năm 2017) [4].

Hiện nay, xét nghiệm thường quy đột biến gen EGFR gặp một số khó khăn, đặc biệt trong những trường hợp khối u ở những vị trí khó sinh thiết, hoặc bệnh nhân từ chối sinh thiết. Vì vậy, trên thực hành lâm sàng, các chỉ số như maxSUV, chất chỉ điểm khối u, đặc điểm mô bệnh học, cũng như đặc điểm về giới tính, tình trạng hút thuốc lá có thể góp phần dự đoán khả năng đột biến gen EGFR ở bệnh nhân UTPKTBN trên 60 tuổi.

Kết luận

Qua nghiên cứu phát hiện đột biến EGFR bằng kỹ thuật Strip Assay từ mẫu mô của 351 bệnh nhân UTPKTBN trên 60 tuổi điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018, chúng tôi rút ra những kết luận sau:

- Tỷ lệ đột biến gen EGFR chiếm 38,2% số bệnh nhân UTPKTBN trên 60 tuổi.
- Trong số những đột biến, đột biến xóa đoạn exon 19 chiếm 48,6%; đột biến điểm trên exon 21 chiếm 41,6% và trên exon 18 chiếm 4,9%; đột biến kháng thuốc T790M trên exon 20 chiếm 4,9%.

- Tỷ lệ đột biến ở nữ (66,7%) cao hơn ở nam (27,5%), ở người không hút thuốc lá (53,3%) cao hơn ở người hút thuốc (30,3%).

- Giá trị maxSUV khối u phổi nguyên phát của nhóm bệnh nhân có đột biến gen thấp hơn so với nhóm không đột biến.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự giúp đỡ của các bác sĩ, điều dưỡng, kỹ thuật viên tại Đơn vị Gen - Tế bào gốc, Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. Gridelli, E. Massarelli, P. Maione, et al. (2004), "Potential role of molecularly targeted therapy in the management of advanced nonsmall cell lung carcinoma in the elderly", *Cancer*, **101**(8), pp.1733-1744.
- [2] Nguyễn Minh Hà (2012), "Vai trò đột biến gen EGFR trong liệu pháp điều trị đích bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **16**(1), tr.1-6.
- [3] A. Daste, C. Chakiba, C. Domblides, et al. (2016), "Targeted therapy and elderly people: a review", *European Journal of Cancer*, **69**, pp.199-215.
- [4] 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 TS y học, Học viện Quân y.

- [5] Mai Trọng Khoa, Trần Đình Hà, Phạm Cẩm Phương và cộng sự (2016), "Xác định đột biến gen EGFR trên bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ tại Bệnh viện Bạch Mai", *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, **3**, tr.271-277.

- [6] Y. Shi, J.S. Au, S. Thongprasert, et al. (2014), "A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER)", *J. Thorac. Oncol.*, **9**(2), pp.154-162.

- [7] Y. Liu, J. Kim, F. Qu, et al. (2016), "CT Features associated with epidermal growth factor receptor mutation status in patients with lung adenocarcinoma", *Radiology*, **280**(1), pp.271-280.

- [8] I.L. Na, B.H. Byun, K.M. Kim, et al. (2010), "18F-FDG uptake and EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer: a single-institution retrospective analysis", *Lung Cancer*, **67**(1), pp.76-80.

- [9] R.H. Mak, S.R. Digumarthy, A. Muzikansky, et al. (2011), "Role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in predicting epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer", *Oncologist*, **16**(3), pp.319-336.

- [10] E.Y. Romero-Ventosa, S. Blanco-Prieto, A.L. Gonzalez-Pineiro, et al. (2015), "Pretreatment levels of the serum biomarkers CEA, CYFRA 21-1, SCC and the soluble EGFR and its ligands EGF, TGF- α , HB-EGF in the prediction of outcome in erlotinib treated non-small-cell lung cancer patients", *SpringerPlus*, **4**, DOI: 10.1186/s40064-015-0891-0.