# ỨNG DỤNG PCR ĐẶC HIỆU METHYL HÓA PHÁT HIỆN METHYL HÓA GEN DAPK VÀ RASSF1A TRONG MẪU MÁU BỆNH NHÂN UNG THƯ VÒM MŨI HỌNG

**Nguyễn Thị Hồng Gấm[1*], Nguyễn Thị Hải Yến[1], Nguyễn Văn Đô[2], Nguyễn Thanh Bình[2]**
*[1]Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên, [2]Trường Đại học Y Hà Nội*

TÓM TẮT

Methyl hóa gây ra sự giảm hoặc không biểu hiện các gen ức chế ung thư Rassf1A và DAPK được chỉ ra trong rất nhiều nghiên cứu về cơ chế bệnh sinh ung thư vòm mũi họng. Tuy nhiên tại Việt Nam những nghiên cứu này còn chưa nhiều. Mặc dù tới 70% bệnh nhân ung thư này được phát hiện thì đã muộn và thời gian sống thêm rất ngắn. Nghiên cứu này tiến hành nhằm phát hiện tình trạng methyl hóa của các gen ức chế ung thư trong mẫu máu của bệnh nhân ung thư vòm mũi họng góp phần xây dựng bộ công cụ để chẩn đoán sớm ung thư vòm mũi họng. Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang, chọn mẫu thuận tiện không xác suất với 9 bệnh nhân. Xây dựng kỹ thuật PCR đặc hiệu methyl hóa (MSP: Methylation-Specific Polymerase chain reaction) làm bộ công cụ phát hiện tình trạng methyl hóa: Gen RASSF1A đã tìm ra 100% (9/9) bị methyl hóa ở bệnh nhân ung thư vòm mũi họng. Gen DAPK chưa phát hiện tình trạng methyl hóa 100% (9/9) trong mẫu máu bệnh nhân ung thư vòm mũi họng. Cả gen RASSF1A và DAPK đều không tìm thấy methyl hóa trong mẫu máu người bình thường được chọn làm đối chứng.

**Từ khóa:** *MSP: Methylation-Specific Polymerase chain reaction; RASF1A: RAS association domain family member; DAPK: Death-associated protein kinase*

***Ngày nhận bài: 21/11/2018; Ngày hoàn thiện: 28/11/2018; Ngày duyệt đăng: 31/01/2019***

# APPLYCATION OF METHYLATED PCR TECHNIQUE TO DETECT METHYLATION OF RASSF1A DAPK GENE IN THE BLOOD SIMPLES OF NASOPHARYLGEAL CARCINOMA PATIENTS

**Nguyen Thi Hong Gam[1], Nguyen Thi Hai Yen[1], Nguyen Van Do[2], Nguyen Thanh Binh[2]**
*[1]University of Medicine and Pharmacy - TNU, [2]Hanoi Medical University*

ABSTRACT

Methylation that reduces or does not express the cancer gene Rassf1A and DAPK has been shown in numerous studies on lung cancer. However, in Vietnam the research on methylation of tumor surpress gene have not much yet. Although 70% of human cancer is detected now, the last time and the extra time is very short. This relerve process to methylation of the genes of the genes of the genes in the blood of the package of the nasopharylgeal carcinoma. Cross-sectional descriptive study, non-probability sampling with 9 nasopharyngeal carcinoma and 9 normal patient. Methhylation Specipic PCR as methylation state is released tool: RASSF1A gene found for 100% (9/9) is methylated. The DAPK gene does not detect 100% methylation (9/9) in blood samples of patients with nasopharyngeal carcinoma. Both RASSF1A gene and DAPK gene are not found methyl in the normal blood pattern selected as an argument.

**Key words:** *MSP: Methylation-Specific Polymerase chain reaction; RASF1A: RAS association domain family member ; DAPK: Death-associated protein kinase*

***Received: 21/11/2018; Revised: 28/11/2018; Approved: 31/01/2019***

* Corresponding author: *Email: gamhoabinh83@gmail.com*

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư vòm mũi họng (UTVMH) là ung thư thường gặp nhất vùng đầu cổ và mang tính khu vực. Ở Việt Nam, UTVMH là loại ung thư hàng đầu trong các ung thư vùng tai mũi họng và đứng hàng thứ 5 trong 10 loại ung thư phổ biến gặp ở nam giới [1].

Nguyên nhân tử vong chính là bệnh được phát hiện muộn khi đã giai đoạn III, IV và khối u đã di căn xa. Thời gian sống thêm sau 5 năm của bệnh nhân UTVMH giai đoạn III, IV là 54,5% trong khi nếu phát hiện sớm giai đoạn I, II là 95%, [2]. Do đó, dấu ấn sinh học chi phí thấp, không xâm lấn để phát hiện sớm UTVMH có tầm quan trọng lớn trong thực hành lâm sàng. Nhiều gen ức chế ung thư được đã được chứng minh là thường xuyên bị methyl hóa và giảm hoặc không biểu hiện được tìm thấy ở bệnh nhân UTVMH bằng các kỹ thuật sinh học phân tử khác nhau [3]. Gen Ras hiệp hội miền gia đình *1A*: RASSF1A nằm ở vị trí nhiễm sắc thể 3p21.3, bình thường đóng vai trò là những gen ức chế ung thư nhưng khi bị methyl hóa một cách bất thường thì sẽ dẫn đến hình thành khối u, gen *RASSF1A* đã được nghiên cứu rộng rãi như một dấu ấn sinh học methyl hóa và gen ức chế ung thư ở UTVMH kể từ khi phát hiện ra nó trong ung thư phổi vào năm 2000 [4]. Gen DAPK: Ở vị trí nhiễm sắc thể 9q21.33 có chức năng tham gia điều hòa quá trình chết theo lập trình. Mất biểu hiện DAPK đã được chứng minh có sự liên quan với vùng promoter bị methyl hóa trong UTVMH [5]. Để tìm hiểu cơ chế tác động của quá trình methyl hóa tới biểu lộ gen ức chế ung thư trong ung thư vòm họng chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: **Hoàn thiện quy trình kỹ thuật PCR đặc hiệu methyl hóa (Methylation Specifics PCR) để xác định sự methyl hóa gen RASSF1A và DAPK trong ung thư vòm mũi họng.**

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Đối tượng nghiên cứu

- 09 mẫu máu bệnh nhân ung thư biểu mô vòm mũi họng thể không biệt hóa

- 09 mẫu máu người không bị ung thư vòm mũi họng và bệnh ung thư khác.

### Tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ mẫu nghiên cứu

***Tiêu chuẩn lựa chọn***

- Nhóm bệnh nhân ung thư biểu mô vòm mũi họng thể không biệt hóa: Được chẩn đoán xác định bằng giải phẫu bệnh mô sinh thiết tại khối u.

- Nhóm người làm đối chứng: Là những người đến khám nội soi tai mũi họng được xác định không mắc bệnh ung thư vòm mũi họng bằng xét nghiệm giải phẫu bệnh mô sinh thiết.

***Tiêu chuẩn loại trừ:***

- Các trường hợp bị ung thư tế bào vảy, ung thư đầu mặt cổ khác như amidal, khoang miệng, lưỡi hoặc UTVMH ở giai đoạn IV đều bị loại ra khỏi đối tượng nghiên cứu.

### Dụng cụ và hóa chất

***Dụng cụ:***

- Các dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm sinh học phân tử bao gồm: Kẹp lấy mẫu, eppendorf, đầu côn, pipet, đầu tip, cốc thủy tinh,… Và máy móc: Vortex, máy ly tâm, bộ điện di DNA, tủ lạnh, tủ hút, máy quang phổ kế, máy luân nhiệt, máy chụp ảnh gel, lò vi sóng.

***Hóa chất:***

- Bộ hóa chất tách DNA: Qiagene DNA blood body fluit (Catologue number: 51304).

- Bộ hóa chất xử lý bisulfite: Epitect fast bisulfite của Qiagene (Catologue number: 59824).

- Hóa chất dùng để PCR: Mastermix (2X),

- Hóa chất điện di: Agarose 2 g, TBE 1X 100 ml, Ethilium 1,7 µl

***Thu thập mẫu nghiên cứu***

- Đối tượng tham gia nghiên cứu được tiến hành lấy 3 – 5 ml máu ngoại vi chống đông của các đối tượng nghiên cứu, bảo quản nhiệt độ 2 - 8$^o$ trong thời gian không quá 3 h. Sau đó ly tâm tách huyết tương giữ lại khối huyết cầu, bảo quản huyết cầu ở điều kiện – 30$^o$C.

***Xử lý mẫu nghiên cứu***

- Tiến hành tách DNA từ khối huyết cầu bằng bộ hóa chất

- DNA thu được tinh sạch và đo OD kiểm tra chất lượng, bảo quản từ - $30^0$c.

- Tiến hành chuyển đổi methyl hóa DNA bằng cách sử dụng dung dịch Bisulfite từ bộ hóa chất

- DNA thu được sau chuyển đổi được bảo quản - $20^0$C.

***Thực hiện phản ứng PCR***

- Nguyên lý kỹ thuật MSP (Methylation-specific PCR):

MSP là một phương pháp phân tích mô hình methyl hóa ở vị trí giàu dinucleotide cytosine và guanin viết tắt là CpG (P: phosphodieste) dựa trên phản ứng PCR với mồi đặc hiệu để phát hiện vị trí bị methyl hóa. Để thực hiện mô hình này, DNA phải được tinh sạch và sửa đổi bằng cách sử dụng dung dịch sodium bisulfite, trong quá trình này chuyển đổi tất cả dư lượng cystosine thành methyl - cystosine, mục đích là gắn nhóm $CH_3$ với vị trí cacbon số 5 của cytosin nằm ở vị trí hai nucleotid CpG. Đặc điểm của methyl cystosine là không bị chuyển đổi thành tyrosine trong phản ứng PCR [6].

| Thành phần | Thể tích 25 ( µl) |
|---|---|
| Mastermix | 10 |
| F+R (10 uM) | 4 |
| $MgCl_2$ (25 mM) | 2 |
| $H_2O$ | 8 |
| DNA | 1 |

- Mồi sử dụng được thết kế dựa theo trình tự tham khảo, đối với thí nghiệm MSP cặp mồi đặc hiệu methyl hóa cần đảm bảo phải có > 50% C [7]

- Thành phần phản ứng PCR

- Chu kỳ nhiệt:

| Nhiệt độ | Thời gian | |
|---|---|---|
| $95^0$C | 2' | x 35 chu kỳ |
| $95^0$C | 30s | |
| $60^0$C | 45s | |
| $72^0$C | 45s | |
| $72^0$C | 5' | |

- Kết quả điện di 5 µl sản phẩm trên thạch agarose 2% x 100v/60 phút

KẾT QUẢ

**Nhóm bệnh nhân ung thư vòm mũi họng**

*Sản phẩm DNA*

**Bảng 1.** *DNA sau khi chiết tách sau chuyển đổi bisulfite nhóm bệnh nhân*

| STT | Mã | Nồng độ (ng/ul) | OD (A260/280) |
|---|---|---|---|
| 1 | B1 | 85,6 | 1,89 |
| 2 | B2 | 78,2 | 1,87 |
| 3 | B3 | 63,7 | 1,92 |
| 4 | B4 | 100,0 | 1,89 |
| 5 | B5 | 55,4 | 1,83 |
| 6 | B6 | 46,4 | 1,98 |
| 7 | B7 | 48,4 | 1,92 |
| 8 | B8 | 45,0 | 1,91 |
| 10 | B10 | 104,0 | 1,91 |
| Trung bình | | 69,63 | |

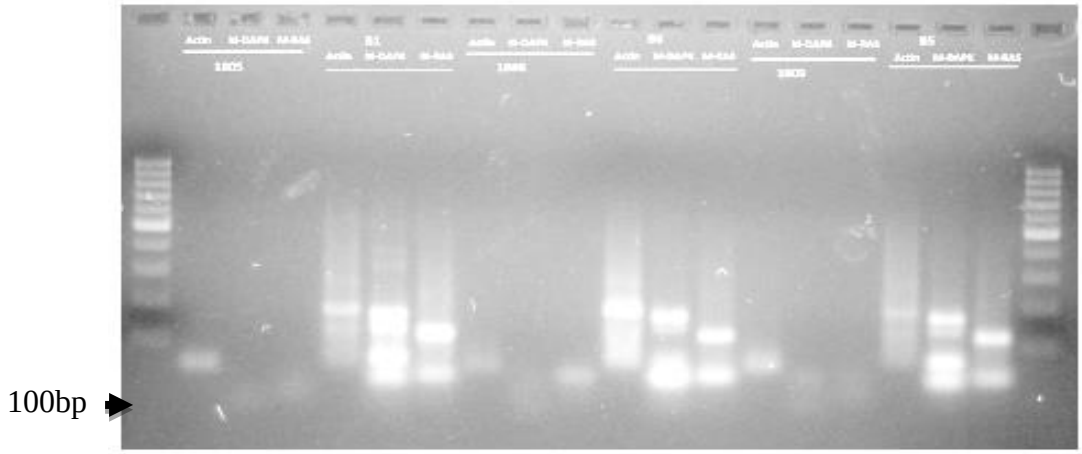
*Nhận xét*: Tại bảng 1 và 2, giá trị OD 260/280 đạt trong khoảng 1,8-2,0 cho thấy DNA chiết tách từ mẫu máu nhóm bệnh trước và sau khi sửa đổi bisulfite đều đảm bảo độ tinh sạch và nồng độ tốt cho phản ứng PCR. Chỉ số OD 260/280 của DNA từ mẫu máu nhóm chứng sau sửa đổi bisulfite mẫu mẫu chứng đạt từ 1,7-1,8 cũng đạt yêu cầu cho phản ứng PCR.

**Bảng 2.** *DNA sau khi chuyển đổi bisulfite nhóm chứng*

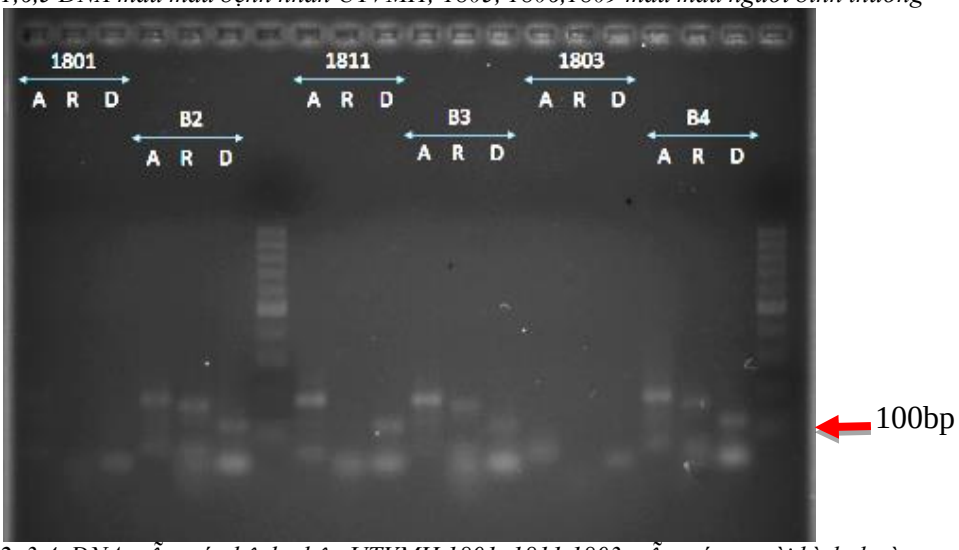
| STT | Mã NC | Nồng độ (ng/ul) | A280/260 |
|---|---|---|---|
| 1 | CO1801 | 28,5 | 1,8 |
| **2** | **CO1811** | **18** | **1,7** |
| 3 | CO1803 | 24 | 1,8 |
| 4 | CO1804 | 25 | 1,7 |
| 5 | CO1805 | 54,5 | 1,8 |
| 6 | CO1806 | 53 | 1,8 |
| 7 | CO1807 | 34 | 1,7 |
| 8 | CO1808 | 86,5 | 1,8 |
| 9 | CO1809 | 44 | 1,7 |
| Trung bình | | 40,83 | |

*Hình ảnh sản phẩm phản ứng MSP*

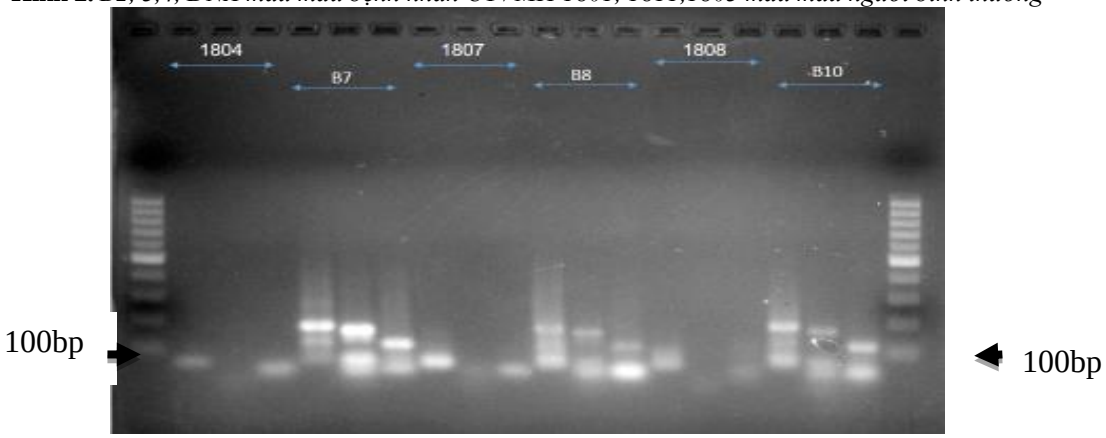
- Tiến hành điện di 5 ul sản phẩm trên thạch agarose 2%, 100v, 60 phút, ladder 100 bp với chứng (+) là Actin.




**Hình 1.** *B1,6,5 DNA mẫu máu bệnh nhân UTVMH; 1805, 1806,1809 mẫu máu người bình thường*




**Hình 2.** *B2, 3,4, DNA mẫu máu bệnh nhân UTVMH 1801, 1811,1803 mẫu máu người bình thường*




**Hình 3.** *B7, 8,10 DNA mẫu máu bệnh nhân UTVMH 1804,1807, 1808 DNA mẫu máu người bình thường*

*Nhận xét*: Hình 1, 2, 3: Tất cả mẫu máu bệnh nhân UTVMH cho thấy Actin (+) chứng tỏ sản phẩm khuếch đại DNA máu rất tốt, gen RASSF1A, xác định bị methyl hóa, gen DAPK không xác định được methyl hóa. Ngược lại mẫu máu ở người không bị UTVMH chứng gen Actin (+) ở mẫu chứng 18011 với cặp mồi Actin có kích thước sản phẩm tương đương là 184 bp, còn 8 mẫu chứng khác đều có Actin (+) với cặp mồi tương ứng kích thước sản phẩm 89 bp, 9 mẫu chứng đều không xác định gen Rass và Dapk methyl hóa.

***Tổng hợp kết quả***

**Bảng 4.** *Tình trạng methyl hóa nhóm gen nghiên cứu nhóm bệnh nhân UTVMH*

| Gen / Nhóm | MRASSF1A N=9 | | MDAPK N= 9 | | ACTIN N=9 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Bệnh nhân | (+) | 9/9 (100%) | (-) | 9/9 (100%) | (+) | 9/9 (100%) |

**Bảng 5.** *Tình trạng methyl hóa nhóm gen nghiên cứu nhóm bệnh nhân không UTVMH*

| Gen / Nhóm | MRASSF1A N= 9 | | MDAPK N=9 | | ACTIN N= 9 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Bệnh nhân chứng | (-) | 9/9 (100%) | (-) | 9/9 (100%) | (+) | 9/9 (100%) |

*Ghi chú : (+) xác định có methyl hóa, (-) không xác định methyl hóa*

- Nhận xét: Tại bảng 4: Gen actin (+) 100%, tỷ lệ methyl hóa RASSF1A, DAPK rất cao chiếm 9/9 (100%) mẫu máu bệnh nhân UTVMH. Tại bảng 5: Gen không phát hiện methyl hóa gen RASSF1A, gen DAPK không xác định được có sự methyl hóa trên toàn bộ 9/9 chiếm 100% mẫu máu người đối chứng không bị UTVMH, tuy nhiên khi tiến hành phản ứng PCR DNA mẫu đối chứng với cặp mồi Actin ở hai kích thước khác nhau đều cho kết quả actin (+) ở 9/9 mẫu máu.

BÀN LUẬN

Mức độ methyl hóa của gen bất kỳ có thể được phát hiện bằng nhiều kỹ thuật trên nhiều loại mẫu khác nhau. Kết quả phát hiện tần số methyl hóa phụ thuộc vào kỹ thuật dùng để đánh giá mức độ methyl hóa và nguồn mẫu sử dụng. Tuy nhiên tỷ lệ phát hiện methyl hóa phát hiện cao nhất khi sử dụng kỹ thuật MSP [8]. Phương pháp MSP được sử dụng nhiều nhất để phát hiện methyl hóa với tỷ lệ 60%, MMSP 10%, RT- PCR 30% trong 10 nghiên cứu tương đương, [9], [10]. Trong khi đó so với một nghiên cứu tương tự với mẫu máu bệnh nhân UTVMH với n = 50 và n= 220 cho tỷ lệ phát hiện methyl hóa gen RASSF1A là 88,6% và 72,7%. Trong nghiên cứu này của chúng tôi do khảo sát với cỡ mẫu n= 9 nên tỷ lệ phát hiện methyl hóa gen RASSF1A cao 100%. Gen DAPK bị methyl hóa với tỷ lệ thấp hơn 23,3% với n =14 và 36,8 với n = 21 [11]. Như vậy kết quả của chúng tôi có sự khác biệt này có thể do số mẫu nghiên cứu chưa đủ lớn.

KẾT LUẬN

Kỹ thuật MSP được ứng dụng thành công để xác định được tình trạng methyl hóa gen ức chế ung thư RASSF1A và DAPK gồm:

- Tách chiết được DNA từ tế bào máu ngoại vi với nồng độ trung bình nhóm bệnh nhân UTVMH là 69,63 ng/ul và nhóm chứng là 40,83 ng/ul.

- Sản phẩm PCR sau điện di đạt 100% xác định tỷ lệ phát hiện methyl hóa gen *RASS1A* ở toàn bộ mẫu máu của bệnh nhân UTVMH được khảo sát.

- Sản phẩm PCR sau điện di chưa phát hiện được tình trạng methyl hóa gen DAPK, cần khảo sát thêm về trình tự và nhiệt độ gắn mồi đặc hiệu methyl hóa để xác định sự methyl hóa của DAPK với nghiên cứu tiếp theo.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Hợp (1999), *Ung thư vòm mũi họng*, Nxb Y học, tr. 97-101.

2. L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel et al (2015), "Global cancer statistics 2012", *CA Cancer J. Clin.*, 65 (2), pp. 87-108.

3. I. Nawaz, K. Moumad, D. Martorelli et al (2015), "Detection of nasopharyngeal carcinoma in Morocco (North Africa) using a multiplex methylation-specific PCR biomarker assay", *Clin. Epigenetics*, 7, pp. 89.

4. A. Fendri (2009), "Inactivation of RASSF1A, RARβ2 and DAP-kinase by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma", *Cancer Biology & Therapy*, 8 (5), pp. 444-445.

5. A. M. Michie, A. M. McCaig, R. Nakagawa et al (2010), "Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer", *FEBS J.*, 277 (1), pp. 74-80.

6. Q. Tao, Robertson, K. D., Manns, A., Hildesheim, A. and Ambinder R. F. (1998), "The Epstein-Barr virus major latent promoter Qp is constitutively active, hypomethylated, and methylation sensitive", *J. Virol*, 72 (9), pp. 75-83.

7. Z. Zhang, D. Sun, S. H. Hutajulu et al (2012), "Development of a non-invasive method, multiplex methylation specific PCR (MMSP), for early diagnosis of nasopharyngeal carcinoma", *PLoS One*, 7 (11), pp. e45908.

8. X. Yang, W. Dai, D. L. Kwong et al (2015), "Epigenetic markers for noninvasive early detection of nasopharyngeal carcinoma by methylation-sensitive high resolution melting", *Int. J. Cancer*, 136 (4), pp. E127-135.

9. H. W. Chang, A. Chan, D. L. Kwong et al (2003), "Evaluation of hypermethylated tumor suppressor genes as tumor markers in mouth and throat rinsing fluid, nasopharyngeal swab and peripheral blood of nasopharygeal carcinoma patient", *Int. J. Cancer*, 105 (6), pp. 851-855.

10. J. Zhang, Z. Shen, H. Liu et al (2018), "Diagnostic potential of methylated DAPK in brushing samples of nasopharyngeal carcinoma", *Cancer Manag. Res.*, 10, pp. 2953-2964.

11. M. Ye, T. Huang, C. Ni et al (2017), "Diagnostic Capacity of RASSF1A Promoter Methylation as a Biomarker in Tissue, Brushing, and Blood Samples of Nasopharyngeal Carcinoma", *EBioMedicine*, 18, pp. 32-40.