

# ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ SAO CHÉP *EPIDERMAN GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)* Ở MÔ UNG THƯ BIỂU MÔ TUYẾN VÚ

## EVALUATION OF THE REPRODUCTION LEVEL OF EPIDERMAN GROWTH FACTOR RECEPTORS (EGFR) IN BREAST CARCINOMA TISSUE

Lê Thị Phượng

Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương, Email: phuongsinh@gmail.com

**Tóm tắt** - Epiderman Growth Factor Receptor (EGFR) thụ thể yếu tố phát triển biểu mô, là 1 glycoprotein bề mặt màng tế bào. EGFR được phát hiện ở các dòng tế bào biểu mô và liên quan đến bệnh sinh của nhiều loại ung thư, đây là đích hấp dẫn trong việc chẩn đoán sớm và liệu pháp điều trị ung thư mới hiện nay. Để đánh giá mức độ sao chép EGFR ở mô UTBM tuyến vú thể ống các giai đoạn so với mô u xơ; Mức độ sao chép EGFR giữa các thể tế bào học của UTV trong cùng một giai đoạn ung thư, chúng tôi nghiên cứu 62 mẫu mô bệnh phẩm trong đó 47 mẫu mô UTBM tuyến vú, 15 mẫu u xơ được chẩn đoán xác định bằng hình ảnh giải phẫu bệnh. Tách chiết RNA tổng số, tổng hợp cDNA và đánh giá mức độ sao chép của EGFR. Kết quả cho thấy sự tăng cường sao chép của EGFR liên quan mật thiết với UTBM tuyến vú, tăng theo giai đoạn của ung thư và có sự khác biệt giữa các thể loại tế bào học của UTBM tuyến vú.

**Từ khóa** - EGFR; mức độ sao chép; RT-PCR; ung thư biểu mô; u xơ.

**Abstract** - Epiderman Growth Factor Receptor (EGFR) is a glycoprotein cell surface membrane. EGFR is detected in epithelial cell lines and related to the pathogenesis of many different types of cancer; therefore, this is a fascinating destination for early diagnosis and new cancer treatment at present. To evaluate the reproduction level of EGFR in pipe-shaped breast carcinoma tissue through different stages compared with fibroid tissue, we studied 62 tissue specimens, including 47 breast carcinoma samples and 15 samples diagnosed and confirmed by histopathological images. Total RNA was extracted from the tissue samples, then the synthesis of cDNA and the evaluation of EGFR's reproduction level was conducted. The results show that the rise in EGFR's reproduction level is closely related to breast carcinoma, which increases through the stages of cancer and there are differences among the cytological categories of breast carcinoma.

**Key words** - EGFR; copy level; RT-PCR; epithelium cancer; fibroma.

### 1. Mở đầu

Ung thư vú (UTV) là loại ung thư phổ biến nhất ở phụ nữ, đứng đầu và chiếm 21% trong tổng số các bệnh ung thư của phụ nữ trên toàn thế giới. Ung thư vú là sự phát triển ác tính của các tế bào biểu mô lót bên trong lòng ống và tiểu thùy của tuyến vú. Năm 2005, ung thư vú gây ra 502 000 ca tử vong (chiếm 7% số ca tử vong do ung thư và 1% tổng số tử vong thế giới), đứng hàng thứ 5 sau ung thư phổi, dạ dày, gan và đại tràng [7]. Ở Việt Nam, ung thư vú là một trong hai loại ung thư thường gặp nhất và đe dọa mạng sống của phụ nữ nhiều nhất. Năm 1998, tần suất mắc ung thư vú cao nhất ở Hà Nội với tỷ lệ chuẩn hóa theo tuổi là 20,3/100000 dân và cao thứ 2 là TP Hồ Chí Minh với tỷ lệ chuẩn hóa theo tuổi là 18/100000 dân, đứng sau ung thư cổ tử cung (28,6/100000) [7]. Theo ghi nhận của bệnh viện K năm 2000, tỷ lệ mắc bệnh ung thư vú chung cho cả nước là 17,4/100.000 phụ nữ.

Yếu tố phát triển *EGFR* là một polypeptid với vai trò kích thích sự tăng sinh, biệt hoá cả tế bào bình thường và các tế bào ác tính. Một trong những yếu tố phát triển được tìm ra sớm nhất là yếu tố phát triển biểu mô (EGF). Thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR), được mã hoá bởi gen tiền ung thư *c-erb*, là một phân tử glycoprotein bề mặt màng, trọng lượng phân tử 170 kDaltons (kDa). EGFR là gia đình gồm bốn thụ thể ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3 và ErbB-4. Phân tử EGFR gồm ba phân, phân gắn kết các phân tử nằm ngoài màng tế bào, phân xuyên màng và phân bên trong tế bào có hoạt tính enzyme protein tyrosin kinase. Chính hoạt động của protein tyrosin kinase đóng vai trò chính điều hoà sự tăng sinh và biệt hoá của tế bào [8]. Khi một chất gắn kết, ví dụ: yếu tố phát triển biểu mô (EGF) hoặc yếu tố phát triển tổ chức (TGF- $\alpha$ ) gắn với EGFR sẽ gây nên sự phân cực thụ thể và sự tự phosphoryl hoá của vùng có hoạt tính enzyme. Điều này khởi đầu một loạt phản

ứng tế bào mà kết quả là sự tăng sinh và ảnh hưởng đến sự tiến triển ác tính của khối u: tăng sinh mạch, di căn và ức chế quá trình chết theo chương trình [5].

Trong khoảng mười năm trở lại đây, nhiều nhà khoa học đã đưa ra những bằng chứng khoa học xác đáng chứng minh rằng sự tăng EGFR ở cả hai mức độ mRNA và protein đặc hiệu trong một số loại hình ung thư như ung thư tuyến giáp, ung thư đại trực tràng, ung thư phổi, u thần kinh, tiền liệt tuyến và ung thư tử cung [2, 3, 4, 5, 6]. Các tác giả đều đưa đến kết luận rằng EGFR có thể được sử dụng như một marker để chẩn đoán ung thư. Đồng thời một số tác giả đã nghiên cứu triển khai kỹ thuật xác định gen mã hoá EGFR của các tế bào ung thư lưu thông trong máu để giúp ích cho việc theo dõi và tiên lượng kết quả điều trị. Nhằm nghiên cứu khả năng ứng dụng EGFR như một marker trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh ung thư vú, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục đích “Đánh giá mức độ sao chép mRNA của EGFR ở mô u xơ so với mô ung thư vú thể ống theo giai đoạn; so sánh mức độ sao chép của EGFR ở giai đoạn II của ung thư các thể loại tế bào học khác nhau”

### 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Vật liệu

Gồm 62 mẫu mô trong đó có 15 mẫu u xơ và 37 mẫu ung thư. Tất cả các mẫu mô này được lấy từ bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định tại bệnh viện K Hà Nội dựa vào lâm sàng và cận lâm sàng (mô bệnh học, XQ, hoá sinh). Bệnh nhân chỉ bị ung thư vú ngoài ra không mắc bất kỳ loại hình bệnh tật, ung thư nào khác.

#### 2.2. Phương pháp

##### 2.2.1. Quy trình tách chiết RNA tổng số từ mô u xơ và mô ung thư vú

Sử dụng kit Trisol để tách chiết RNA tổng số theo quy

trình đã được mô tả trước đây bởi nhóm nghiên cứu Tạ Thành Văn và nnk [7]. RNA tổng số thu được phải đảm bảo nồng độ và độ tinh sạch tối ưu để tổng hợp cDNA.

### 2.2.2. Kỹ thuật tổng hợp ngược cDNA (RT-PCR)

4  $\mu$ g RNA tổng số thu được sau tách chiết sẽ được sử dụng để tổng hợp cDNA. Quá trình tổng hợp có sử dụng random primer đã pha loãng 20 lần, enzyme MMLV-RT, chất ức chế thủy phân RNA, chất ức chế protein và dNTP

### 2.2.3. RT-PCR bán định lượng khuếch đại gen mã hóa EGFR ở mô ung thư vú

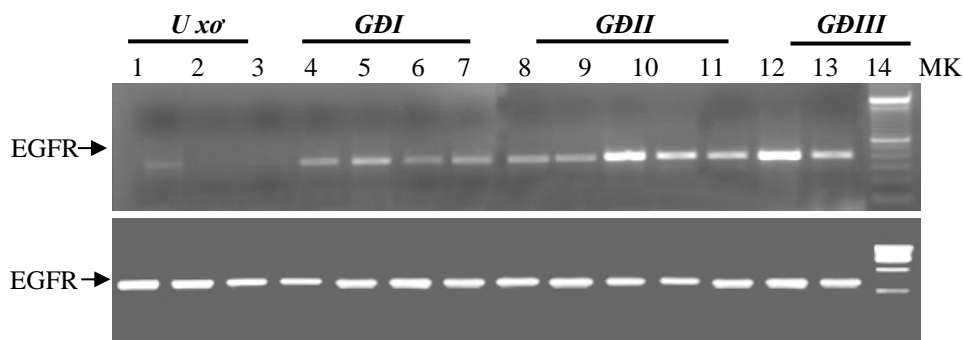
Cặp mồi đặc hiệu với EGFR đã được sử dụng để đánh giá mức độ sao chép của EGFR, nồng độ cDNA của tất cả các mẫu chạy PCR là 400 ng. Phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình: 94°C - 10 phút; [94°C - 30 giây, 60°C - 45 giây, 72°C - 45 giây] trong 5 chu kỳ; [94°C - 30 giây, 55°C - 45 giây, 72°C - 45 giây] trong 30 chu kỳ; 72°C - 10 phút; bảo

quản ở 4°C [1]. Gen nội chuẩn GAPDH được sử dụng để đánh giá chất lượng mẫu và so sánh lượng mẫu sử dụng trong mỗi phản ứng. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%, nhuộm Ethidium Bromide trong vòng 5 phút, sau đó được chụp ảnh và sử lý bằng phần mềm *chemidoc iQ 76S00503* để đo mật độ vạch của sản phẩm PCR

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Sự tăng cường tổng hợp của EGFR ở mô ung thư vú so với mô u xơ và theo giai đoạn ung thư của thể ống

Bằng kỹ thuật RT-PCR bán định lượng, chúng tôi sử dụng cặp mồi đặc hiệu với EGFR và GAPDH để đánh giá mức độ sao chép mRNA của EGFR ở mô ung thư vú so với mô u xơ và theo các giai đoạn ung thư vú thể ống. Sản phẩm PCR đặc hiệu của EGFR có kích thước 420 bp và của GAPDH có kích thước 350 bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR của EGFR và GAPDH trên gel agarose 1.5% được chỉ ở Hình 1.



**Hình 1.** Kết quả phản ứng RT - PCR của gen EGRF và GAPDH trên mô u vú lành tính và mô ung thư. Sản phẩm được khuếch đại từ cDNA của mô u vú lành tính (1-3) và mô ung thư ống GĐ I (4 -7; GĐ II (8-11) GĐ III (12-14) MK: Thang DNA chuẩn 100 bp.

Quan sát ở Hình 1 chúng ta thấy đậm độ vạch của EGFR ở những mẫu ung thư rõ hơn những mẫu u xơ và tăng dần theo các giai đoạn của UTV thể ống. Hình ảnh điện di gen GAPDH cho thấy chất lượng mRNA của các mẫu tốt, đảm bảo tiêu chuẩn cho phản ứng, đồng thời không có sự khác biệt về lượng mẫu đã sử dụng trong mỗi phản ứng PCR. Gen *GAPDH* được thể hiện trên mọi tế bào, không phụ thuộc vào thể loại, trạng thái hoạt động hay nguồn gốc nên được dùng như một gen nội chuẩn để đánh giá chất lượng của sản phẩm RNA tách chiết và so sánh lượng mẫu sử dụng trong phản ứng RT-PCR. Kết quả cho thấy, EGFR được tăng cường sao chép rất rõ ở mô ung thư và thấp hơn trên những mẫu tách từ mô u xơ

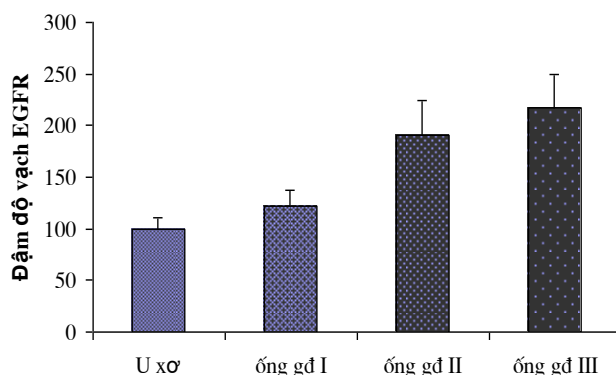
**Bảng 1.** Giá trị trung bình đậm độ vạch PCR EGFR các mẫu u xơ và ung thư vú thể ống ở các giai đoạn khác nhau

| Mô               | Mô u lành | Mô ung thư thể ống |     |     |
|------------------|-----------|--------------------|-----|-----|
|                  |           | I                  | II  | III |
| Số lượng mẫu     | 15        | 6                  | 16  | 11  |
| Đậm độ vạch EGFR | 100       | 122                | 191 | 217 |

Để đánh giá sự biểu hiện của EGFR theo giai đoạn khác nhau, chúng tôi tiến hành đo đậm độ của vạch EGFR và tăng theo các giai đoạn I, II, III của UTV thể ống sử dụng phần mềm chuyên dụng *chemidoc iQ 76S00503* (Bảng 1), mức độ sao chép của HIP giữa các giai đoạn sẽ được trình bày ở Hình 2.

Kết quả ở Hình 2 cho thấy, giá trị đậm độ vạch tăng dần theo giai đoạn ung thư. Điều này gợi ý rằng, EGFR được

tăng cường sao chép ở những mẫu ung thư so với mẫu lành tính và sự tăng cường này phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của ung thư thể ống



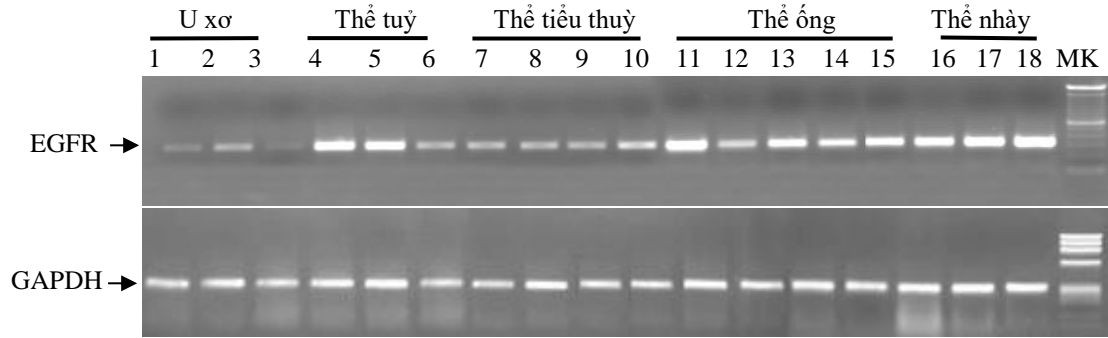
**Hình 2.** Biểu đồ so sánh sự sao chép của EGFR ở mô lành tính và mô ung thư thể ống ở các giai đoạn khác nhau.

### 3.2. Đánh giá sự sao chép EGFR trên mô ung thư vú giai đoạn II ở các thể loại tế bào học khác nhau

Để so sánh mức độ biểu hiện của EGFR theo các thể loại tế bào học của ung thư, chúng tôi tiến hành phản ứng RT-PCR bán định lượng trên các mẫu cDNA của 4 thể tế bào học (thể tủy, thể tiêu thủy, thể ống và thể nhày) của cùng giai đoạn II. Chúng tôi cũng tiến hành đo đậm độ của vạch EGFR theo các thể tế bào học của UTV giai đoạn II sử dụng phần mềm chuyên dụng *chemidoc iQ 76S00503* (Bảng 2), mức độ sao chép của EGFR giữa các thể tế bào

học được trình bày ở Hình 4. Chúng tôi chia các thể ung thư vú theo 2 nhóm: nhóm 1 gồm thể ống và thể nhày (vì trên lâm sàng UTBM thể nhày thường gặp là biến thể của

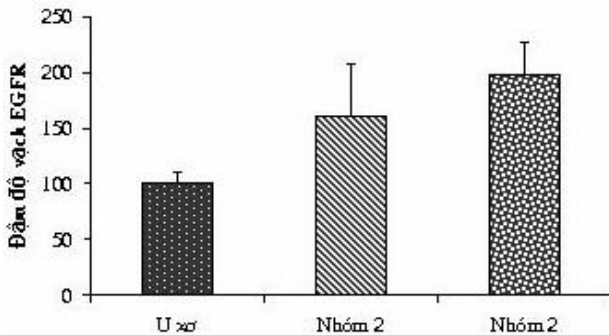
UTBM thể ống xâm nhập); nhóm 2 là 2 thể còn lại, thể tủy và thể tiểu thùy.



**Hình 3.** Kết quả phân ứng RT-PCR của gen EGFR và GAPDH ở các thể loại tế bào ung thư vú khác nhau: u xơ vú (1-3); thể tủy (4-6); thể tiểu thùy (7-10); thể ống (11-15) và thể nhày (16-18). MK: Thang DNA chuẩn 100 bp.

**Bảng 2.** Giá trị trung bình đậm độ vạch PCR EGFR của các mẫu ung thư vú giai đoạn 2 thuộc các thể loại tế bào khác nhau

| Thể loại tế bào  | U xơ | Nhóm 1 | Nhóm 2 |
|------------------|------|--------|--------|
| Số lượng mẫu     | 15   | 8      | 19     |
| Đậm độ vạch EGFR | 100  | 161    | 199    |



**Hình 4.** So sánh sự sao chép EGFR giữa các thể tế bào khác nhau ở giai đoạn II

#### 4. Thảo luận

UTV là loại hay gặp nhất và có xu hướng ngày càng gia tăng ở phụ nữ nước ta [7]. Bệnh phát sinh chủ yếu từ các tế bào biểu mô của các ống tuyến vú. UTV nếu được phát hiện sớm và điều trị kịp thời thì tỷ lệ sống thường là cao. Để chẩn đoán ung thư vú nhiều phương pháp đã và đang được áp dụng như thăm khám lâm sàng, siêu âm, chụp X quang, hoá sinh và mô bệnh học. Các phương pháp này ít nhiều thể hiện sự hạn chế trong việc phát hiện và chẩn đoán ung thư giai đoạn sớm. Với nghiên cứu của chúng tôi, sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử, một kỹ thuật đang ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán sớm bệnh ung thư để xác định mức độ biểu hiện mRNA/EGFR.

Kết quả bước đầu cho thấy, EGFR được tăng cường sao chép ở những mô UTBM tuyến vú trong khi đó xuất hiện kém ở mô u xơ vú. Sự biểu hiện của gen EGFR còn có sự thay đổi theo giai đoạn của ung thư vú thể ống (thể này chiếm đến 80% trong ung thư vú). Mức độ biểu hiện gen EGFR giữa các thể khác nhau trong ung thư vú của cùng một giai đoạn cũng có sự khác biệt (trong nghiên cứu này chúng tôi so sánh các thể ở giai đoạn II trên lâm sàng của ung thư vú), tăng trong thể ống và thể nhày (vì thực tế trên lâm sàng ung thư thể nhày đơn thuần rất ít gặp mà thường

thấy UTBM nội ống được tìm thấy trong 75% các trường hợp UTBM thể nhày), giảm hơn trong hai thể tiểu thùy và thể tủy những thể ít gặp và mức độ ác tính kém hơn so với hai thể kia. Như vậy sự tăng cường tổng hợp của EGFR có mối liên hệ chặt chẽ với các giai đoạn của ung thư và với mức độ ác tính của các dòng tế bào ung thư. Kết quả nghiên cứu ban đầu của chúng tôi gợi ý rằng EGFR có thể được dùng như một marker có giá trị phối hợp trong chẩn đoán sớm UTBM tuyến vú.

Kết quả chẩn đoán bằng kỹ thuật gen cũng tương ứng với các kết quả thăm khám lâm sàng và cận lâm sàng (mô bệnh học). Nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả nước ngoài cho thấy mức độ sao chép của EGFR được tăng cường trong ung thư biểu mô trong khi đó biểu hiện rất thấp ở mô u lành [2, 5]. EGFR cũng được tăng cường tổng hợp ở một số dòng tế bào ung thư vú [4, 6]. Kết quả nghiên cứu thu được góp phần khẳng định EGFR ngoài việc sử dụng như một marker phối hợp trong chẩn đoán sớm ung thư vú, còn có thể dùng EGFR là một đích đầy hứa hẹn cho liệu pháp phân tử trị liệu cho một số loại hình ung thư trong đó có ung thư vú [3, 4]. Tín hiệu EGFR tăng cao trong tế bào ung thư có lẽ là một yếu tố quan trọng trong việc thúc đẩy sự phát triển tế bào u, ngăn chặn cái chết theo chương trình và tạo thuận lợi cho tiến trình di căn theo các cơ chế khác nhau. Thay đổi hoặc cắt ngắn tiến trình này là một trong những đích nghiên cứu tạo ra thuốc điều trị ung thư.

#### 5. Kết luận

Mức độ sao chép của EGFR tăng rõ ở mô UTBM vú so với mô u xơ và tăng theo giai đoạn của ung thư vú thể ống.

Mức độ sao chép của EGFR còn có sự khác biệt giữa các thể tế bào học ở cùng một giai đoạn ung thư.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Antonella De L., Sandro Pignata et al., 2000. Detection of Circulating Tumor Cells in Carcinoma Patients by a Novel Epidermal Growth Factor Receptor Reverse Transcription-PCR Assay. *Clinical Cancer Research*, pp.1439-1445.
- [2] Bettina Papouchado, Lori A Erickson, Audrey L Rohlinger, Timothy J Hobday et al., 2005. Epidermal Growth Factor Receptor and activated epidermal Growth Factor Receptor expression in gastrointestinal carcinoids and pancreatic endocrine carcinomas. *Modern Pathology*, 18: 1329-1335.

- [3] Bradley A. Schiff, Andrea B. McMurphy, Samar A. Iasser et al., 2004. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer and the EGFR inhibitor Gefitinib inhibit the growth of anaplastic thyroid cancer”, *Clinical Cancer Research*, 10, pp. 8594-8602.
- [4] De Jong J. S., van Deist P. J., van der Valk P., Baak J. P., 1998. Expression of growth-factors, growth-inhibiting factors and their receptors in invasive breast cancer. II Correlations with proliferation and angiogenesis. *J. Pathol*, 184:53-57.
- [5] Duh QY, Gum ET, Gerend PL, Raper SE, Clark OH. Epidermal growth factor receptors in normal and neoplastic thyroid tissue PubMed, PMID: 3000011.
- [6] Hu xu, Yingli Yu, Dorota Marciniak, Arun K, Rishi, Fazlul H Sarkar, Omer Kucuk and Adhip P N Majumdar, 2005. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-related protein inhibits multiple members of the EGFR in colon and breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 3: 435-442.
- [7] Nguyễn Chấn Hùng, 2004. *Ung thư học nội khoa*. NXB. Y Học TP HCM
- [8] Nguyễn Thị Phương Ngọc, Trần Văn Khánh, Đào Kim Chi, Phạm Thị Lý, Tạ Thành Văn, 2006. Tăng cường tổng hợp Heparansulfate Interacting Protein (HIP) ở mô ung thư tuyến tiền liệt. *Tạp chí Dược học*, 12: 154-58.
- [9] Rude Voldbor B., Damstrup L., M. Spang- Thomsen, H. Skovgaard Poulsen, 1997. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology*, 8: 1197-1206.

(BBT nhận bài: 23/07/2014, phản biện xong: 10/09/2014)