

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN MINH HIỀN

**ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ SAO CHÉP hMAM  
mRNA, SURVIVIN mRNA TỪ TẾ BÀO  
UNG THƯ VÚ**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2014

**BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**NGUYỄN MINH HIỀN**

**ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ SAO CHÉP hMAM  
mRNA, SURVIVIN mRNA TỪ TẾ BÀO  
UNG THƯ VÚ**

Chuyên ngành: Hóa sinh

Mã số: 62720112

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS Phạm Thiện Ngọc
2. PGS.TS Trần Văn Thuận

**HÀ NỘI - 2014**

## Lời cảm ơn

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc Bệnh viện Thanh Nhàn, Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo sau đại học, Bộ môn Hóa sinh, các phòng ban chức năng – trường Đại học Y Hà Nội đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Phòng Công nghệ Tế bào Động vật – Viện Khoa học Công nghệ đã giúp đỡ tôi thực hiện kỹ thuật trong suốt quá trình nghiên cứu hoàn thành luận án.

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến

PGS.TS. Phạm Thiện Ngọc, người Thầy rất mực tận tâm, đã giúp đỡ, hướng dẫn, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

PGS.TS. Trần Văn Thuấn, người Thầy đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện luận án này.

PGS.TS. Lê Quang Huân, người Thầy đã bồi dưỡng cho tôi nhiều kiến thức chuyên môn, những kinh nghiệm quý báu trong nghiên cứu.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn sâu sắc tới

GS.TS. Tạ Thành Văn, PGS.TS. Nguyễn Thị Hà, TS. Tạ Văn Tờ, những người Thầy đã giúp đỡ hết lòng, tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành luận án.

Trong quá trình học tập và thực hiện luận án, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, tạo điều kiện của Bộ Y tế, tập thể khoa Ngoại vú, khoa Giải phẫu bệnh, khoa Hóa sinh - Bệnh viện K, khoa Hóa sinh Bệnh viện Thanh Nhàn, các nhà khoa học, các nghiên cứu viên phòng Công nghệ Tế bào Động vật - Viện Khoa học Công nghệ. Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành về sự giúp đỡ quý báu này.

Cuối cùng xin được bày tỏ lòng biết ơn vô hạn đối với bố mẹ, các anh chị em trong gia đình, bạn bè đồng nghiệp, đặc biệt là chồng và các con, luôn yêu thương, khích lệ, tạo chỗ dựa về tinh cảm, tinh thần, vật chất cho tôi để hoàn thành tốt chương trình học tập và thực hiện luận án.

*Hà Nội, ngày 5 tháng 8 năm 2014*

**Nguyễn Minh Hiền**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là: Nguyễn Minh Hiền, nghiên cứu sinh khóa 29 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Phạm Thiện Ngọc và PGS.TS. Trần Văn Thuận.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố ở Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày 5 tháng 8 năm 2014*

**Tác giả**

**Nguyễn Minh Hiền**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

AJCC	American Joint Committee on Cancer (Hội ung thư Hoa Kỳ)
ASCO	American Society of Clinical Oncology (Hội ung thư lâm sàng Hoa Kỳ)
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ĐVPX	Đồng vị phóng xạ
EGFR	Epidermal Growth Factor receptor (Thụ thể yếu tố phát triển biểu mô)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HMMD	Hóa mô miễn dịch
hMAM	Human Mammaglobin
HIP	Heparansulfate Interacting protein
IAP	Inhibitor of apoptosis (Ức chế quá trình chết theo chương trình)
NST	Nhiễm sắc thể
NTP	Nucleotide tri phosphate
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR (PCR phiên mã ngược)
RNA	Ribonucleic Acid
TBUTM	Circulating Tumor Cell (Tế bào ung thư lưu hành trong máu)
TLPT	Trọng lượng phân tử

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ</b> .....	<b>1</b>
<b>Chương 1: TỔNG QUAN</b> .....	<b>3</b>
1.1. Ung thư vú .....	3
1.1.1. Khái niệm và tỷ lệ mắc bệnh ung thư vú .....	3
1.1.2. Tiến triển và các giai đoạn ung thư vú .....	4
1.1.3. Chẩn đoán ung thư vú .....	8
1.2. TBUTM và vai trò của <i>survivin</i> mRNA, <i>hMAM</i> mRNA trong phát hiện TBUTM.....	13
1.2.1. Đặc điểm TBUTM.....	13
1.2.2. Kỹ thuật phát hiện TBUTM trên thế giới .....	14
1.2.3. Phát hiện tế bào ung thư vú trong máu bằng nhân bản các mRNA của <i>hMAM</i> và <i>survivin</i> .....	21
1.3. Nghiên cứu phát hiện tế bào ung thư vú bằng kỹ thuật sinh học phân tử ở Việt Nam.....	32
<b>Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>34</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	34
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	34
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu và xử lý số liệu.....	34
2.2.2. Địa điểm, thiết bị nghiên cứu .....	36
2.2.3. Các bước tiến hành .....	36
2.3. Thời gian và kinh phí đề tài.....	48
2.4. Vấn đề đạo đức của đề tài .....	48
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>49</b>
3.1. Xây dựng quy trình phát hiện sao chép gen <i>hMAM</i> và <i>survivin</i> ở dòng tế bào ung thư vú nuôi cấy.....	49
3.1.1. Kết quả RT-PCR phát hiện <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA ở dòng tế bào .....	49

3.1.2. Giải trình tự sản phẩm PCR gen <i>hMAM</i> , <i>survivin</i> đã khuếch đại..	50
3.2. RT-PCR phát hiện sự sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA	
trong mô và trong máu bệnh nhân ung thư vú.....	55
3.2.1. Đặc điểm nhóm bệnh nhân nghiên cứu .....	55
3.2.2. RT-PCR phát hiện sự sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA	
trong mô bệnh nhân ung thư vú .....	58
3.3. Realtime PCR đánh giá mức độ sao chép <i>hMAM</i> mRNA, <i>survivin</i>	
mRNA trong nhóm nghiên cứu.....	70
3.3.1. Xây dựng đường chuẩn xác định số bản sao từ dòng tế bào ung thư vú..	70
3.3.2. Mức độ sao chép <i>hMAM</i> mRNA, <i>survivin</i> mRNA ở mô ung thư vú..	79
3.3.3. So sánh mức độ sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA trong	
máu và trong mô bệnh nhân ung thư vú.....	82
3.3.4. Diễn tiến sự sao chép <i>hMAM</i> mRNA, <i>survivin</i> mRNA theo giai	
đoạn bệnh .....	86
<b>Chương 4: BÀN LUẬN .....</b>	<b>87</b>
4.1. Xây dựng quy trình phát hiện sự sao chép gen <i>hMAM</i> và <i>survivin</i> ở	
dòng tế bào ung thư vú nuôi cấy. ....	87
4.2. RT-PCR phát hiện sự sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA trong	
mô và trong máu bệnh nhân ung thư vú.....	91
4.2.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của nhóm ung thư vú nghiên cứu	91
4.2.2. RNA tổng số, tổng hợp cDNA, điện di sản phẩm RT- PCR .....	93
4.2.3. Tỷ lệ sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA trong mô ung thư vú	
và mối liên quan với các chỉ số lâm sàng, cận lâm sàng trong bệnh ung	
thư vú.....	97
4.2.4. Tỷ lệ sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA trong máu ung	
thư vú và mối liên quan với các chỉ số lâm sàng, cận lâm sàng trong	
bệnh ung thư vú.....	102

4.3. Realtime PCR đánh giá mức độ sao chép <i>hMAM</i> mRNA, <i>survivin</i> mRNA trong nhóm nghiên cứu.....	109
4.3.1. Xây dựng đường chuẩn xác định số bản sao từ dòng tế bào ung thư vú.....	110
4.3.2. Sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ vú.....	112
4.3.3. So sánh mức độ sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA trong máu và trong mô bệnh nhân ung thư vú.....	114
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>119</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>120</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	



## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1:	Phân chia giai đoạn ung thư vú.....	7
Bảng 2.1:	Thành phần tham gia phản ứng PCR.....	43
Bảng 2.2:	Thành phần phản ứng Realtime PCR .....	46
Bảng 3.1:	Đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học của nhóm ung thư vú.....	55
Bảng 3.2:	Độ tinh sạch và nồng độ RNA tổng số tách chiết trên một vài mẫu nghiên cứu.....	57
Bảng 3.3:	So sánh RNA tổng số ở nhóm ung thư vú và u xơ vú.....	58
Bảng 3.4:	Mối liên quan giữa tỷ lệ sao chép của <i>hMAM</i> mRNA trong mô ung thư với một số yếu tố sinh học liên quan đến ung thư vú.....	62
Bảng 3.5:	Mối liên quan giữa tỷ lệ sao chép của <i>survivin</i> mRNA trong mô ung thư với một số yếu tố sinh học liên quan đến ung thư vú.....	64
Bảng 3.6:	Mối liên quan giữa tỷ lệ sao chép của <i>hMAM</i> mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú với một số yếu tố liên quan đến ung thư vú..	67
Bảng 3.7:	Mối liên quan giữa tỷ lệ sao chép của <i>survivin</i> mRNA ở máu bệnh nhân ung thư vú với một số yếu tố liên quan đến ung thư vú.....	69
Bảng 3.8:	Mức độ sao chép <i>hMAM</i> mRNA, <i>survivin</i> mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ.....	79
Bảng 3.9:	So sánh mức độ sao chép <i>hMAM</i> mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ.....	80
Bảng 3.10:	So sánh mức độ sao chép <i>survivin</i> mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ.....	81
Bảng 3.11:	Mức độ sao chép của <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA trong máu và trong mô ung thư vú.....	82
Bảng 3.12:	So sánh mức độ sao chép <i>hMAM</i> mRNA ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú .....	83

Bảng 3.13: So sánh mức độ sao chép <i>survivin</i> mRNA ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú .....	84
Bảng 3.14: Mối tương quan giữa mức độ sao chép sao chép <i>hMAM</i> mRNA, <i>survivin</i> mRNA ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú .....	85
Bảng 4.1: Tỷ lệ phát hiện <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA ở bệnh nhân ung thư vú trong một số nghiên cứu .....	108

## DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1:	Sơ đồ nhóm thụ thể của yếu tố tăng trưởng thượng bì .....	12
Hình 1.2:	Sơ đồ “làm giàu” TBUTM.....	15
Hình 1.3:	Hình ảnh tế bào ung thư di chuyển phát hiện dưới kính hiển vi điện tử.....	15
Hình 1.4:	Tế bào ung thư vú lưu hành trong máu quét lase.....	16
Hình 1.5:	Biểu đồ khuếch đại của phản ứng Realtime PCR.....	21
Hình 1.6:	Cấu trúc phân tử protein survivin .....	21
Hình 1.7:	Sơ đồ NST 17 và vị trí của gen <i>survivin</i> .....	22
Hình 1.8:	Mô hình <i>survivin</i> mRNA tiền thân tạo thành mRNA trưởng thành với 5 biến thể ghép nối.....	22
Hình 1.9:	Cấu trúc phân tử protein hMAM .....	26
Hình 1.10:	Sơ đồ NST 11 và vị trí của gen <i>hMAM</i> .....	26
Hình 1.11:	Sơ đồ các đoạn exon và intron trên đoạn gen <i>SCGB2A2. B</i> .....	27
Hình 3.1:	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR cDNA của hMAM, survivin, GAPDH ở dòng tế bào ung thư vú.....	49
Hình 3.2:	Trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của đoạn gen <i>hMAM</i> .....	51
Hình 3.3:	Hình ảnh chromas trình tự gen hMAM khuếch đại được từ mô của bệnh nhân mã số 4744-11 .....	51
Hình 3.4:	Hình ảnh so sánh kết quả giải trình tự bản sao gen <i>hMAM</i> nhân bản được với trình tự <i>hMAM</i> mRNA công bố tại ngân hàng gen .....	52
Hình 3.5:	Trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của đoạn gen <i>survivin</i> .....	53

Hình 3.6:	Hình ảnh chromas trình tự đoạn gen <i>survivin</i> khuếch đại được từ máu của bệnh nhân mã số 4312-11.....	53
Hình 3.7:	Hình ảnh so sánh kết quả giải trình tự bản sao gen <i>survivin</i> nhân bản được với trình tự <i>survivin</i> công bố tại ngân hàng gen .....	54
Hình 3.8.	Hình ảnh điện di trên gel agarose 0,8% sản phẩm RNA tách chiết từ mẫu nghiên cứu .....	56
Hình 3.9:	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản cDNA <i>hMAM</i> và <i>GAPDH</i> ở mô và máu bệnh nhân UTV giai đoạn II .....	59
Hình 3.10:	Hình ảnh điện di cDNA của <i>hMAM</i> và <i>GAPDH</i> trên gel agarose.....	60
Hình 3.11:	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản cDNA <i>survivin</i> và <i>GAPDH</i> ở mô và máu bệnh nhân UTV giai đoạn II .....	60
Hình 3.12:	Tỷ lệ phát hiện sự sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA ở mô nghiên cứu.....	61
Hình 3.13:	Tỷ lệ phát hiện sự sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA ở máu bệnh nhân ung thư vú và u xơ vú.....	66
Hình 3.14:	Realtime PCR <i>hMAM</i> cDNA xác định đường chuẩn trên dòng tế bào ung thư vú BT474 .....	71
Hình 3.15:	Realtime PCR <i>hMAM</i> cDNA xác định ngưỡng phát hiện trên dòng tế bào ung thư vú BT474.....	72
Hình 3.16:	Realtime PCR <i>survivin</i> cDNA xác định đường chuẩn trên dòng tế bào ung thư vú MCF7.....	73
Hình 3.17:	Real time PCR <i>survivin</i> cDNA xác định ngưỡng phát hiện trên dòng tế bào ung thư vú MCF7 .....	74
Hình 3.18:	Kết quả Tm nhân bản cDNA <i>hMAM</i> từ bệnh nhân ung thư vú.....	75
Hình 3.19:	Phân tích nhiệt độ chảy nhân bản gen <i>hMAM</i> ở bệnh nhân u xơ vú, dòng tế bào ung thư vú, máu và mô bệnh nhân ung thư vú.....	76

Hình 3.20: Phân tích nhiệt độ chảy sản phẩm nhân bản gen survivin ở bệnh nhân ung thư vú.....	77
Hình 3.21: Đánh giá số lượng bản sao <i>hMAM</i> cDNA bằng Realtime PCR.....	78
Hình 3.22: Diễn tiến sự sao chép <i>hMAM</i> mRNA và <i>survivin</i> mRNA trong máu, mô theo các giai đoạn bệnh.....	86

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư vú (breast cancer) là tên gọi của ung thư có nguồn gốc từ mô vú, phần lớn từ các ống dẫn sữa hoặc các tiểu thùy [1]. Được coi là loại ung thư hay gặp trên thế giới, ung thư vú đứng hàng đầu trong các loại ung thư ở nữ giới. Theo cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế (The International Agency for Research on Cancer-IARC), ung thư vú chiếm 23% tổng số các loại ung thư ở phụ nữ trên thế giới[2]. Hàng năm trên toàn thế giới có khoảng 1,15 triệu phụ nữ mắc bệnh ung thư vú mới được chẩn đoán và 465.000 ca tử vong[3]. Tại Việt Nam, người ta ước tính tỷ lệ mắc ung thư vú chuẩn theo tuổi năm 2000 là 17,4/100.000 dân, đến năm 2010 là 29,9/100.000 dân đứng đầu trong các loại ung thư ở phụ nữ[4]. Không những là loại ung thư phổ biến, ung thư vú còn là nguyên nhân chính gây tử vong đối với phụ nữ ở nhiều nước trên thế giới, nhất là ở các nước đang phát triển. Theo các nhà ung thư học nguy cơ mắc ung thư vú theo suốt cuộc đời người phụ nữ từ 20 tuổi đến 70 tuổi, ung thư vú nếu được phát hiện sớm, điều trị kịp thời thì tỷ lệ sống trên 5 năm cao hơn một cách rõ rệt. Một nghiên cứu về kết quả điều trị theo giai đoạn cho thấy tỷ lệ sống sau 5 năm là 97,4% khi bệnh còn ở tại chỗ, 77,4% khi bệnh ở tại vùng, 21,2% khi đã có di căn xa, vì vậy chẩn đoán sớm ung thư vú được coi là vấn đề quan trọng, cấp thiết trong sự nghiệp phòng chống ung thư[5].

Từ hơn hai thập niên gần đây công nghệ sinh học, đặc biệt là sinh học phân tử đã có những tiến bộ vượt bậc trên nhiều lĩnh vực chẩn đoán, điều trị và theo dõi sau điều trị ung thư vú nhờ đó mà việc phát hiện ung thư vú sớm hơn, đánh giá giai đoạn ung thư vú chính xác hơn, có nhiều phương thức điều trị chuyên biệt phù hợp cho từng bệnh nhân cải thiện kết quả sống thêm và chất lượng sống cho người bệnh. Một trong những phương pháp đó là phát hiện các tế bào ung thư dựa vào sự sao chép của các mRNA bất thường đặc trưng khối u mà ở người bình thường không thấy sự sao chép này, từ đó có

thể phát hiện tế bào ung thư từ mô ung thư và tế bào ung thư di chuyển trong máu (TBUTM) ngay từ giai đoạn rất sớm [6]. Các nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh có rất nhiều gen liên quan đến ung thư vú, trong đó *survivin*, *hMAM*, được coi là gen có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Theo nghiên cứu Shen Chang xing, độ nhạy của *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong huyết thanh của bệnh nhân ung thư vú là 36,2%, 33%, khi kết hợp 2 gen này và *hTERT* thì độ nhạy là 70%, không thấy có sự biểu hiện của *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở người không mắc ung thư vú [7]. Theo các nghiên cứu gần đây của Chen CC về bốn loại mRNA là *PTT1*, *survivin*, *UbcH10*, *TK* (*thymidin kinase*) từ các TBUTM cho thấy độ nhạy đạt 76%-85%, độ đặc hiệu 75%-79% khi sử dụng từng dấu ấn riêng biệt, khi kết hợp 3 loại dấu ấn độ nhạy đạt 86%, độ đặc hiệu đạt tới 88%. Sử dụng 3 dấu ấn là mRNA khả năng phát hiện khối u nhỏ hơn 2cm là 79%, lớn hơn 2cm là 100%, phát hiện khối u vú ở giai đoạn 1 là 73%, giai đoạn 2 là 95%, giai đoạn 3 là 100% [8]. Việc phát hiện nhiều dấu ấn ung thư có bản chất là mRNA đặc hiệu từ các TBUTM đã mở ra triển vọng phát hiện khối u di căn từ giai đoạn sớm vì vậy nghiên cứu:

**“Đánh giá mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA từ tế bào ung thư vú”**

Được tiến hành với các mục tiêu:

1. ***Đánh giá mức độ sao chép hMAM mRNA, survivin mRNA từ mô ung thư vú.***
2. ***Đánh giá mức độ sao chép hMAM mRNA, survivin mRNA từ tế bào ung thư vú lưu hành trong máu.***

# Chương 1

## TỔNG QUAN

### 1.1. Ung thư vú

#### 1.1.1. Khái niệm và tỷ lệ mắc bệnh ung thư vú

Ung thư vú có nguồn gốc từ ống dẫn sữa được gọi là ung thư biểu mô tuyến sữa, ung thư có nguồn gốc từ tiểu thùy được gọi là ung thư biểu mô tiểu thùy. Có nhiều dạng ung thư vú khác nhau với trạng thái khác nhau, sự ác tính khác nhau, bản chất di truyền khác nhau và tỷ lệ sống sót khác nhau phụ thuộc vào các yếu tố này[1].

Tỷ lệ ung thư vú tăng theo tuổi, hiếm gặp ở lứa tuổi 30 (khoảng 0,8%), sau độ tuổi này, tỷ lệ mắc bệnh gia tăng một cách nhanh chóng (khoảng 6,5% ở tuổi 30-40). Theo AJCC, tỷ lệ mắc chuẩn theo tuổi tăng từ 25/100.000 dân ở độ tuổi 30-34 lên đến 200/100.000 dân ở độ tuổi từ 45-49[3]. Tuy nhiên người ta nhận thấy rằng nguy cơ mắc bệnh ung thư vú tăng chậm ở độ tuổi 45-50. Điều này gợi ý rằng ung thư vú là loại ung thư có liên quan mật thiết với nội tiết. Khác với các nước phương tây, ở Việt Nam ung thư vú bắt đầu tăng nhanh ở độ tuổi 35 và đạt tỷ lệ cao nhất ở độ tuổi trước và sau mãn kinh (45-54 tuổi) rồi sau đó có xu hướng giảm xuống rõ rệt. Tỷ lệ chết do ung thư vú tăng lên theo tỷ lệ mắc. Ở một số nước phát triển mặc dù tỷ lệ mắc ung thư vú gia tăng nhanh chóng nhưng tỷ lệ chết vẫn giữ được ở mức ổn định nhờ các tiến bộ trong sàng lọc phát hiện bệnh sớm và những thành tựu đạt được trong điều trị. Người ta nhận thấy tỷ lệ mắc ung thư vú tăng gấp hai lần so với những năm 50 thế kỷ XX ở một số nước có nền công nghiệp phát triển mạnh trong các năm qua như: Nhật Bản, Singapore, một số thành phố của Trung



Quốc...Sự gia tăng nhanh chóng tỷ lệ mắc ở các vùng này phần nào được giải thích do sự thay đổi về lối sống, kinh tế phát triển, ngày càng có nhiều phụ nữ làm việc trong lĩnh vực công nghiệp, tuổi thọ trung bình tăng, thay đổi về sinh sản, chế độ ăn...[5].

Ở Việt Nam, theo ghi nhận tình hình ung thư tại Hà Nội, Thành phố Hồ Chí Minh và một số tỉnh trong nhiều năm, người ta ước tính tỷ lệ mắc ung thư vú chuẩn theo tuổi năm 2000 là 17,4/100.000 dân, đứng đầu trong các loại ung thư ở phụ nữ. Khác với các nước phương tây, ở Việt Nam ung thư vú bắt đầu tăng nhanh ở độ tuổi 35 và đạt tỷ lệ cao nhất ở độ tuổi trước và sau mãn kinh(45-54 tuổi) rồi sau đó có xu hướng giảm xuống rõ rệt. Giai đoạn 2001-2004, tỷ lệ mắc ung thư vú chuẩn theo tuổi ở Hà Nội là 29,7/100.000 dân, tại Thành phố Hồ Chí Minh và Cần Thơ là 19,4/100.000 dân, ở Hải Phòng là 10,5/100.000 dân, ở Thái Nguyên là 11,6/100.000 dân, ở Huế là 12,2/100.000 dân. Đây là loại ung thư có tỷ lệ mắc đứng đầu ở phụ nữ Việt Nam. Tóm lại, ung thư vú là bệnh phổ biến nhất trong tất cả các loại ung thư ở phụ nữ trên thế giới cũng như ở Việt Nam[5].

### ***1.1.2. Tiến triển và các giai đoạn ung thư vú***

#### ***1.1.2.1. Tiến triển ung thư vú***

Biểu hiện lâm sàng của ung thư vú có đặc trưng là kéo dài và rất khác nhau giữa các bệnh nhân. Đa số các trường hợp ung thư vú xâm lấn phát sinh từ tế bào biểu mô của thùy hoặc của ống dẫn của tuyến vú. Các tế bào bị ung thư hóa nhân lên với tốc độ khoảng 60 ngày một chu kỳ. Ước tính, từ khi tế bào chuyển biến ác tính đầu tiên đến khi phát hiện được khối u có kích thước 1cm thì phải mất khoảng thời gian vài năm. Chỉ một số ít bệnh nhân (< 3%) ngay sau khi xuất hiện các triệu chứng, ung thư vú tiến triển nhanh và tử vong

trong vài tháng. Ung thư vú có khả năng chữa khỏi ở nhiều bệnh nhân nếu bệnh được chẩn đoán trong giai đoạn tiền lâm sàng (chưa có triệu chứng hay dấu hiệu lâm sàng).Green Wood, Bloomtheo dõi những trường hợp ung thư vú không điều trị, thấy thời gian sống thêm trung bình kể từ khi chẩn đoán là 31 tháng, tỷ lệ sống thêm 3 năm là 40% và 5 năm là 18-20%, có 4% sống thêm 10 năm[dẫn theo 5].

### ***Giai đoạn tại chỗ:***

Khối u nguyên phát xuất phát từ đơn vị tiểu thùy - ống tuyến tận cùng, tức phần chế tiết của tuyến vú, sau đó phát triển lan sang mô lân cận, xô đẩy tổ chức tuyến vú bình thường. Xu hướng vượt khỏi mô tuyến vú xâm nhiễm mô xung quanh đến các cấu trúc lân cận như da, làm co rút da, sần da cam, phù nề da, đỏ và loét da. Khi chúng xâm nhiễm đến cân cơ ngực và thành ngực tạo thành một khối cứng.

### ***Giai đoạn lan tràn:***

+ *Theo đường bạch huyết:* Nhờ mạng lưới mạch bạch huyết dày đặc, ung thư vú lan tới các chằng hạch, trong đó hạch nách là vị trí hay gặp do đây là vị trí chính dẫn lưu dịch, bạch huyết của vú, tiếp theo là hạch thượng đòn, rồi đi vào hệ tuần hoàn tĩnh mạch cạnh sống, đám rối này được nối trực tiếp với vú qua mạch máu liên sườn.

+ *Theo đường máu:* Các tế bào ung thư vú có thể di căn đến khắp nơi trong cơ thể, tuy nhiên ung thư vú thường di căn tới xương, phổi, gan, não. Khoảng 20-30% các bệnh nhân có hạch nách âm tính nhưng có di căn xa chúng tỏ di căn theo đường máu là chủ yếu ở các bệnh nhân này. Đôi khi sự lan tràn xảy ra thêm từ hệ tĩnh mạch ở vú, tiêu biểu từ hệ hạch bạch huyết của da dẫn đến lan rộng, xâm lấn thành ngực và sau đó đến màng phổi và phổi. Các tế bào ung thư vú thường di căn rất sớm, nhiều khi tại thời điểm chẩn

đoán được bệnh, không thể phát hiện được các di căn này bằng các phương pháp chẩn đoán hiện có, do vậy vai trò của điều trị toàn thân được đặt ra ngay từ khi bệnh ở giai đoạn sớm.

#### 1.1.2.2. Các giai đoạn của ung thư vú

##### \* Hệ thống xếp giai đoạn TNM

Dưới đây là hệ thống xếp giai đoạn của AJCC(2004). Hiện nay, hầu hết các nghiên cứu trong đó có các nghiên cứu đa quốc gia áp dụng hệ thống xếp giai đoạn này:

##### **T: U nguyên phát**

T<sub>0</sub> Không có u nguyên phát

T<sub>is</sub>(ung thư BM tại chỗ): ung thư biểu mô nội ống, ung thư biểu mô thùy tại chỗ, bệnh Paget núm vú không có u

T<sub>1</sub> U có đường kính lớn nhất  $\leq 2$ cm

T<sub>2</sub> U có đường kính lớn nhất  $> 2$ cm và  $\leq 5$ cm

T<sub>3</sub> U có đường kính lớn nhất  $> 5$ cm

T<sub>4</sub> U xâm lấn thành ngực hoặc da bất kể kích thước (thành ngực gồm xương sườn, cơ gian sườn, cơ răng cưa trước, không tính cơ ngực)

##### **N: Hạch vùng**

N<sub>0</sub> Không di căn hạch vùng

N<sub>1</sub> Di căn hạch nách cùng bên di động

N<sub>2</sub> Di căn hạch nách cùng bên cố định hoặc dính nhau hoặc di căn hạch vú trong cùng bên nhưng không di căn hạch nách.

N<sub>3</sub> Di căn hạch hạ đòn cùng bên có hoặc không kèm hạch nách cùng bên, hoặc di căn hạch vú trong cùng bên kèm di căn hạch nách cùng bên, hoặc di

căn hạch thượng đòn cùng bên có hoặc không kèm hạch nách hoặc hạch vú trong cùng bên

**M: Di căn xa**

$M_0$  Không di căn xa

$M_1$  Có di căn xa

Phân loại có những điểm mới: di căn hạch hạ đòn xếp vào  $N_3$  (trước không đề cập), di căn hạch thượng đòn không xếp  $M_1$  nữa mà thành  $N_3$ . Di căn hạch vú trong trước đây xếp vào  $N_3$ , nay phân ra không kèm đi căn hạch nách ( $N_{2b}$ ) và kèm đi căn hạch nách ( $N_{3b}$ ).

**\* Xếp giai đoạn lâm sàng**

*Bảng 1.1: Phân chia giai đoạn ung thư vú*

<b>GĐ</b>	<b>TNM tương ứng</b>
<b>0</b>	<b>Tis N<sub>0</sub>M<sub>0</sub></b>
<b>I</b>	<b>T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub></b>
<b>IIa</b>	<b>T<sub>0</sub> N<sub>1</sub> M<sub>0</sub></b> <b>T<sub>1</sub> N<sub>1</sub> M<sub>0</sub></b> <b>T<sub>2</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub></b>
<b>IIb</b>	<b>T<sub>2</sub> N<sub>1</sub> M<sub>0</sub></b> <b>T<sub>3</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub></b>
<b>IIIa</b>	<b>T<sub>0</sub> N<sub>2</sub> M<sub>0</sub></b> <b>T<sub>1</sub> N<sub>2</sub> M<sub>0</sub></b> <b>T<sub>2</sub> N<sub>2</sub> M<sub>0</sub></b> <b>T<sub>3</sub> N<sub>1</sub> M<sub>0</sub></b> <b>T<sub>3</sub> N<sub>2</sub> M<sub>0</sub></b>
<b>IIIb</b>	<b>T<sub>4</sub> N<sub>0</sub> M<sub>0</sub></b> <b>T<sub>4</sub> N<sub>1</sub> M<sub>0</sub></b> <b>T<sub>4</sub> N<sub>2</sub> M<sub>0</sub></b>
<b>IIIc</b>	<b>T bất cứ, N<sub>3</sub>, M<sub>0</sub></b>
<b>IV</b>	<b>T bất cứ, N bất cứ, M<sub>1</sub></b>

### **1.1.3. Chẩn đoán ung thư vú**

Hiện tại, ung thư vú được chẩn đoán xác định dựa vào:

- + Lâm sàng: sờ thấy khối u ranh giới tương đối rõ.
- + Cận lâm sàng:

#### **1.1.3.1. Chẩn đoán hình ảnh**

\* **Chụp XQ thường thường:** Có thể phát hiện được khối u, di căn, phát hiện tổn thương xâm lấn sâu hay xâm lấn xương hiện nay đã dùng XQ kỹ thuật số làm tăng độ phân giải nhờ vậy mà làm tăng phát hiện khối u, di căn xương.

\* **Chụp vú:** Là biện pháp duy nhất được chứng minh là có vai trò sàng lọc, nó có thể làm giảm tỷ lệ chết do ung thư vú xuống 30%. Mục đích của chụp vú là tìm ra những tổn thương bất thường của tuyến vú để loại trừ ung thư, từ đó có những chẩn đoán sơ bộ khối u ở vú[5].

\* **Siêu âm:** Qua thực tế lâm sàng và thử nghiệm cho thấy siêu âm trong chẩn đoán tổn thương của tuyến vú có giá trị để phân biệt những tổn thương là nang với những tổn thương đặc của vú. Không nên dùng siêu âm trong sàng lọc vì: Không có khả năng phát hiện sớm, làm tăng kết luận nghi ngờ trong khi không chứng minh được tính chất ác tính[5].

#### **\* PET/CT và PET/ MRI trong chẩn đoán ung thư vú**

**PET:** Positron Emission Tomography-Chụp cắt lớp phát bức xạ positron

**CT:** Computed Tomography-Chụp cắt lớp điện toán

**MRI:** Magnetic Resonance Imaging-Chụp cộng hưởng từ

Kết hợp PET và CT cho hình ảnh kết hợp đồng thời và chồng gộp trong một lần chụp với các ưu điểm của cả PET và CT. PET/CT giúp chẩn đoán bệnh ung thư ở giai đoạn rất sớm, chính xác, tăng độ nhạy, độ đặc hiệu của kỹ

thuật nhờ có được đồng thời hình ảnh cấu trúc giải phẫu rõ nét của CT và hình ảnh chức năng chuyển hóa ở giai đoạn sớm của PET[9].

**\* Ghi hình miễn dịch phóng xạ (Radioimmunoscintigraphy- RIS)**

Nguyên lý: Dùng kháng thể đơn dòng được đánh dấu đồng vị phóng xạ (KTĐD\*) phát tia gama, positron..., kết hợp với kháng nguyên (KN) tương ứng có ở tế bào ung thư tạo ra phức hợp (KN+KTĐD\*), từ đó khối u sẽ trở thành nguồn phát tia phóng xạ, giúp chúng ta ghi được hình ảnh của khối ung thư đặc hiệu. Nhiều loại ĐVPX được dùng trong RIS  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $\text{Tc-}^{99\text{m}}$ ,  $^{18}\text{F}$  [9].

*1.1.3.2. Giải phẫu bệnh học ứng dụng trong chẩn đoán ung thư vú*

Có nhiều phương pháp chẩn đoán ung thư vú nhưng kết quả mô bệnh học vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán xác định ung thư vú.

*1.1.3.3. Hóa sinh học và hóa mô miễn dịch trong chẩn đoán ung thư vú*

Hóa sinh học đóng góp vai trò không nhỏ trong chẩn đoán, tiên lượng và theo dõi điều trị khối u. Bằng việc phát hiện ra nhiều loại dấu ấn ung thư đã giúp cho các nhà lâm sàng có thêm phương tiện chẩn đoán chính xác điều trị kịp thời bệnh ung thư.

**Dấu ấn ung thư:** là một nhóm các chất (enzym, hormon, receptor, protein,...) được các tế bào khối u trực tiếp sản xuất hoặc do các tế bào bình thường sản xuất do tác động kích ứng của các tế bào ung thư, các chất này đi vào vòng tuần hoàn và có thể được sử dụng để chẩn đoán và theo dõi điều trị ung thư. Có rất nhiều dấu ấn ung thư, liên quan đến các giai đoạn khác nhau của sự phát sinh, phát triển ung thư từ mức độ phân tử, rối loạn sinh trưởng tế bào, rối loạn cơ chế tự chủ, đến sinh mạch, xâm nhập, di căn[10]. Các dấu ấn ung thư trong huyết thanh gồm CEA, CA 15-3, và CK-BB. Các dấu ấn từ mô có thể được sử dụng bao gồm các thụ thể estrogen và progesterone, thụ thể của

yếu tố sinh trưởng biểu mô (Epidermal Growth Factor-EGF)..., sự lựa chọn cách điều trị phụ thuộc vào định lượng các dấu ấn trên.

**\*Dấu ấn có bản chất là protein.**

Nhiều protein huyết thanh do tế bào ung thư sản xuất ra lưu thông trong máu đã được sử dụng như dấu ấn ung thư. Dấu ấn là protein thường đặc hiệu hơn dấu ấn là enzym, hormon và dễ phát hiện hơn so với các dấu ấn khác, vì vậy được sử dụng khá phổ biến. Tuy nhiên để chẩn đoán xác định cần phải phối hợp với lâm sàng và các xét nghiệm khác [11].

- **CEA** (Carcino Embryonic Antigen) được Gold và Freedman mô tả lần đầu tiên vào năm 1965, là kháng nguyên ung thư bào thai có bản chất là glycoprotein. CEA được sản xuất trong thời kỳ bào thai đặc biệt ở dạ dày, tụy và gan. Sau khi sinh, CEA chỉ tồn tại với hàm lượng rất ít trong huyết thanh của người bình thường và tăng cao trong một số loại ung thư. CEA được coi là dấu ấn đặc hiệu cho ung thư đại tràng, tuy nhiên CEA còn thấy tăng trong ung thư vú, ung thư đường tiêu hóa, ung thư phổi, ung thư buồng trứng, ung thư tụy và ung thư tuyến tiền liệt, hơn nữa CEA cũng tăng ở người nghiện rượu, viêm ruột, xơ hóa bàng quang (cystic fibrosis) và ở những người hút thuốc lá nặng. Mặc dù CEA không đặc hiệu cho chẩn đoán, nhưng có giá trị tiên lượng và theo dõi điều trị. Sau 35 năm được phát hiện và nghiên cứu, CEA vẫn là một trong những dấu ấn ung thư được sử dụng nhiều nhất, có ích nhất trong ung thư học[10].

- **CA 15-3** (Carbohydrat Antigen) bản chất là một glycoprotein type mucin có ở biểu mô các tế bào tiết và chất tiết người bình thường, không đặc hiệu nhưng nhạy cảm đối với ung thư vú. CA15-3 bình thường có trong huyết thanh người với nồng độ 30 U/ml, CA 15-3 tăng kèm theo tăng phosphatase kiềm trong huyết thanh dự báo khả năng tái phát của ung thư vú. Do vậy CA 15-3 thường được sử dụng để chẩn đoán, đánh giá giai đoạn, tiên lượng, theo dõi điều trị và phát hiện tái phát ung thư vú sau giai đoạn điều trị. CA15-3 có

giá trị cao trong đánh giá kết quả điều trị ung thư vú, CA 15-3 huyết thanh giảm đi là điều trị có hiệu quả, nếu đang giảm lại tăng lên là tái phát[11].

### **\*Dấu ấn có bản chất là thụ thể**

Các thụ thể của tế bào là các cấu trúc protein khu trú trên các màng ngoài của tế bào. Chức năng của thụ thể là nhận biết và gắn đặc hiệu vào các phối tử (ligand) như hormon. Phức hợp phối tử- thụ thể sau đó mở đầu cho một đáp ứng sinh học ở tế bào đích. Có nhiều loại thụ thể khác nhau, mỗi loại thụ thể gắn với một phối tử đặc hiệu khởi đầu cho một đáp ứng tế bào riêng biệt. Các thụ thể có chức năng phù hợp đối với sự điều hòa hoạt động bình thường của tế bào. Sự sản xuất các thụ thể được điều hòa một phần bởi nồng độ của phối tử. Có những thiếu hụt thụ thể do quá trình tổng hợp hoặc suy giảm chức năng của thụ thể do di truyền, hoặc do sự rối loạn tự miễn dịch (kháng thể trực tiếp chống lại thụ thể). Rất nhiều khối u ác tính gây những biến đổi về chức năng và số lượng thụ thể nên các thụ thể có thể được sử dụng như dấu ấn ung thư. Các dấu ấn có bản chất là thụ thể thường được sử dụng trong chẩn đoán và theo dõi điều trị là các thụ thể estrogen và progesteron, thụ thể của yếu tố sinh trưởng biểu mô...

### **+Thụ thểestrogen và progesterone (ER và PR)**

Estrogen có vai trò quan trọng trong điều hòa sự tăng sinh và biệt hóa của biểu mô vú bình thường. Estrogen giúp phát triển hệ thống mô đệm tuyến vú, phát triển hệ thống các ống bài xuất nhỏ và làm tăng mô mỡ trong tuyến vú. Progesteron thúc đẩy sự phát triển các tiểu thùy, kích thích các tế bào chế tiết tăng sinh. Để xác định những bệnh nhân bị ung thư vú chắc chắn có đáp ứng với điều trị nội tiết không, người ta phải xác định xem các tế bào ung thư đó có ER và PR dương tính không[12].ER và PR được nghiên cứu rộng rãi trên 10 năm qua. Người ta biết rằng 50-85% các khối u nguyên phát và 45-55% các u di căn có ER dương tính. Trên 60% bệnh nhân ung thư vú có ER dương tính, đáp ứng tốt với điều trị nội tiết so với những bệnh nhân có ER âm tính là 8%. Sự có mặt của PR làm tăng đáp ứng điều trị nội tiết lên

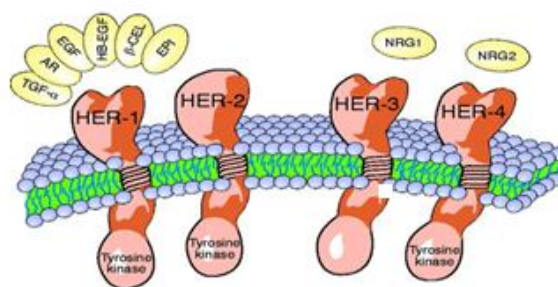


khoảng 80%. Vai trò quan trọng nhất của việc đánh giá ER và PR là giúp lập kế hoạch điều trị[13].

#### + Thụ thể yếu tố phát triển biểu mô

**-Her-2/neu:** là một tiền gen nằm trên nhiễm sắc thể 17, là một trong bốn thành viên của họ các yếu tố phát triển biểu mô, có vai trò như yếu tố phát triển biểu mô. Bằng nhuộm hóa mô miễn dịch, người ta xác định được sự bộc lộ gen này chiếm khoảng 1/3 số trường hợp ung thư biểu mô tuyến vú. Khuếch đại gen Her-2/neu liên quan đến giảm tỷ lệ sống thêm không bệnh tật và tỷ lệ sống thêm chung, đặc biệt trong nhóm bệnh nhân hạch nách dương tính, mặc dù nó không phải là yếu tố tiên lượng độc lập[13].

**EGFR:** là thụ thể của các yếu tố sinh trưởng biểu mô EGF và yếu tố biến đổi sinh trưởng tế bào  $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ - TGF- $\alpha$ ). Họ thụ thể của các yếu tố sinh trưởng gồm các thụ thể: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3/c-neu (ErbB-3), HER4/c-neu (ErbB-4). Sự vắng mặt của thụ thể này tỷ lệ thuận với một đáp ứng tốt với tamoxifen. Nồng độ cao của thụ thể có liên quan đến sự tái phát khối u và sự sống sót của bệnh nhân ung thư. Thụ thể của yếu tố phát triển biểu mô là một glycoprotein về mặt cấu trúc giống như thụ thể của yếu tố phát triển chuyển dạng có mặt trên các tế bào biểu mô vú bình thường và các mô khác với một nồng độ thấp[14].



**Hình 1.1:** Sơ đồ nhóm thụ thể của yếu tố tăng trưởng thượng bì (nguồn

*Ross. J.S, oncologist [15])*

Hóa sinh học và hóa mô miễn dịch đã góp phần không nhỏ trong chẩn đoán và theo dõi điều trị ung thư vú cùng với sự phát triển ngày càng hiện đại về kỹ thuật sinh học phân tử nhiều phương pháp phát hiện tế bào ung thư đã được thiết lập và ngày càng hoàn thiện giúp cho các nhà lâm sàng có thêm vũ khí phòng chống bệnh ung thư. Một trong những tiến bộ đó là phát hiện tế bào ung thư trong máu. Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã cho thấy sự di căn ung thư là một quá trình nhiều bước gọi là quá trình di căn, trong đó sự xâm nhập của các tế bào ung thư vào mạch máu gọi là các TBUTM, đây là một giai đoạn hết sức quan trọng được coi là giai đoạn vi mô di căn ẩn – (Mx). TBUTM có thể được đưa đến rất nhiều cơ quan tuy nhiên quá trình di căn thực sự nhìn thấy được ở mức vĩ mô nhiều khi là ngẫu nhiên[16].

## **1.2. TBUTM và vai trò của *Survivin* mRNA, *hMAM* mRNA trong phát hiện TBUTM**

### **1.2.1. Đặc điểm TBUTM**

#### **❖ Đặc tính sinh học của các TBUTM:**

TBUTM được phát hiện trong máu của bệnh nhân ung thư được coi là dấu hiệu phát tán của bệnh. Các tế bào này mang đặc tính của tế bào ung thư nguyên phát, mang một số gen đặc trưng khối u mà người bình thường không thấy biểu hiện [17]. Khi di chuyển trong máu các tế bào này tồn tại ở dạng không biệt hóa, nhưng nó sẽ phân chia khi đến một tổ chức thích hợp dưới sự hiện diện của các tác nhân đặc thù[18]. Theo quan niệm trước đây di căn ung thư vú xảy ra ở giai đoạn muộn khi có khối u nguyên phát rõ ràng, nhưng trong những năm gần đây các nhà khoa học đã sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử chứng minh được quá trình di căn ung thư xảy ra ở giai đoạn rất sớm ngay từ khi mới hình thành khối u[19]. Trong những con đường di căn của khối u thì di căn theo đường máu chiếm 80%, các tế bào khối u trong máu gọi tế bào ung thư di chuyển (Circulating Tumor Cell), vì các tế bào này xuất hiện sớm nên có thể coi là dấu ấn chẩn đoán ung thư ngay từ giai đoạn rất sớm. Sự xuất hiện và di chuyển của các khối u vào máu ngoại vi bao gồm nhiều giai đoạn. Ban đầu các tế bào ung thư phát triển nhanh, cần nhiều oxy nên phát triển

xâm lấn. Các tế bào này có mật độ thụ thể trên bề mặt thấp dẫn tới sự giảm liên kết với nhau và chống lại quá trình chết theo chương trình. Kết quả là các tế bào này có khả năng sống sót cao hơn và dễ dàng xâm nhập vào máu. Sau khi vào máu, các TBUTM không còn khả năng biệt hóa và di chuyển tới các cơ quan khác. Trên mô hình nghiên cứu ung thư ở động vật, hiện tượng di căn chỉ xảy ra khi phát hiện 1/10.000 tế bào bạch cầu[20].

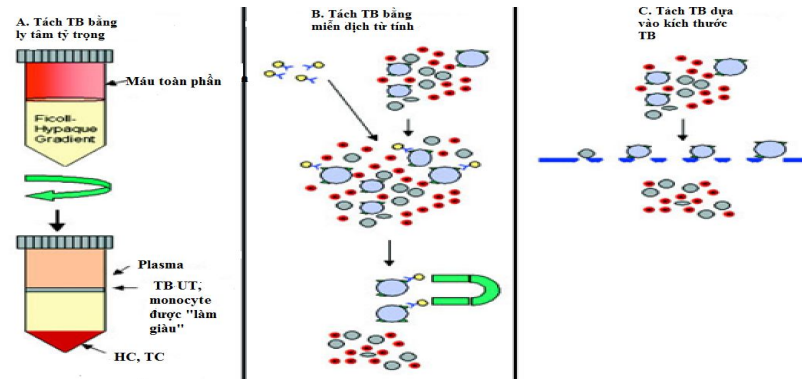
#### ❖ **Vai trò TBUTM trong chẩn đoán và điều trị**

Những nghiên cứu gần đây đã đưa ra những kết luận quan trọng về vai trò của TBUTM trong chẩn đoán lâm sàng: (i) TBUTM là các tế bào liên quan đến quá trình di căn và phát triển của bệnh. Nó là yếu tố hữu ích dự đoán khả năng di căn đến cơ quan khác đặc biệt là gan và phổi. Việc phát hiện sớm ở giai đoạn đầu sẽ làm giảm tỷ lệ tử vong bằng cách áp dụng phương pháp điều trị thích hợp trước khi có biểu hiện di căn thực sự trên lâm sàng. Phát hiện TBUTM từ các bệnh nhân có thể giúp cho phân tích đặc tính phân tử của các tế bào, thiết lập một xét nghiệm xâm lấn tối thiểu cho dự đoán của di căn và tối ưu hóa hơn nữa cho điều trị[21]. (ii) TBUTM có thể theo dõi điều trị vì khi nó có thể sống sót sau hóa trị liệu thì đó là bằng chứng chỉ ra sự thất bại của các can thiệp điều trị. Hơn nữa phát hiện TBUTM trong máu sau phẫu thuật cắt bỏ khối u nguyên phát và theo dõi sự xuất hiện của nó trong quá trình theo dõi sau điều trị sẽ phát hiện sớm quá trình tái phát, nó có tính đặc hiệu cao nên được coi là yếu tố chiến lược hơn so với các dấu ấn ung thư huyết thanh cổ điển. (iii) Kết quả phân tích TBUTM giúp ích cho việc lựa chọn phương thức điều trị thích hợp, khi phát hiện TBUTM trong thời kỳ đầu có thể phải tiến hành điều trị toàn thân thay cho hoặc kèm với điều trị tại chỗ. Vì ý nghĩa quan trọng như vậy nên kỹ thuật phát hiện TBUTM được coi là xét nghiệm thường xuyên trong suốt quá trình điều trị và sau điều trị[16].

#### **1.2.2. Kỹ thuật phát hiện TBUTM trên thế giới**

TBUTM tồn tại rất thấp trong máu và rất khó phân biệt được với các tế bào bạch cầu bình thường nên để tăng độ nhạy xét nghiệm TBUTM thì trước tiên phải “làm giàu” tế bào và hạn chế tối đa sự mất TBUTM trong quá trình

làm kỹ thuật[22]. Làm giàu tế bào dựa vào: tính chất vật lý (kích thước, biên dạng, mật độ, và điện tích), đặc điểm sinh học (biểu hiện protein bề mặt và khả năng xâm nhập). Có nhiều cách để làm giàu tế bào dựa vào tỷ trọng, kích thước đặc điểm của từng loại tế bào. Người ta có thể “làm giàu” tế bào trước rồi tiến hành kỹ thuật phát hiện hoặc lồng ghép vừa “làm giàu” đồng thời với phát hiện trong cùng một quá trình.

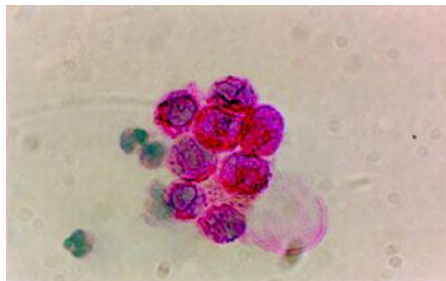


**Hình 1.2: Sơ đồ “làm giàu” TBUTM**

(nguồn Noha Gerge 2010[16])

Có 2 cách phát hiện sự có mặt của TBUTM:

+ Trực tiếp: Không có sự phá hủy màng tế bào, đảm bảo tính toàn vẹn tế bào, cần thiết bị chụp đặc biệt.



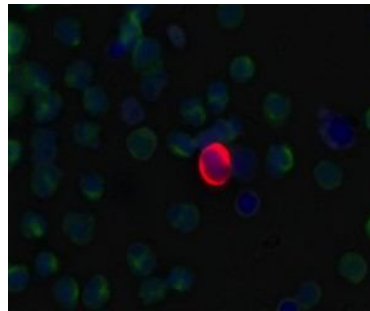
**Hình 1.3: Hình ảnh tế bào ung thư di chuyển phát hiện dưới kính hiển vi điện tử**

(nguồn MARIJA BALIC, National Medical Journal of India 2005[23]).

+ Gián tiếp: Phát hiện gen, thụ thể..., protein có trong tế bào ung thư ví mà có thể phân biệt được với tế bào bình thường.

### Một số phương pháp phát hiện TBUTM

*1.2.2.1. Fibre-Optic scanning technology:* Đây là một hệ thống tự động hiển vi kỹ thuật số siêu tốc độ và áp dụng kỹ thuật quét laser phát hiện tế bào hiếm gặp. Quang học in laser được sử dụng để có thể phát hiện tới hơn 300.000 tế bào mỗi giây. Hệ thống này giúp phát hiện các tế bào đánh dấu miễn dịch huỳnh quang nhanh hơn 500 lần so với kỹ thuật kính hiển vi tự động thông thường. Điều này tăng độ nhạy đạt được ~ 98% trong việc phát hiện TBUTM sau khi tách khỏi máu toàn phần[24].



**Hình 1.4: Tế bào ung thư vú lưu hành trong máu quét laser**

(nguồn Scripps Research Institung)

#### *1.2.2.2. CellSearch*

Sự phát triển của một hệ thống làm giàu và nhuộm miễn dịch từ tính tự động cho TBUTM (CellSearch™). Hiện nay, Cục Quản lý Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ phê duyệt hệ thống EpCAM dựa trên CellSearch® tự động được ứng dụng rộng rãi trong các bệnh viện và được coi là “tiêu chuẩn vàng” cho tất cả các phương pháp phát hiện TBUTM mới [25],[26],[27]. Vào giữa những năm 1970, một phát triển quan trọng cho việc phát hiện TBUTM là trong khi *EpCAM* được thể hiện ở mức độ khác nhau trong tế bào biểu mô ung thư thì không thấy trong các tế bào máu. Với kỹ thuật này TBUTM thường được xác định dựa trên sự biểu hiện của các kháng thể dòng biểu mô (protein cytokeratins hiện diện trong các tế bào biểu mô) hoặc *EpCAM* (phân tử kết dính tế bào biểu mô), của bạch cầu đánh dấu thông thường (CD45) và/hoặc kháng nguyên khối u cụ thể (*MUC1*, *HER-2* và/hoặc những yếu tố

khác)[28].Mức cắt của  $\geq 5$  tế bào trong 7,5 ml máu là ngưỡng đặt ra sau khi sáu nghiên cứu trên 841 bệnh nhân ung thư vú trên toàn thế giới được thực hiện đã chứng minh đây là yếu tố tiên lượng liên quan đến sự sống còn độc lập với bất kể mô học, thụ thể nội tiết tố và tình trạng *HER2/neu*[29]. Nghiên cứu 604 bệnh nhân ung thư vú, Franken 2012 [30] cho kết quả có 15% TBUTM ở khối u lành tính, 19% ở khối u tại chỗ, 16% ở bệnh nhân ung thư vú giai đoạn I, 18% ở giai đoạn II, 31% giai đoạn III. Điều đó chứng tỏ TBUTM có thể phát hiện được ở giai đoạn rất sớm của bệnh ung thư vú. Ngưỡng 5 TBUTM được rất nhiều nghiên cứu trên thế giới lựa chọn là ngưỡng tiên lượng bệnh ung thư vú[31].

#### 1.2.2.3. CTC chip

Đây là một đại diện cho công nghệ vi mạch trên nền một thiết bị vi lỏng được gọi là “CTC chip” có hiệu quả cao nhằm phân lập TBUTM. Con chip này được tạo thành từ một loạt các 78.000 microspots có chứa kháng thể *EpCAM*. Toàn bộ máu được bơm qua chip cho phép các tế bào *EpCAM* dương dính kèm vào microposts, sau đó được phát hiện bởi một máy ảnh. Sử dụng phương pháp này, Nagrath và cộng sự đã thành công trong việc cô lập TBUTM ở 115/116 (99%) bệnh nhân. Dựa trên những kết quả này, độ nhạy của chip là 99,1% và độ đặc hiệu 100%[16].

#### 1.2.2.4. Adnatest

Phương pháp này sử dụng hai kháng thể kháng *MUC1* và *EpCAM*. Phương pháp này làm tăng năng suất và độ đặc hiệu của TBUTM phát hiện được. Adnatest có độ đặc hiệu  $> 90\%$  và độ nhạy là 2 tế bào mỗi 5ml máu toàn phần[16]. Nhưng không phải tất cả TBUTM chứa cả *MUC1* và *EpCAM*, do đó phương pháp này thường dùng để làm giàu tế bào sau đó kết hợp với PCR để phát hiện. Hiện nay đã sử dụng AdnaTest BreastCancer™ kit (AdnaGen AG, Langenhagen, Đức) phát hiện sự sao chép mRNA của *MUC1*, *HER2* và *EpCAM* kết quả cho thấy độ nhạy của Adna Test

Breast Cancer™ tương đương với CellSearch™ trong việc phát hiện từ 5 tế bào ung thư trở lên[32]. AdnaTest Breast Cancer còn phát hiện 60% di căn tủy xương ở bệnh nhân nam ung thư vú ở giai đoạn sớm[33].

#### ***1.2.2.5.Telomesca®***

Đây là một sao chép vector adeno virus vào đoạn telomere của tế bào ung thư. Telomesca là một hệ thống phát hiện TBUTM đã được đưa ra bởi hai công ty dược phẩm trong năm 2009. Telomere là những trình tự lặp lại của DNA ở các đầu mút của nhiễm sắc thể. Mặc dù cũng được cấu thành từ các đơn phân nucleotide, nhưng telomere không mã hóa cho protein. Telomere có nhiệm vụ bảo đảm sự bền vững của các chromosome, chống lại thoái hóa tế bào, chống lại sự tái tổ hợp sai lệch và có vai trò điều hòa gen, chúng bảo vệ các nhiễm sắc thể trong quá trình phân bào, giữ cho các nhiễm sắc thể không dính vào nhau. Rối loạn chức năng telomere làm thúc đẩy tạo nên nhiễm sắc thể không ổn định về số lượng và cấu trúc, đây chính là cơ sở để phát triển khối u. Ở các TBUTM, người ta có thể thấy các cụm telomeric khác thường có liên quan đến thay đổi trong không gian hạt nhân. Phát hiện thay đổi kiến trúc hạt nhân do sự co cụm telomere có liên quan đến bất thường nhiễm sắc thể và là thước đo giai đoạn bệnh[34]. Để phát hiện bất thường telomere có thể dùng các phương pháp: (i) Sử dụng công nghệ hình ảnh: Chụp 3D telomere bằng hệ thống TeloView phát hiện cấu hình hạt nhân tế bào bình thường so với tế bào ung thư. (ii) Gắn với đoạn gen của Adenovirus: Vector *adenovirus* là một trong những phương thức chuyển gen trực tiếp hứa hẹn nhất *in vivo*, trên người, *adenovirus* là những virus DNA, thuộc họ *Parvoviridae* không có vỏ. Sau khi ủ với các tế bào ung thư, virus có thể tái tạo đoạn phiên mã của telomere qua plasmid có mang gen chuyển sẽ kết hợp các điểm đánh dấu GFP của đoạn telomere. Sau đó tiếp tục phân tích sàng lọc bằng southern blot, hoặc PCR. Gen chuyển sẽ xác định được vector tái tổ hợp mong muốn[35].

### 1.2.2.6. Kỹ thuật acid nucleic

#### ❖ Kỹ thuật PCR:

PCR được sử dụng để khuếch đại một chuỗi DNA (DNA đích). Chuỗi này có thể là gen, một phần của gen, hay chuỗi không mã hóa. PCR dựa trên hoạt động của enzym DNA polymerase. Khi DNA polymerase tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch khuôn cần có mỗi chuyên biệt. Mỗi là những đoạn DNA ngắn có thể bắt cặp chuyên biệt với một đầu của mạch khuôn và DNA polymerase nối dài mỗi tạo một mạch DNA mới. Qua mỗi chu kỳ nhiệt, một DNA đích đã được nhân thành hai bản sao, và nếu chu kỳ được lặp lại liên tục 25-35 lần thì từ 1 DNA đích sẽ được khuếch đại lên  $2^{25}$  đến  $2^{35}$  bản sao, tức là hàng tỷ bản sao[36].

#### ❖ Kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transcription-PCR):

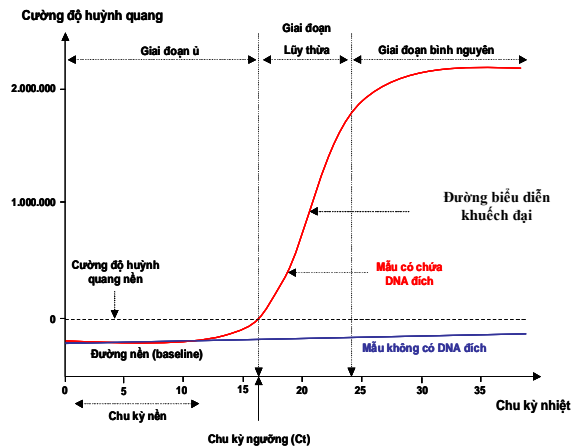
RT-PCR (hay còn gọi là phiên mã ngược PCR) là một kỹ thuật sử dụng RNA mạch đơn làm khuôn để tổng hợp nên chuỗi DNA bổ sung (cDNA), gồm có 2 giai đoạn: (i) Giai đoạn thứ nhất tổng hợp cDNA (complementary DNA) từ RNA dưới tác dụng của enzym phiên mã ngược và các mồi oligo-(T) hoặc các mồi ngẫu nhiên. (ii) giai đoạn nhân bản gen quan tâm từ cDNA bằng PCR với các mồi đặc hiệu. Nguyên liệu của quá trình này là dNTP với sự tham gia của enzym sao mã ngược MMLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase*) và các thành phần khác như: Taq polymerase, dung dịch đệm PCR, mồi ngẫu nhiên (Random primer), chất ức chế enzym RNA (*RNAase inhibitor*), protease inhibitor, nước cất.

#### ❖ RealTime PCR:

Là kỹ thuật PCR mà kết quả khuếch đại DNA đích hiển thị tại mỗi chu kỳ nhiệt của phản ứng. Thành phần của Realtime PCR: Mồi, Taq polymerase, dNTP,  $MgCl_2$ , PCR buffer, chất phát huỳnh quang. Chất phát huỳnh quang thường dùng: Màu huỳnh quang chèn vào sợi đôi DNA (SYBR Green). Màu huỳnh quang có ái lực rất cao khi có hiện diện của sợi đôi DNA. Ái lực này là do khả năng chèn màu vào sợi đôi DNA và làm cho sợi đôi phát ra ánh sáng huỳnh quang khi nhận được nguồn sáng kích thích. Probe (taqman probe hoặc



beacon probe): Một đoạn oligonucleotide sợi đơn có trình tự bắt cặp bổ sung với sản phẩm khuếch đại từ DNA đích. Khi có sản phẩm khuếch đại đặc hiệu thì có sự bắt cặp của probe lên sản phẩm khuếch đại và làm phát huỳnh quang khi nhận được nguồn sáng kích thích. Theo nghiên cứu so sánh giữa Cellsearch, Adna Test Breast Cancer, Realtime RT-qPCR, các nhà khoa học đã chứng minh bệnh nhân ung thư vú di căn phát hiện được bằng hệ thống CellSearch là 36%, 22% với AdnaTest, 26% sử dụng RT-PCR cho *CK-19* và 54% sử dụng RT-PCR cho *hMAM*. Mẫu có nhiều khả năng dương tính cho ít nhất một mRNA đánh dấu bằng kỹ thuật RT-PCR hơn so với cách sử dụng hệ thống CellSearch ( $p = 0,001$ ) hoặc AdnaTest Breast Cancer ( $p < 0.001$ ). Điều này gợi ý rằng kỹ thuật RT-PCR và cao hơn là Realtime PCR là kỹ thuật nhạy cảm nhất để phát hiện TBUTM hiện nay [37]. Chúng ta cần lưu ý đến một thông số rất quan trọng, đó là chu kỳ ngưỡng (Ct, threshold cycle). Ct phụ thuộc vào số lượng bản DNA đích ban đầu có trong phản ứng. Ct càng thấp thì số bản DNA đích có trong mẫu thử ban đầu càng lớn và ngược lại. Dựa vào đặc điểm này, có thể xác định được số lượng bản DNA đích có trong mẫu thử ban đầu, đây là điểm khác biệt cơ bản so với PCR truyền thống [38]. Realtime PCR có ưu điểm chính so với PCR truyền thống là do các phản ứng được chạy và số liệu được đánh giá trong một hệ thống tube đóng kín, nên các cơ hội nhiễm bẩn được giảm thiểu và sự cần thiết của các thao tác hậu khuếch đại được loại bỏ [36],[39]. Có nhiều nghiên cứu đã đưa ra các multigen đặc hiệu cho ung thư vú và độ nhạy, độ đặc hiệu sẽ tăng lên khi kết hợp nhiều gen [40] và TBUTM phát hiện bởi Realtime PCR không thua kém phương pháp phát hiện khác [41]. Để cải thiện độ đặc hiệu kỹ thuật Realtime RT-qPCR được phát triển bổ xung cho các phản ứng PCR [42]. Có nhiều gen ung thư được chọn làm cơ sở để phát hiện tế bào ung thư. Trong đó *hMAM* và *survivin* là gen có độ nhạy và độ đặc hiệu cao để phát hiện tế bào ung thư.

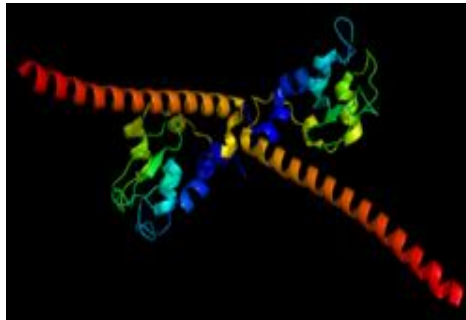


**Hình 1.5: Biểu đồ khuếch đại của phản ứng Realtime PCR**

### 1.2.3. Phát hiện tế bào ung thư vú trong máu bằng nhân bản các mRNA của *hMAM* và *survivin*

#### 1.2.3.1. *Survivin*

##### ❖ Cấu trúc gen *survivin*

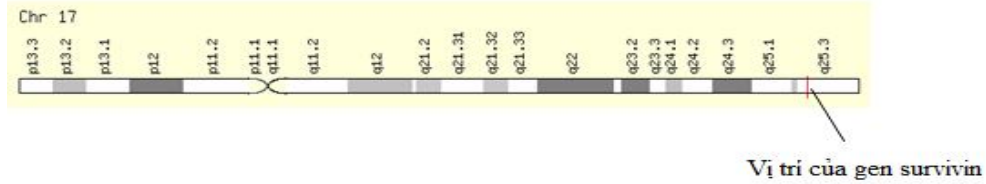


**Hình 1.6: Cấu trúc phân tử protein *survivin***

(nguồn Gene Cards- Baculoviral IAP Repeat Containing 5[43])

*Survivin* là thành viên thuộc nhóm các protein ức chế sự chết theo chương trình của tế bào (IAP) và điều hòa phân chia tế bào. *Survivin* được phát hiện vào năm 1997 từ thư viện bộ gen của người. Gen *survivin* có chiều dài 15 kb, nằm ở vị trí NST 17q25. DNA *survivin* có cấu trúc mở gồm 426 nucleotide mã hóa cho protein gồm 142 aa với TLPT vào khoảng 16,3 kDa. *Survivin* ban đầu được phát hiện chỉ trong tuyến ức trưởng thành bình thường và nhau thai, tuy nhiên các nghiên cứu tiếp theo sử dụng phương pháp hiện đại hơn đã cho thấy nhiều mô lớn thể hiện *survivin* mặc dù ở mức độ thấp hơn so với các tế bào ung thư. Mức độ thấp của *survivin* trong các mô

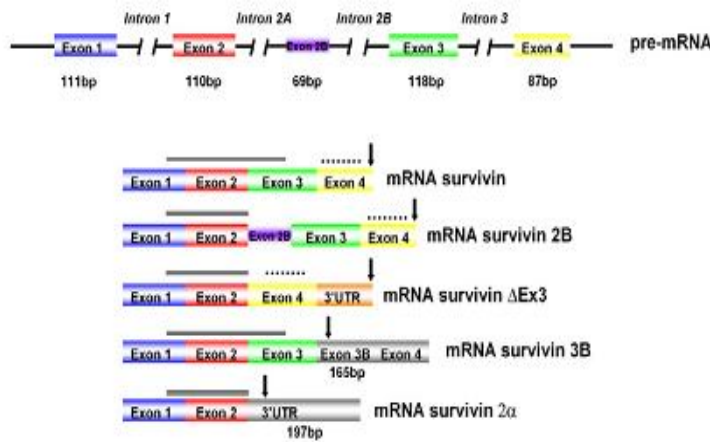
bình thường tác động lên các cytokine cho thấy *survivin* có thể có vai trò sinh lý trong việc điều chỉnh sự phát triển và tồn tại của tế bào[44], [45].



**Hình 1.7: Sơ đồ NST 17 và vị trí của gen *survivin***

(nguồn Gene Cards- Baculoviral IAP Repeat Containing 5[43])

Gen *survivin* còn có thêm các loại biến thể ghép nối



**Hình 1.8: Mô hình *survivin* mRNA tiền thân tạo thành mRNA trưởng thành với 5 biến thể ghép nối**

*Survivin 2A* có exon 1, exon 2 và 197 bp của intron 2; *survivin Δ Ex3* thiếu exon 3; *survivin 2B* giữ lại 1 phần intron 2 là exon 2B; *survivin 3B* giữ lại intron 3 là exon 3B; *survivin 2B + 32* kết hợp thêm exon 2B và 32 nucleotide từ intron[45]. Ngoài *survivin*, biến thể ghép nối *survivinΔ Ex3* là những gen có biểu hiện cao nhất ở ung thư vú[46]

#### ❖ Vai trò của *survivin*

*\*Vai trò ức chế sự chết theo chương trình tế bào của *survivin**

*Survivin* đóng vai trò quan trọng ngăn chặn tế bào chết theo chương trình bằng cách trực tiếp hay gián tiếp ức chế sự hoạt hóa *caspase 3* và *7*. *Caspases* (viết

tất của *cysteine-aspartic protease*) là enzym *protease* dạng *cysteine-aspartic*, một trong những yếu tố chính tham gia vào quá trình apoptosis. *Caspases* có vai trò quan trọng trong quá trình apoptosis bằng cách phá hủy những enzym nhân đôi và enzym sửa chữa DNA, hoạt hóa những enzym để cắt DNA thành những mảnh nhỏ giống nhau, phá vỡ cấu trúc protein trong nhân. Sự chết tế bào bao gồm chết bệnh và chết tự nhiên. Trường hợp bệnh lý, những tế bào không được cung cấp máu có thể bị trương lên, màng tế bào bị nứt, rách và dẫn đến tế bào vỡ tung ra. Tuy nhiên trong một số trường hợp khác, những tế bào không bị trương lên mà teo lại, màng tế bào vẫn còn nhưng sần sùi và nhân thường kết đặc lại, tế bào ở dạng này gọi là apoptosis. Apoptosis xảy ra một cách bình thường như là một phần trong chương trình hoạt động sống của tế bào. Apoptosis là một quá trình sinh lý đảm bảo sự sinh trưởng và phát triển hài hòa trong thời gian phát triển phôi và bảo vệ cơ thể, thay thế mô ở những cơ thể trưởng thành[47]. Quá trình này khởi đầu bằng sự làm thủng tế bào sau đó phá vỡ những mối liên hệ tế bào - tế bào, tế bào co tròn lại, màng nội bào và các bào quan cô đặc lại hơn trong tế bào chất. Đáng chú ý là các bào quan vẫn còn nguyên vẹn nên chúng vẫn thực hiện các chức năng của chúng trong thời gian đầu các thành phần tế bào chất không bị rò rỉ ra khỏi màng tế bào vì vậy đáp ứng viêm không được tạo ra. Trong nhân, chất nhiễm sắc cô đặc tối đa tạo thành hình liềm bao quanh màng nhân. *Endonuclease* tách chính xác DNA cho ra những mảnh vỡ của đôi base. Trong quá trình này nhân bắt đầu vỡ ra thành từng mảnh nhỏ và tế bào cũng tự tách ra thành từng mảnh nhỏ còn nguyên vẹn, quá trình thực bào được bắt đầu, một tế bào mới thay thế cho tế bào cũ sau vài giờ. Khi quá trình apoptosis không xảy ra hoặc bị ức chế, tế bào sẽ không bị phá hủy bởi sự chết theo chương trình và tế bào sẽ phân chia, tạo thành các tế bào con với DNA bị tổn thương. Điều này là một cơ chế dẫn đến sự phát sinh ung thư[48].

### **\*Vai trò của *survivin* trong phân chia tế bào**

Survivin có vai trò điều hòa sự phân chia tế bào ở pha G<sub>2</sub>/M. Trong chu kỳ tế bào, *survivin* được phát hiện ở phần tâm ở kỳ đầu/kỳ giữa và có ở vùng giữa sợi thoi vô sắc ở kỳ sau/kỳ cuối, nhưng không phát hiện được vào thời điểm kết thúc kỳ cuối[49]. Một nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng *survivin* tồn tại ở tâm động cho đến kỳ giữa, sau đó đến phần giữa của thoi vô sắc vào kỳ sau và tách về phía hai cực ở kỳ cuối nguyên phân và phân bào giảm nhiễm. *Survivin* được cho là nằm trong nhóm protein vận chuyển nhiễm sắc thể, có nhiệm vụ vận chuyển NST đến trung tâm của tế bào ở kỳ giữa và có vai trò quan trọng trong quá trình phân bào giảm nhiễm và sự chuyển động của NST trong phân bào nguyên phân[50].

### **\* Vai trò của *survivin* trong tăng sinh mạch**

Cơ chế tăng sinh mạch của *survivin* đóng góp vào việc bảo tồn tính toàn vẹn của vi cấu trúc hình ống và ức chế apoptosis ở tế bào nội mạch, làm cho tế bào này có khả năng tồn tại và chức năng bảo vệ tế bào ung thư.

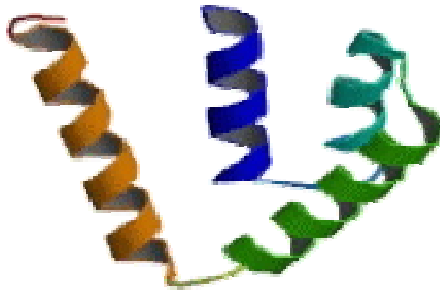
#### **❖ *Survivin* trong ung thư**

*Survivin* là chất ức chế quá trình apoptosis, được thể hiện rất cao ở hầu hết các bệnh ung thư và sự có mặt của nó liên quan đến tình trạng kháng với hóa trị liệu, tăng tái phát khối u, và sự sống còn của bệnh nhân ngắn hơn. Tuy nhiên, có nhiều bằng chứng cho thấy rằng *survivin* được thể hiện trong các tế bào trưởng thành bình thường, tế bào tạo máu đặc biệt là tế bào máu nguyên thủy, tế bào lympho T, bạch cầu đa nhân trung tính và các tế bào nội mô mạch máu, với một lượng nhất định *survivin* có thể điều chỉnh sự phát triển và sinh tồn của tế bào, khi có sự phá vỡ cân bằng lượng protein *survivin* được sản xuất ra quá nhiều sẽ dẫn đến sự phát triển hỗn loạn của tổ chức mô[51], [52]. Hiểu rõ vai trò của *survivin* trong tế bào bình thường so với các tế bào ác tính là rất quan trọng trong việc xác định chiến lược phá vỡ *survivin* trong tế bào ung thư có hiệu lực tối thiểu trên các mô bình thường làm cho điều trị antisurvivin có hiệu quả tối ưu nhất [44]. *Survivin* được thể hiện trong hầu hết các ung thư và có giá trị tiên lượng: Biểu hiện *survivin* mạnh được quan sát

thấy trong đại đa số các bệnh ung thư bao gồm ung thư thực quản, ung thư phổi, ung thư buồng trứng, ung thư hệ thống thần kinh trung ương, ung thư vú, ung thư đại trực tràng, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tuyến tụy, ung thư thanh quản, ung thư tử cung, ung thư tế bào gan, ung thư thận và sarcomamô mềm. Trong tế bào ung thư, *survivin* cao thường gắn liền với nâng cao chỉ số tăng sinh, giảm mức độ apoptosis, sức đề kháng với hóa trị liệu, và tăng tỷ lệ tái phát khối u [53]. Nghiên cứu hồi cứu cho thấy có mối tương quan giữa *survivin* với sự sống còn của bệnh nhân trong hầu hết các nghiên cứu. Xác định *survivin* như là một chỉ số tiên lượng xấu, độc lập, quan trọng của bệnh nhân với hầu hết các loại khối u. Dữ liệu lâm sàng cho thấy rằng sự mất đoạn của các biến thể ghép nối *survivin* 2B, mà dường như không có hoạt động anti-apoptosis có liên quan với sự tiến triển của khối u. *Survivin* ΔEx3 chiếm ưu thế hơn 2B ở những bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu lymphoblastic cấp tính. Hai biến thể *survivin* nối bổ sung, *survivin* 2α và *survivin* 3B, đã được xác định là đối kháng chức năng *survivin*, cho thấy *survivin* 2α và *survivin* 3B có thể thay đổi hoạt động của chức năng kháng apoptosis của *survivin* trong tế bào ung thư [44]. Gần đây, người ta đã tìm thấy đột biến trong các promoter *survivin* tương quan với biểu hiện quá mức của *survivin* mRNA trong tế bào ung thư. Các cơ chế *survivin* phát triển tế bào ung thư chưa được hiểu rõ, tuy nhiên *survivin* có thể điều chỉnh quá trình apoptosis, chu kỳ tế bào, hay thông qua sự tương tác vật lý với chức năng sốc nhiệt protein 90, SMAC/Diablo, liên kết với X chất ức chế protein apoptosis, *p21 WAF1/Cip*, *CDK4*, *cdc2*, yếu tố hạt nhân  $\kappa B$ , bộ chuyển đổi tín hiệu và kích hoạt phiên mã-3, hoặc *p53*. Điều quan trọng là *survivin* không tìm thấy trong ty thể của các tế bào bình thường, như vậy *survivin* ty thể là độc quyền liên quan đến chuyển đổi khối u. Đánh giá liên tục của sự khác biệt về cơ chế hoạt động của *survivin* giữa bệnh ung thư và tế bào bình thường có thể sẽ là minh chứng quan trọng đối với sự phát triển của phương pháp điều trị anti-*survivin* chọn lọc và giảm độc hại ở mức tối thiểu [44].

#### 1.2.3.2. Human mammaglobin (hMAM)

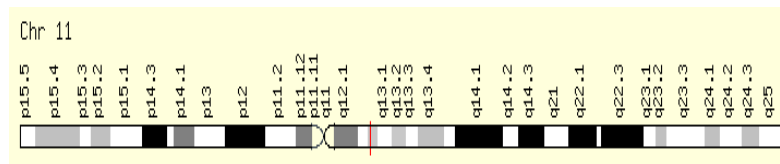
### ❖ Vị trí cấu trúc gen *hMAM*



**Hình 1.9: Cấu trúc phân tử protein *hMAM***

(theo Watson, Oncogene 1998[54])

*Mammaglobin* là thành viên của họ uteroglobin và lần đầu tiên được mô tả năm 1996 bởi Watson và Fleming. Cho đến nay người ta đã phát hiện 23 thành viên thuộc siêu họ ung thư uteroglobin, trong đó 9 thành viên được phát hiện ở người. Người ta quan tâm tới 2 thành viên mammaglobin là *MammaglobinB* mã hóa bởi gen *SCGB2A1* (*secretoglobinB2A1*), biểu hiện cao ở ung thư buồng trứng[55], [56]. *MammaglobinA* (thường gọi là *hMAM*) được mã hóa bởi một gen *SCGB2A2*, biểu hiện cao ở ung thư vú[57]. *SCGB2A2* nằm trên nhiễm sắc thể 11q12.2 và tổng hợp nên glycoprotein gồm 93aa, có TLPT 10,5kDa. *SCGB2A2* được phát hiện lần đầu tiên ở tiền liệt tuyến của chuột và sự xuất hiện của nhóm protein này có liên quan đến hormon steroid. Protein này là một tetramer bao gồm 3 tiểu phần rPSC, rPSC2 và rPSC3. Trong 3 tiểu phần này thì rPSC3 có liên quan nhiều đến androgen thúc đẩy sự phát triển của tiền liệt tuyến và các khối u ở vú[54].

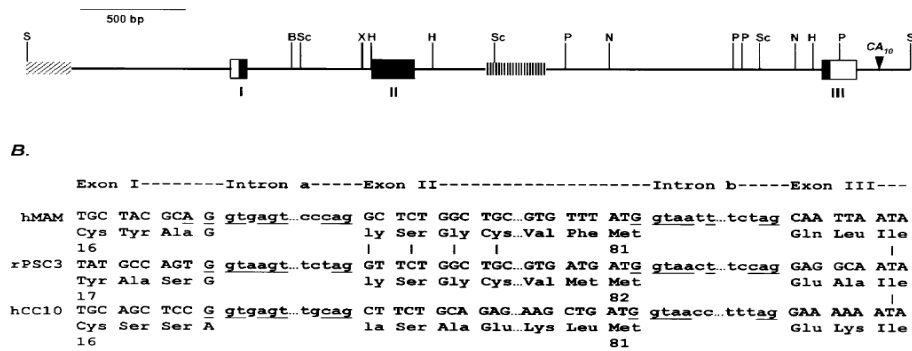


**Hình 1.10: Sơ đồ NST 11 và vị trí của gen *hMAM***

(nguồn Watson, Oncogene 1998[54])

Gen *SCGB2A2* gồm 3 exon (119bp, 188bp và 199bp) và 2 intron (603bp,

1888bp). Sự phân bố khác nhau giữa các đoạn intron/exon tạo ra các đoạn cDNA là *Mammaglobin*, rPSC3, hCC10.



**Hình 1.11: Sơ đồ các đoạn exon và intron trên đoạn gen SCGB2A2. B: So sánh cấu trúc của hMAM, rPSC3 (ở tiền liệt tuyến chuột), human CC10**

(nguồn Watson, Oncogene, 1998[54])

#### ❖ Vai trò của gen *hMAM*

*hMAM* biểu hiện chủ yếu ở niêm mạc, *secretoglobin* dường như tham gia vào tín hiệu tế bào, đáp ứng miễn dịch, hóa ứng động, và cũng có thể được coi như là yếu tố vận chuyển cho các hormone steroid ở người. Một số nghiên cứu gần đây đã phát hiện thấy sự có mặt của *hMAM* ở dịch màng phổi, trong máu của bệnh nhân ung thư phổi tụy là tỷ lệ thấp 23%[58], trong nội mạc tử cung, liên quan rất nhiều đến biến đổi nội tiết trong ung thư vú và ung thư tử cung[59]. Điều đó chứng tỏ *hMAM* có liên quan đến ung thư.

#### ❖ *hMAM* trong ung thư vú

Mặc dù vai trò gây bệnh ung thư vú của *hMAM* vẫn chưa được rõ ràng nhưng có hai giả thuyết mà người ta thấy là *hMAM* có liên quan đến ung thư vú: (i) người ta đã phát hiện sự có mặt của *hMAM* trên các mẫu mô được chẩn đoán chắc chắn là ung thư vú bằng kỹ thuật Northern blot và RT-PCR, không thấy trên các mẫu mô vú lành tính. (ii) *hMAM* được biểu hiện ở nhiều dòng tế bào ung thư vú. *hMAM* chiếm tỷ lệ dương tính ở 5/10 dòng tế bào ung thư vú,



21% ở mô ung thư vú nguyên phát, 62% ở mô ung thư vú có di căn xa[60]. Ngoài ra, *hMAM* được coi là liên quan đến ung thư vú vì sự quan hệ mật thiết của nó đến sinh học vú và *uteroglobin*, đóng một vai trò trong việc điều tiết *progesterone*[61]. Các hormon steroid đã được liên quan trong sự phát triển của ung thư vú. Hormon *Steroid* liên quan đến bệnh ung thư vú: *Estrogen* có vai trò quan trọng trong điều hòa sự tăng sinh và biệt hóa của biểu mô vú bình thường. *Estrogen* giúp phát triển hệ thống mô đệm tuyến vú, phát triển hệ thống các ống bài xuất nhỏ và làm tăng mô mỡ trong tuyến vú. *Progesteron* thúc đẩy sự phát triển các tiểu thùy, kích thích các tế bào chế tiết tăng sinh. Cơ chế gây ung thư của gen *hMAM* đến nay chưa được biết rõ nhưng người ta thấy có liên quan đến thay đổi tế bào biểu mô tuyến vú, kích thích tăng trưởng, tăng tỷ lệ phân bào, đặc hiệu cho ung thư dạng biểu mô. Mặc dù câu hỏi về vai trò của *hMAM* trong phát triển bệnh ung thư vú vẫn chưa được trả lời và cần có nghiên cứu thêm, tuy nhiên *hMAM* là một dấu hiệu đầy hứa hẹn để chẩn đoán bệnh ung thư vú bởi biểu hiện của nó đã được phát hiện trong một số lượng đáng kể các mô ung thư vú như là một dấu hiệu của sự tiến triển của khối u và hơn nữa, *hMAM* có thể phục vụ cho theo dõi sau điều trị [62]. Cho đến nay, biểu hiện *hMAM* đã được cho là giới hạn trong tuyến vú bình thường và ung thư vú. Trong thực tế, sử dụng kỹ thuật RT-PCR, Watson và Fleming không tìm thấy có biểu hiện *hMAM* trong các loại mô lành tính khác nhau hoặc trong khối u mà chỉ thấy ở bệnh ung thư vú[54]. Biểu hiện của *hMAM* đặc hiệu cho mô vú, ngày càng được sử dụng để xác định và phát hiện các tế bào ung thư vú, nó có ích trong chẩn đoán khối u di căn hạch[63].

#### 1.2.3.3. Nghiên cứu về *hMAM mRNA*, *survivin mRNA* với bệnh ung thư vú

Ung thư vú xảy ra khi các tế bào mất khả năng kiểm soát sự cân bằng của quá trình tăng trưởng và chết tế bào. Bình thường, sự tăng trưởng mạnh của tế bào sẽ bị ức chế do số lượng tế bào chết tăng lên gọi là quá trình chết theo chương trình của tế bào. Tại trường đại học St Vincent, người ta đã nghiên

cứu các protein liên quan đến sự tăng trưởng và chết của tế bào, đặc biệt có một loại protein tên là *survivin*. Protein này biểu hiện mạnh trong các mô của bào thai đang phát triển, giúp đảm bảo sự sống còn của bào thai đến khi sinh. *Survivin* được tìm thấy trong nhiều loại ung thư bao gồm cả ung thư vú. Điều đặc biệt có ý nghĩa là các protein này không biểu hiện ở các mô vú bình thường nhưng lại có nồng độ rất cao trong các khối u vú ác tính. Kiểu biểu hiện của protein này và chức năng ức chế quá trình apoptosis cho thấy vai trò quan trọng của *survivin* đối với việc duy trì sự sống của tế bào ung thư và ức chế quá trình apoptosis. *Survivin* biểu hiện cao trong các dòng tế bào ung thư vú, ung thư phổi và thấp hơn nhiều trong các ung thư khác. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng *survivin* có thể là một dấu ấn ung thư lý tưởng trong chẩn đoán, tiên lượng ung thư. *Survivin* có nồng độ cao hơn đáng kể trong các hạch bạch huyết ở bệnh nhân ung thư vú khi so sánh với mô vú và cao hơn hẳn ở bệnh nhân ung thư vú di căn. Đó có thể là do *survivin* tham gia vào sự phát triển của các khối u và sự di căn của tế bào ung thư. Các nhà khoa học đã thực hiện rất nhiều nghiên cứu và nhận ra rằng *survivin* có thể tham gia vào quá trình tăng trưởng của các tế bào ung thư, phát triển với tốc độ rất nhanh dẫn đến việc dùng các thuốc hóa học trị liệu để diệt tế bào ung thư là rất khó khăn [64]. Trong một nghiên cứu với trên 500 bệnh nhân ung thư vú cho thấy nồng độ *survivin* càng cao thì tiên lượng sống của bệnh nhân càng giảm và có nhiều khả năng bệnh tái phát. Vì vậy *survivin* có thể là một yếu tố dự báo tiên lượng bệnh nhân ung thư vú. Hơn nữa, *survivin* mRNA đã được phát hiện tới 69,2% -93,8% trên mô bệnh nhân ung thư vú nguyên phát, mức biểu hiện của *survivin* có liên quan với kết quả lâm sàng của bệnh nhân. Theo nghiên cứu của Span và CStrên 275 mô vú của bệnh nhân ung thư vú đã được phẫu thuật, định lượng *survivin* mRNA bằng kỹ thuật TaqMan RT-PCR, kết quả cho thấy nồng độ *survivin* mRNA tỷ lệ với mức độ nặng nhẹ của bệnh nhân, *survivin* là một dấu ấn tiên lượng nguy cơ tái phát của bệnh nhân ung thư vú

sau phẫu thuật. Như vậy, nhóm bệnh nhân có nguy cơ thấp có thể tránh những điều trị không cần thiết và nhóm bệnh nhân có nguy cơ cao sẽ phải điều trị tích cực hơn. Những kết quả này cũng cho thấy gen *survivin* được coi như là một mục tiêu đầy hứa hẹn trong điều trị cho bệnh nhân ung thư vú [65]. Một nghiên cứu khác của Yamashita và CS tại bệnh viện Kumamoto, Nhật Bản, trên 76 mẫu mô của bệnh nhân ung thư vú nguyên phát. Những bệnh nhân này tại thời điểm phẫu thuật được chẩn đoán là ung thư vú chưa có di căn và được theo dõi điều trị trong 5 năm, *survivin* mRNA được đánh giá bằng kỹ thuật TaqMan RT-PCR. Khi so sánh sự biểu hiện của *survivin* trên 76 bệnh nhân ung thư vú với các yếu tố bệnh học lâm sàng không tìm thấy sự liên quan giữa tỷ lệ *survivin* và các yếu tố như tuổi, tình trạng mãn kinh, tình trạng *estrogen*, *progesterone* và loại phẫu thuật [66]. Kết quả cho thấy khối u giai đoạn từ T1-T4 liên quan với nồng độ của mRNA của *survivin* tăng dần lên ( $p=0,0104$ ). Nồng độ *survivin* mRNA ở bệnh nhân ung thư vú giai đoạn III cao hơn so với giai đoạn I hoặc II; bệnh nhân có di căn hạch cao hơn so với bệnh nhân không có hạch ( $p=0,0001$ ). Những bệnh nhân có biểu hiện *survivin* thấp có khả năng sống sót tốt hơn đáng kể so với những bệnh nhân có biểu hiện *survivin* cao trong ung thư vú giai đoạn I và II ( $p<0,0001$ ). Như vậy, *survivin* không những đóng vai trò như một chỉ thị mới để chẩn đoán, tiên lượng ung thư vú mà còn là một mục tiêu đầy hứa hẹn cho theo dõi điều trị ung thư vú. *Survivin* không những được nghiên cứu trên mô mà còn được nghiên cứu nhiều trên máu ngoại vi. Một công trình nghiên cứu của Yie, Luo và cộng sự tại trung tâm nghiên cứu ung thư Chengdu, Trung Quốc về sự biểu hiện của gen *survivin* từ các tế bào ung thư vú lưu thông trong máu ngoại vi dựa trên kỹ thuật RT-PCR ELISA. Trong số 67 bệnh nhân ung thư vú ở giai đoạn khác nhau, người ta đã phát hiện được *survivin* mRNA trong các mẫu máu ngoại vi của 34 bệnh nhân chiếm 50,7% nhưng không phát hiện được gen này ở nhóm chứng gồm 135 phụ nữ bình thường khỏe mạnh. Sự biểu hiện của gen *survivin* từ các tế bào

ung thư vú lưu hành trong máu ngoại vi có liên quan đáng kể với các thông số bệnh học lâm sàng như thâm nhiễm mạch, loại mô học, kích thước khối u, tình trạng hạch và các giai đoạn lâm sàng của bệnh với  $p < 0,01$ . Các bệnh nhân trên được theo dõi tiếp trong 36 tháng, kết quả cho thấy 9 trong số 11 bệnh nhân ung thư vú (chiếm 81,8%) có biểu hiện *survivin*(+) tại thời điểm kiểm tra xét nghiệm ban đầu bị tái phát bệnh, trong khi tỷ lệ tái phát chỉ tìm thấy trên 2 trong số 6 bệnh nhân ung thư vú (chiếm 33,3%) mà biểu hiện *survivin* (-). Vì vậy, việc phát hiện các tế bào ung thư lưu hành có biểu hiện *survivin* mRNA có thể cung cấp thông tin có giá trị cho các dự báo di căn và khả năng tái phát của ung thư vú. Như vậy, có thể thấy gen *survivin* có giá trị rất lớn trong chẩn đoán sớm, tiên lượng và theo dõi điều trị bệnh nhân ung thư vú. Chính vì lý do này mà nghiên cứu đánh giá sự biểu hiện *survivin* mRNA trong máu nhằm mục đích tìm ra TBUTM có thể là một mục tiêu lý tưởng trong chẩn đoán, tiên lượng và theo dõi điều trị ung thư vú.

Cũng như *survivin*, *hMAM* cũng là một gen đặc hiệu cho bệnh ung thư vú. Theo nghiên cứu của Lin YC (2003) đã thấy sự biểu hiện của *hMAM* mRNA ở bệnh nhân ung thư vú giai đoạn 0 là 12%, giai đoạn 1 là 25%, giai đoạn 2 là 32%, giai đoạn 3 là 33,8%, di căn là 54%[63]. Sự biểu hiện của *hMAM* không những là cơ sở để chẩn đoán ung thư vú mà còn liên quan đến vấn đề tiên lượng xấu và có thể coi như là yếu tố tiên lượng bổ xung [67]. Một nghiên cứu mới của Liu(2012) cho thấy sự biểu hiện của *hMAM* mRNA trong tủy xương của bệnh nhân ung thư vú được xác định bằng RT-PCR là 38,2%. Sự biểu hiện của *hMAM* cao hơn ở những bệnh nhân có khối u lớn hơn ( $p=0,001$ ) và ở những bệnh nhân giai đoạn II hoặc III biểu hiện *hMAM* mRNA cao hơn giai đoạn I ( $p=0,001$ ). Sự biểu hiện của *hMAM* cao hơn rất nhiều ở những bệnh nhân với ER (-) hoặc ER (+) so với những người có ER (++) hoặc (+++) ( $p=0,003$ ). Tuy nhiên, không có mối tương quan đã được tìm thấy giữa biểu hiện *hMAM* và tuổi bệnh nhân ( $p=0,304$ ). Bệnh nhân có biểu hiện (+) của *hMAM* có tiên lượng

xấu[68]. Trong bệnh ung thư vú, nếu chỉ dùng một gen đơn độc để chẩn đoán thì độ nhạy và độ đặc hiệu thường không cao vì tính đa dạng của tế bào ung thư nên người ta thường dùng nhiều gen kết hợp để chẩn đoán. Chen Y đã chứng minh được khi kết hợp các mRNA: *CK19*, *hMAM*, *CEA* thì phát hiện được 54% ung thư vú ở giai đoạn sớm, 13/27 bệnh nhân dương tính với 3 dấu ấn phát hiện được di căn xa sau 3 năm. Sự kết hợp nhiều dấu ấn có thể tăng độ nhạy và độ đặc hiệu so với một dấu ấn và có ý nghĩa quan trọng trong tiên lượng bệnh [69].

### **1.3. Nghiên cứu phát hiện tế bào ung thư vú bằng kỹ thuật sinh học phân tử ở Việt Nam**

Trong những năm gần đây, sinh học phân tử đã được áp dụng để phát hiện tế bào ung thư và đã thu được thành công đáng kể. Đầu tiên đó là những nghiên cứu của Tạ Thành Văn và cộng sự về sự sao chép của gen *HIP* (Heparansulfate Interacting Protein) trong mô ung thư vú. Các tác giả đã đưa ra bằng chứng về sự khác biệt đáng kể mức độ sao chép mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ vú đơn thuần. Sau đó Phan Tôn Hoàng đã thấy sự biểu hiện của *HIP* ở các giai đoạn ung thư vú khác nhau, mức độ sao chép *HIP* phụ thuộc vào kích thước khối u, độ ác tính, độ di căn, *HIP* mRNA biểu hiện mức độ thấp ở 1 trong số 5 mẫu u xơ[70]. Đến năm 2008 bằng kỹ thuật RT-PCR và PCR định lượng điện di mao quản, Nghiên cứu của Đặng Thị Tuyết Minh và cộng sự về gen *HIP* và *EGFR* ở mô ung thư vú đã khẳng định mức độ sao chép mRNA của *HIP* và *EGRF* ở mô ung thư vú cao hơn ở mô u xơ và tăng theo giai đoạn tiến triển trong ung thư vú[14]. Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện tế bào ung thư ở mô qua sự biểu hiện của gen đặc hiệu ung thư là kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao góp phần trong chẩn đoán, điều trị và tiên lượng bệnh ung thư vú. Tuy nhiên theo AJCC 7 (American Joint Committee on Cancer) tế bào ung thư ở mô không chỉ ra giai đoạn M0 và M1, giai đoạn di căn của khối u, nhưng các bệnh nhân Mx (những người phát hiện

tế bào ung thư trong máu và tế bào ung thư di căn trong tủy xương) dù không có thêm bằng chứng lâm sàng hoặc ảnh phóng xạ cho di căn vẫn được coi và đối xử điều trị như di căn ung thư[41]. Như vậy vấn đề đặt ra là làm sao phát hiện được tế bào ung thư trong máu từ giai đoạn sớm. Phát hiện tế bào ung thư vú trong máu là kỹ thuật khó và thu hút được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học, cần sự đầu tư về công sức và kỹ thuật để đem lại hiệu quả tích cực trong chẩn đoán và điều trị ung thư vú.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chia 2 nhóm

Nhóm bệnh: Nhóm bệnh nhân ung thư vú ở cả 4 giai đoạn theo phân loại ung thư vú TNM (mục 1.1.2.2)

n=43

Nhóm chứng: Nhóm bệnh nhân được chẩn đoán là u xơ tuyến vú

N=21

Đối tượng nghiên cứu được thu thập từ Khoa Ngoại vú Bệnh viện K.

Tiêu chuẩn lựa chọn: bệnh nhân được chẩn đoán xác định là ung thư vú, u xơ vú dựa vào lâm sàng, cận lâm sàng, kết quả mô bệnh học tại Bệnh viện K.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- + Đã được chẩn đoán có khối u một cơ quan nào khác ngoài vú.
- + Đã được điều trị ung thư bằng bất kỳ một phương pháp nào trước đó.
- + Không muốn tham gia nghiên cứu.

Phương pháp chọn mẫu: Chọn mẫu thuận tiện.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

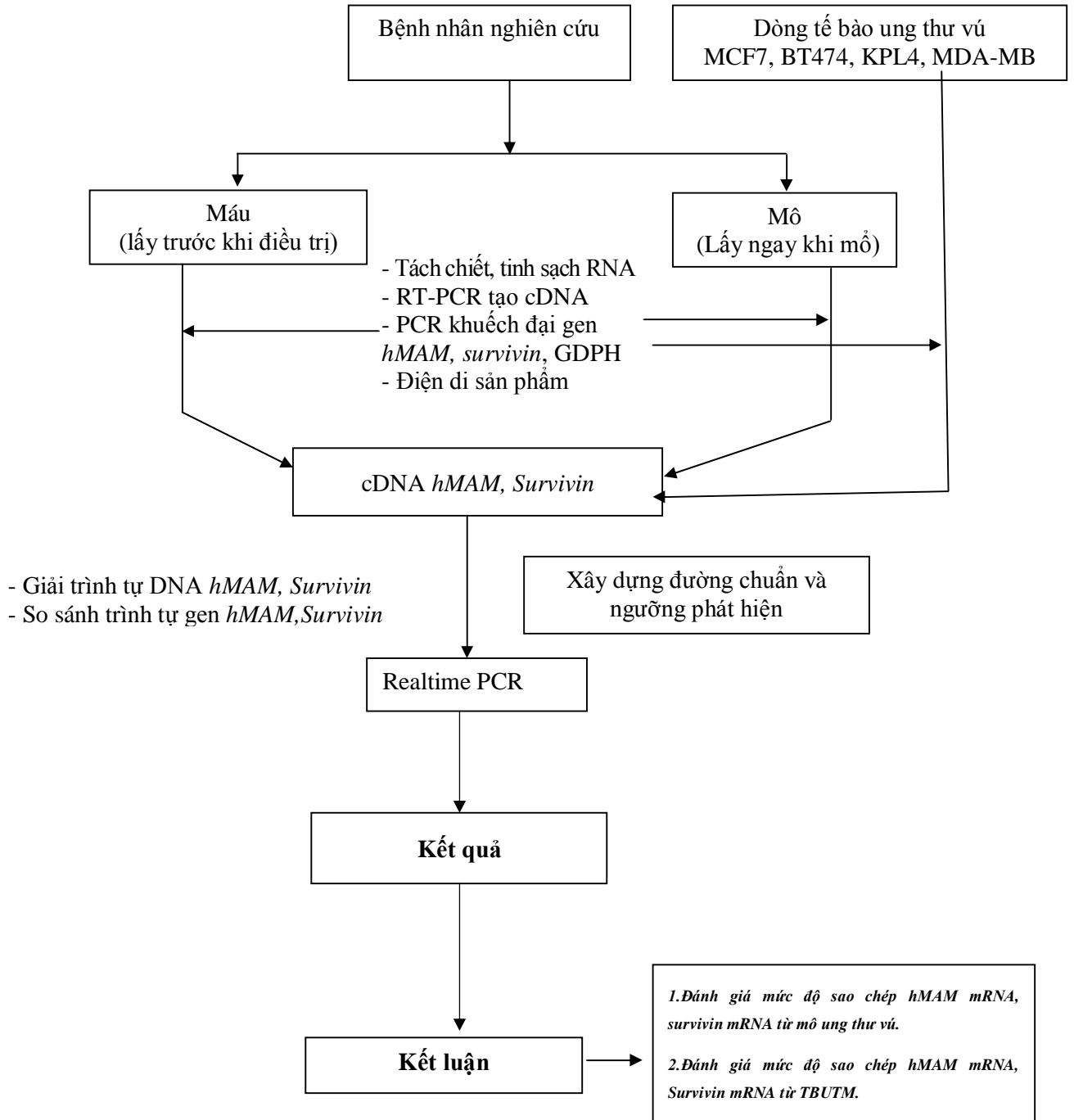
##### 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu và xử lý số liệu

- Tiến cứu kết hợp mô tả cắt ngang
- Lưu trữ số liệu bằng Excel 2007
- Thống kê dựa vào phần mềm SPSS 16.0
- Sử dụng các hàm số thống kê: Đối với Ttest so sánh 2 giá trị trung bình, Chi-Square ( $\chi^2$ ) và Fisher kiểm định biến tỷ lệ với độ tin cậy 95%.

-Sử dụng các hàm phi tham số kiểm định khi thống kê mô tả của biến định lượng trên hai hay nhiều nhóm đưa ra tham số không tuân theo quy luật chuẩn: kiểm định Wilcoxon cho mẫu ghép cặp, Mann-Whitney cho mẫu độc lập.

- Quy trình nghiên cứu

SƠ ĐỒ TÓM TẮT QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU





### **2.2.2. Địa điểm, thiết bị nghiên cứu**

- Bệnh nhân được lựa chọn từ Khoa Ngoại vú Bệnh viện K
- Hóa chất trang thiết bị nghiên cứu phục vụ cho phân tích hóa sinh thông thường, các xét nghiệm CA15-3 được thực hiện tại Khoa Hóa sinh Miễn dịch Bệnh viện K.
- Mô bệnh học được thực hiện tại Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện K
  - Hóa chất trang thiết bị nghiên cứu phục vụ cho phân tích gen:
    - +Thực hiện tại phòng thí nghiệm của Phòng Công nghệ Tế bào Động vật Viện Công nghệ Sinh học.
    - +Bộ môn Hóa sinh Trường Đại học Y Hà Nội.

### **2.2.3. Các bước tiến hành**

Chuẩn hóa quy trình kỹ thuật trên dòng tế bào ung thư vú sau đó áp dụng trên mẫu bệnh phẩm nghiên cứu. Quy trình cụ thể như sau:

#### **2.2.3.1. Lấy mẫu**

Sau khi có kết quả chẩn đoán xác định của lâm sàng và cận lâm sàng, những bệnh nhân đủ tiêu chuẩn của nghiên cứu sẽ được lựa chọn.

- Mẫu máu: Bệnh nhân được lấy 5ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA, mẫu máu được ly tâm 4000 vòng trong 20 phút, sau đó hút bỏ phần huyết tương, thu lấy phần vòng trắng bạch cầu, kỹ thuật này để “làm giàu” tế bào có nhân trong đó có tế bào ung thư vú. Các mẫu sau khi lấy bảo quản ở 4<sup>0</sup>C và được gửi ngay về phòng nghiên cứu tách chiết RNA tổng số. Quy trình đảm bảo tuyệt đối vô trùng.

- Mẫu mô: Được lấy trên cùng bệnh nhân lấy máu, sau khi bệnh nhân được phẫu thuật cắt bỏ khối u. Mẫu được lấy khoảng 20-30mg vào lọ vô trùng được bảo quản ở nhiệt độ -80<sup>0</sup>C cho đến khi tách RNA.

Quy trình lấy mẫu đảm bảo nhất quán về dụng cụ cũng như nhiệt độ trong toàn bộ quá trình thực hiện đề tài.

### 2.2.3.2. Thiết kế môi

Môi được thiết kế từ Phòng Công nghệ Tế bào Động vật Viện Công nghệ Sinh học

Tên primer	Trình tự	T <sub>m</sub>	KT (bp)
GAPDH F	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'	65,3	307
GAPDH R	5'- AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'	67	
<i>hMAM F</i>	5'- CTC CCA GCA CTG CTA CGC AGG CTC -3'	67,2	202
<i>hMAM R</i>	5'-CAC CTC AAC ATT GCT CAG AGT TTC ATC CG-3'	66,3	
<i>SurvivinF</i>	5'-AGA ACT GGC CCT TCT TGG AGG-3'	63,3	170
<i>SurvivinR</i>	5'-CTT TTT ATG TTC CTC TAT GGG GTC-3'	61,8	

### 2.2.3.3. Quy trình nuôi cấy dòng tế bào ung thư vú

*Môi trường và hóa chất:*

- Môi trường bổ sung đầy đủ: DMEM high glucose (invitrogen) + 10% FBS (Invitrogen) + 1% P/S (Invitrogen) + 2mM L-Glutamin.
- Môi trường giữ chủng tế bào: Môi trường bổ sung đầy đủ + 10% DMSO.
- Trypsin/EDTA.
- PBS 1X.
- Trypan Blue.
- Hemocytometer (buồng đếm tế bào).

*Quy trình rã đông tế bào*

- Tế bào giữ trong bình N<sub>2</sub> lỏng được lấy ra và đưa vào bể ổn nhiệt 37<sup>0</sup>C trong vòng 1 đến 2 phút để làm tan hết đá.

- 1ml tế bào được bổ sung thêm 10ml môi trường bổ sung đầy đủ, trộn đều và ly tâm ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, tốc độ 2000 vòng/phút. Loại bỏ dịch nổi, hòa lại tế bào vào 10ml môi trường bổ sung đầy đủ và đưa vào đĩa nuôi cấy (10 x 20cm).

- Tế bào được nuôi theo dạng bám đáy ở 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub> và được cấy chuyển 2-3 lần trong một tuần.

#### *Cấy chuyển tế bào*

- Sau khi tế bào phủ ít nhất 70% bề mặt đĩa nuôi cấy, lấy tế bào ra và loại bỏ dịch nuôi.

- Rửa lại hai lần với PBS và thêm 1ml Trypsin/EDTA, ủ ở 37<sup>0</sup>C trong khoảng 2-3 phút cho đến khi tế bào bong ra khỏi bề mặt đĩa nuôi cấy.

- Bổ sung 10ml môi trường bổ sung đầy đủ và hòa đều để tách riêng từng tế bào. Ly tâm ở 2000 vòng/phút, trong 5 phút và loại bỏ dịch môi trường.

- Bổ sung môi trường và chia ra đĩa nuôi tùy theo nồng độ tế bào (thường chia 1 đĩa ra 2-3 đĩa tùy theo lượng tế bào).

#### *Đếm tế bào*

- Tế bào sau khi cấy chuyển 3-4 lần được thu lại và xác định tổng số tế bào. Tế bào được thu theo quy trình giống như quy trình xử lý trypsin và hòa lại trong một thể tích môi trường nhất định. Lấy 90μl dịch tế bào + 10μl trypan blue và ủ ở nhiệt độ phòng trong khoảng 3-4 phút. Hút 10μl tế bào sau khi nhuộm với trypan blue và đặt vào buồng đếm.

- Đếm số tế bào sống trong mỗi ô 1mm<sup>2</sup>. Tế bào sống không bị nhuộm màu và tổng số tế bào được tính theo công thức như sau:

◆ Nồng độ tế bào trong dịch ban đầu = tổng số tế bào trong các lần đếm (trong các ô 1mm<sup>2</sup>)/ số lần đếm x 10<sup>4</sup> x độ pha loãng X (10/9)

(Đơn vị: tế bào/ml)

◆ Tổng số tế bào = Nồng độ tế bào trong dịch ban đầu x số ml dịch tế bào (Đơn vị: tế bào)

#### 2.2.3.4. Kỹ thuật tách chiết RNA tổng số từ dòng tế bào ung thư vú, máu và mô nghiên cứu

Tách chiết RNA là khâu đầu tiên để thực hiện quy trình phát hiện sự biểu hiện gen nghiên cứu. Đây là bước rất quan trọng quyết định sự thành công của các kỹ thuật tiếp sau. RNA tách chiết phải đảm bảo về hàm lượng và độ tinh sạch.

Sử dụng phương pháp tách chiết RNA tổng số từ mẫu máu nghiên cứu theo kit QIAamp RNA của hãng QIAGEN vì tách chiết RNA bằng kit QIAGEN có ưu điểm hơn so với phương pháp khác: Đây là phương pháp tách chiết nhanh, dễ thao tác, khi tách trên máu có thể sử dụng được tối đa 1,5ml máu tách bạch cầu và tách đồng thời nhiều mẫu máu chỉ trong vòng 1 giờ.

Tiến hành tách chiết RNA từ máu toàn phần, mô ung thư vú, mô u xơ vú lành tính và dòng tế bào ung thư vú.

*Thành phần kit tách chiết:* Buffer EL, Buffer RLT (Guanidine thiocyanate), Buffer RW1 (cồn và số lượng nhỏ guanidine thiocyanate), Buffer RPE, RNase-free Water.

Trước khi tách chiết lần đầu tiên, bổ sung 1 thể tích Buffer RPE + 4 thể tích ethanol. Thêm 10 $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) + 1ml Buffer RLT.

#### **+ Quy trình tách chiết RNA tổng số từ máu như sau:**

*Bước 1:* Trộn 250 $\mu$ l máu với 1,25ml buffer EL vào ống eppendorf 2ml, ủ trong đá 10-15 phút. Trong quá trình ủ, trộn đều bằng vortex 2-3 lần để đảm bảo dung dịch đồng nhất. Đây chính là bước phân giải hồng cầu.

*Bước 2:* Ly tâm 2000 vòng/10 phút ở 4°C. Tế bào bạch cầu sẽ lắng ở phía dưới. Loại hết lớp dịch nổi ở trên là hồng cầu.

*Bước 3:* Thêm 500 $\mu$ l buffer EL, làm tan tế bào bằng vortex.

*Bước 4:* Ly tâm 2000 vòng/10 phút ở 4°C. Loại hoàn toàn lớp dịch nổi ở phía trên.

*Bước 5:* Thêm 350 $\mu$ l buffer RLT đã bổ xung  $\beta$ -ME, làm tan tế bào bằng vortex hoặc pipet.

*Bước 6:* Thu dịch vào cột ly tâm QIAshredder đặt trong ống tube 2ml. Ly tâm 10.000 vòng/2 phút ở 4°C. Loại bỏ dịch trong cột ly tâm QIAshredder, dùng pipet hút dịch nổi và chuyển vào ống effendorf sạch.

*Bước 7:* Bổ xung 600µl ethanol 70°C vào mẫu. Trộn đều bằng pipet.

*Bước 8:* Thu dịch vào cột ly tâm QIAamp đặt trong ống tube 2ml, tránh không để thành cột bị ướt. Đóng nắp và ly tâm 8000 vòng/15 giây ở 4°C. Loại bỏ ống tube chứa dịch lọc. Đặt cột ly tâm QIAamp vào ống tube sạch mới.

*Bước 9:* Bổ sung 700µl buffer RW1. Đóng nắp và ly tâm 10.000 vòng/15 giây ở 4°C. Loại bỏ ống tube chứa dịch lọc ở dưới. Đặt cột ly tâm QIAamp vào ống tube sạch.

*Bước 10:* Bổ sung 500µl buffer RPE vào cột ly tâm QIAamp, đóng nắp và ly tâm 10.000 vòng trong 15 giây ở 4°C. Loại bỏ ống tube chứa dịch lọc ở dưới. Đặt cột ly tâm QIAamp vào ống tube sạch.

*Bước 11:* Thêm 500µl buffer RPE vào cột ly tâm QIAamp, ly tâm 12.000 vòng trong 3 phút ở 4°C. Loại bỏ ống tube chứa dịch lọc ở dưới.

*Bước 12:* Đặt cột ly tâm QIAamp vào ống tube sạch, ly tâm 12.000 vòng/1 phút ở 4°C. Làm cho khô cạn RNA. Không để cạn khô quá để tránh làm giảm chất lượng RNA và cạn sẽ khó được hòa tan.

*Bước 13:* Đặt cột ly tâm QIAamp vào ống tube mới 1,5ml. Bổ sung 30µl nước sạch RNase để ở nhiệt độ phòng 1 phút, ly tâm 12.000 vòng trong 1 phút ở 4°C thu được RNA tổng số. Dung dịch RNA được bảo quản ở -80°C cho đến khi tổng hợp cDNA.

\* Trường hợp mẫu đã được tách bạch cầu thì thực hiện từ bước 5

#### + ***Quy trình tách chiết RNA tổng số từ mô***

*Bước 1:* Cắt một mẫu mô khoảng 20-30mg, nghiền nhỏ bằng cối chày sứ. Sau đó đặt vào ống effendorf 2ml nước sạch RNase đã được làm lạnh.

*Bước2:* Thêm 350 $\mu$ l buffer RLT nghiền tiếp cho đến khi thành bột mịn.

*Bước3:* Thêm 5 $\mu$ l *Protease K* vào mẫu, lắc nhẹ cho đều ủ 5 phút ở 37°C.

*Bước4:* Thu dịch vào cột ly tâm QIAshredder đặt trong ống tube 2ml, ly tâm 12.000 vòng/2 phút ở 4°C. Loại bỏ dịch trong cột ly tâm QIAshredder, dùng pipet hút dịch nổi và chuyển vào ống effendorf sạch.

*Bước5:* Bỏ xung 600 $\mu$ l ethanol 70°C vào mẫu. Trộn đều bằng pipet.

Thực hiện các bước tiếp theo như tách chiết RNA từ máu toàn phần bắt đầu từ bước 8.

#### **+ Quy trình tách chiết RNA từ dòng tế bào ung thư vú**

Thực hiện như tách chiết RNA từ máu toàn phần bắt đầu từ bước 5.

Quá trình tiến hành tách chiết RNA tổng số trên các mẫu máu và mô và tế bào nghiên cứu phải được tuân thủ nghiêm túc về lượng mẫu lấy vào, quy trình phải nhất quán để có thể tách chiết được RNA tổng số trên tất cả các mẫu nghiên cứu đảm bảo cả về hàm lượng cũng như độ tinh sạch.

#### *2.2.3.5. Xác định nồng độ và độ tinh sạch của mẫu RNA bằng phổ hấp thụ*

**Nguyên tắc:** Phương pháp này dựa vào sự hấp thụ ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260nm của các base purin và pyrimidin. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260nm ( $OD_{260\text{ nm}}$  – Optical Density $_{260\text{ nm}}$ ) của các mẫu cho phép xác định nồng độ acid nucleic trong mẫu đo. Độ tinh sạch phụ thuộc vào tỷ số  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ . Một sản phẩm được gọi là sạch khi tỷ số này là 1,7 – 2,0.

#### **Cách tiến hành:**

- Tra 2 $\mu$ l nước vô trùng vào giếng đo của máy Nano Drope làm đối chứng
- Tra 2 $\mu$ l mẫu vào đo mật độ quang trên 2 bước sóng 260nm và 280nm.
- Đọc kết quả trên màn hiển thị hàm lượng RNA tính bằng ng/ $\mu$ l và OD.

### 2.2.3.6. Kỹ thuật RT-PCR tổng hợp chuỗi cDNA

Những mẫu RNA đạt được hàm lượng tối ưu và OD dao động từ 1,7- 2,0 sẽ được sử dụng để tổng hợp cDNA.

#### **Nguyên tắc:**

Phản ứng RT-PCR dựa trên nguyên tắc của chuỗi phản ứng trùng hợp, trong đó có sử dụng enzyme phiên mã ngược có khả năng sử dụng RNA làm mạch khuôn tổng hợp nên chuỗi DNA bổ sung (cDNA).

#### **Quy trình:**

- Thành phần kit: Enzym mix (SuperScript<sup>®</sup>III/RT-PCR), Reaction mix (MgCl<sub>2</sub>, dNTP), Annealing Buffer, Random Hexamers.

#### **Các bước thực hiện:**

**Theo khuyến cáo của Invitrogen cho kit:** Lượng RNA tổng số có thể sử dụng trong phản ứng RT-PCR từ 1pg-5µg.

- Vì lượng RNA tổng số tách được từ mô và máu không như nhau nên cần hiệu chỉnh số lượng RNA tổng số đưa vào phản ứng tạo cDNA sao cho không có sự khác biệt giữa các mẫu nghiên cứu về lượng RNA tổng số/20µl cDNA thu được. Đảm bảo sản phẩm đưa vào phản ứng PCR, Realtime PCR có cùng khối lượng RNA tổng số (khoảng 100ng).

Sử dụng khoảng 100ng RNA tổng số, thêm nước sạch *RNase* cho vừa đủ 6µl/1ống. Thêm 1µl Reaction mix và 1µl Random Hexamers để ở nhiệt độ 65°C trong 5 phút. Sau đó đặt trong đá lạnh 1 phút.

- Thêm 10µl buffer và 2µl Enzym mix cho đủ 20µl.

Tổng hợp cDNA với chu trình nhiệt như sau: 25°C/10 phút; 50°C/50 phút; 85°C/5 phút. Sau đó sản phẩm cDNA được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Để kiểm tra chất lượng cDNA đã tổng hợp, sử dụng kỹ thuật PCR với gen nội chuẩn *GAPDH*.

### 2.2.3.7. Phản ứng PCR sử dụng môi *GAPDH* (gen nội chuẩn), *hMAM* và *survivin*

Tiến hành phản ứng PCR với cDNA được tổng hợp từ mẫu nghiên cứu và mẫu dòng tế bào ung thư vú.

Thực hiện phản ứng PCR với môi *GAPDH F/R* để kiểm tra chất lượng cDNA được tổng hợp, sau khi khẳng định đã tổng hợp được cDNA có chất lượng tốt sẽ tiến hành phản ứng PCR với môi *survivin* và *hMAM*.

- Thành phần phản ứng gồm có buffer 10X (Tris- HCl, KCl, gelatin, MgCl<sub>2</sub>), dNTPs, Taq polymerase, cDNA, nước cất.

- Cặp môi *GADPH F/R*, *Survivin F/ R*, *hMAM F/R*.

**Bảng 2.1: Thành phần tham gia phản ứng PCR**

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích (μl)</b>
Buffer10X	2,5
dNTPs	2,5
Taq- polymerase	0,2
Môi F	0,5
Môi R	0,5
cDNA	3
H <sub>2</sub> O	15,8
<b>Tổng</b>	<b>25</b>

- Chu trình nhiệt của phản ứng PCR tiến hành như sau: Bước khởi đầu sử dụng nhiệt độ 95°C/5 phút; Tiếp theo thực hiện 25-30 chu kỳ phản ứng với chu trình nhiệt: Biến tính 95°C/45 giây, bắt cặp 52°C/45 giây, kéo dài 72°C/45 giây; Bước kéo dài kết thúc 72°C/7 phút để hoàn tất phản ứng. Sau đó mẫu được bảo quản ở 4°C.

- Sản phẩm PCR được chạy trên agarose 1% để kiểm tra.



### 2.2.3.8. Điện di DNA trên gel agarose

#### **Nguyên tắc**

Dựa vào đặc tính cấu trúc của DNA. Đó là các phân tử tích điện âm đều khắp bề mặt nên khi chịu tác động của điện trường, chúng sẽ di chuyển về cực dương. Phát hiện sản phẩm PCR qua quan sát dưới đèn UV nhờ phát màu của ethidium bromide gắn xen trong DNA.

#### **Cách tiến hành**

- Đun nóng trong lò vi sóng dung dịch gel agarose 0,8% hoặc 1% đã pha, để nguội đến 50 - 60°C, đổ dung dịch vào khay đã cài lược. Sau 30 phút, gel đông, gỡ lược ra, đặt bản gel vào bể điện di. Đổ dung dịch đệm TAE 1X ngập bản gel khoảng 1 - 2mm.

- Trộn đều 5 µl sản phẩm PCR với 2µl đệm tra mẫu (loading buffer) nhỏ vào giếng. Chạy điện di ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút.

- Sau điện di, ngâm bản gel vào dung dịch ethidium bromid trong 20 phút. Lấy bản gel ra rửa qua bằng nước, quan sát và chụp ảnh dưới ánh sáng tia tử ngoại.

- Phân tích sản phẩm PCR sau điện di. Sản phẩm khuếch đại được nhận biết nhờ kích thước của chúng dựa vào thang DNA chuẩn. Nếu băng gọn rõ thì sản phẩm PCR tốt.

### 2.2.3.9. Giải trình tự DNA

Sau khi thực hiện phản ứng PCR với môi *survivin* và *hMAM*, phân tích hình ảnh điện di trên gel agarose 1% thu được sản phẩm khuếch đại gen phù hợp với kích thước môi đã thiết kế. Thực hiện giải trình tự DNA của vài mẫu nghiên cứu để khẳng định:

- Kết quả nhân bản được chính là trình tự gen đã nghiên cứu, so sánh với ngân hàng gen.

- Tìm sự khác biệt nếu có trong các gen nghiên cứu ở mô ung thư vú, tế bào ung thư vú lưu hành trong máu.

***Nguyên tắc:***

Sử dụng dideoxynucleotide (ddNTP) có đánh dấu huỳnh quang để làm ngừng các mạch đơn DNA đang được tổng hợp một cách ngẫu nhiên. Enzyme *DNA polymerase* xúc tác gắn các nucleotide vào mạch đơn DNA đang tổng hợp ở vị trí 3'-OH, khi gặp ddNTP (không có nhóm 3'-OH) thì phản ứng tổng hợp bị ngừng lại. Kết quả phản ứng tổng hợp nên các đoạn DNA dài ngắn khác nhau 1 nucleotide, có thể phân tách nhờ điện di trên gel polyacrylamid, phát hiện các ddNTP đã đánh dấu nhờ tia laser.

***Cách tiến hành:***

- Thực hiện phản ứng PCR.
- Sản phẩm PCR sau khi đã tinh sạch được đưa vào máy xác định trình tự tự động ABI 3100 Avant (Applied Biosystems).

***So sánh với trình tự gen đã công bố trong ngân hàng gen***

Kết quả giải trình tự được đối chiếu với trình tự gen đã được công bố trong Ngân hàng Gen Quốc tế Genbank do NCBI (The National Center for Biotechnology Information) cung cấp.

***2.2.3.10. Realtime PCR***

Để xác định được số bản sao *survivin* và *hMAM* được tạo ra trong mẫu nghiên cứu, trước hết tiến hành xây dựng đường biểu diễn chuẩn cho phản ứng RealtimePCR sử dụng dòng tế bào ung thư vú. Phản ứng Realtime PCR với mỗi nghiên cứu cùng với bộ kit Realtime PCR sử dụng SYBR Green của hãng Roche. Từ dòng tế bào ung thư vú có thể xác định được đường chuẩn bằng cách pha loãng cDNA theo các tỷ lệ. Sau khi đã xây dựng được đường biểu diễn chuẩn cho phản ứng realtime PCR, tiến hành phản ứng realtime PCR sử dụng

môi *survivin*F/R và *hMAM* F/R với các mẫu nghiên cứu, xác định số lượng bản sao dựa vào phần mềm cài đặt trên Light Cycle của Roche

**- Phản ứng Realtime RT-PCR được tiến hành với:**

*Thành phần phản ứng:* Maxter Mix, môi *survivin*F/R, *hMAM* R/F cDNA, nước cất.

Do phản ứng Realtime PCR là phản ứng nhạy, vì vậy để tránh trường hợp dương tính giả do tạp nhiễm từ môi trường phải có một đối chứng âm NTC (non-template control), mẫu này cũng có đầy đủ các thành phần giống như một phản ứng Realtime PCR chỉ thiếu DNA khuôn. Phản ứng Realtime PCR chạy với thành phần trình bày trong bảng 2.2.

**Bảng 2.2: Thành phần phản ứng Realtime PCR**

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích (µl)</b>
Master Mix	4,0
primer F	0,5
primer R	0,5
cDNA	5,0
H <sub>2</sub> O	10.0
<b>Tổng</b>	<b>20</b>

Chuẩn bị xong các phản ứng ly tâm nhẹ. Cuối cùng đặt vào máy Light Cycler® của Roche để chạy.

*Chu trình nhiệt của phản ứng:*

*Bước 1:* biến tính sử dụng nhiệt độ 95°C/10 phút;

*Bước 2:* 40 chu kỳ (95°C/10 giây, 55°C/10 giây, 72°C/30 giây) đồng thời có phân tích định lượng;

*Bước 3:* Xác định nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm Realtime PCR (Melting Curves), 95°C/0 giây, 65°C/10 giây, 95°C/0 giây

*Bước 4:* Làm mát sản phẩm Realtime PCR, 40°C trong thời gian 30 giây.

Phản ứng khuếch đại có thể quan sát được nhờ tín hiệu huỳnh quang của SYBR Green phát ra khi bám vào sợi DNA mạch kép từ khi phản ứng khuếch đại bắt đầu cho đến khi kết thúc thông qua một hệ thống camera theo dõi tín hiệu phát huỳnh quang từ mỗi ống. Kết quả đo được sẽ được áp dụng chuẩn đã xây dựng tính số lượng bản sao.

### **Xây dựng đường chuẩn Realtime PCR**

Xây dựng đường chuẩn được thực hiện trên dòng tế bào ung thư vú đã biết trước số lượng tế bào ( $2 \times 10^4$ ). Tách và kiểm tra độ tinh sạch RNA. Tạo và kiểm tra chất lượng cDNA. PCR với mỗi *hMAM*, *survivin*. Đo nồng độ DNA tạo được sau phản ứng PCR. Số bản sao thu được từ sản phẩm PCR được tính như sau:

$$X(\text{g})/\mu\text{l DNA}/[\text{Chiều dài đoạn RNA} \times 2 \times 340] \times 6.022 \times 10^{23} = Y \text{ bản sao}/\mu\text{l}$$

Trong đó: 340 là khối lượng phân tử của một nucleotide

$6.022 \times 10^{23}$  là số phân tử trong 1 mol cơ chất.

(Nguồn: <http://vi.scribd.com/doc/95544022/creating-standard-and-copy-number-calculation>[71]).

Hoặc có thể tính nhanh dựa vào phần mềm (nguồn [SciencePrimer.com/copy number calculator for Realtime PCR](http://SciencePrimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr)[72]).

Số bản sao cDNA ban đầu = Số bản sao thu được từ sản phẩm PCR/ $2^n$  (n là số chu kỳ PCR). Từ số bản sao này pha loãng theo tỷ lệ 10/100/1.000/10.000 ở mỗi ống phản ứng để dựng đường chuẩn.

\* Lưu ý khi xây dựng đường chuẩn không nên để số bản sao ban đầu quá cao, theo khuyến cáo của Roche ngưỡng cao nhất khi xây dựng đường chuẩn nên là  $10^7$  để đảm bảo độ tuyến tính.

### **2.3. Thời gian và kinh phí đề tài**

- Thời gian nghiên cứu: từ 1/2011 - 5/2013.

- Kinh phí đề tài: Đề tài được hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ Y tế do PGS.TS Phạm Thiện Ngọc làm chủ nhiệm theo quyết định số 905/QĐ-BYT, được nghiệm thu theo quyết định số 3018/QĐ-BYT ngày 4/9/2014.

### **2.4. Vấn đề đạo đức của đề tài**

\* Các đối tượng tham gia nghiên cứu là hoàn toàn tự nguyện, được giải thích trước khi tham gia nghiên cứu và có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia nghiên cứu.

\* Các thông tin liên quan đến bệnh nhân được đảm bảo bí mật.

\* Các kỹ thuật thao tác trên bệnh nhân được bảo đảm đúng chuyên môn.

\* Đề tài nghiên cứu này được thực hiện hoàn toàn vì mục đích khoa học chứ không vì mục đích nào khác.

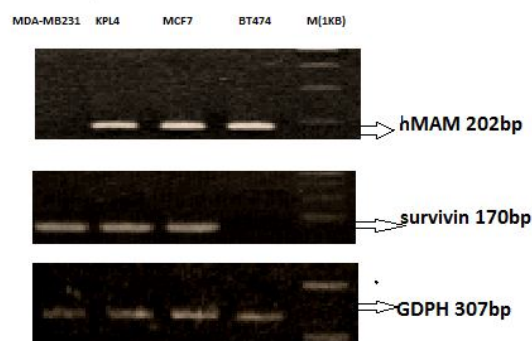
## Chương 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Xây dựng quy trình phát hiện sao chép gen *hMAM* và *survivin* ở dòng tế bào ung thư vú nuôi cấy

Qua một vài nghiên cứu gần đây cho thấy dòng tế bào ung thư vú có thể khuếch đại được nhiều gen ung thư vú là MCF7, BT474, KPL4, MDA-MB231. Các dòng tế bào ung thư vú được nuôi cấy, đếm số lượng cụ thể trước khi tiến hành thí nghiệm. GAPDH là gen nội chuẩn có tác dụng đánh giá chất lượng cDNA, loại trừ những trường hợp âm tính giả do cDNA không đảm bảo.

##### 3.1.1. Kết quả RT-PCR phát hiện *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở dòng tế bào



**Hình 3.1: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR cDNA của *hMAM*, *survivin*, *GAPDH* ở dòng tế bào ung thư vú**

Dòng tế bào ung thư vú: MDA-MB231, KPL4, MCF7, BT474; M: thang chuẩn DNA=1kb

**Nhận xét:** Sau khi nhân bản cDNA của *hMAM*, *survivin* bằng phản ứng PCR ở bốn dòng tế bào ung thư vú, kết quả điện di cho thấy dòng tế bào KPL4, MCF7, BT474 xuất hiện băng điện di rõ nét kích thước khoảng 202bp, dòng tế bào MDA-MB231 không thấy xuất hiện băng điện di. Nhân bản bằng môi *survivin* cho kết quả dòng tế bào MDA-MB231, KPL4, MCF7 xuất hiện băng điện di kích thước khoảng 170bp, dòng tế bào BT474 không thấy xuất hiện băng điện di. Để khẳng định đoạn gen nhân bản được, phải giải trình tự so sánh với đoạn gen được công bố tại ngân hàng gen.

**3.1.2. Giải trình tự sản phẩm PCR gen *hMAM*, *survivin* đã khuếch đại** Sản phẩm PCR khuếch đại gen nghiên cứu, được giải trình tự để khẳng định chắc chắn mẫu đã khuếch đại được là bản sao của gen *hMAM*, *survivin* mà ngân hàng gen đã công bố.

**❖ Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR gen *hMAM***

Sản phẩm PCR với môi gen *hMAM* F/R được giải trình tự trực tiếp trên máy xác định trình tự tự động ABI 3100 Avant (Applied Biosystems).

```

10      20      30      40      50      60
CTCCAGCACTGCTAAGCAAGGTGTGGCTGCCCTTATTGGAGAATGTGATTTCCAAGAC
S Q H C Y A G S G C P L L E N V I S K T

70      80      90      100     110     120
AATCAATCCACAAGTGTCTAAGACTGAATACAAAGAAGTCTTCAAGAGTTCATAGACGA
I N P Q V S K T E Y K E L L Q E F I D D

130     140     150     160     170     180
CAATGCCACTACAAATGCCATAGATGAATTGAGGAATGTTTTCTTAACCAAAACGGATCA
N A T T N A I D E L K E C F L N Q T D E

190     200
AACTCTGACCAATGTTGAGGTE
T L S N V E V

```

**Hình 3.2: Trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của đoạn gen *hMAM***

**Nhận xét:** Trình tự nucleotide của đoạn gen *hMAM* hoàn chỉnh sẽ có khoảng 202 nucleotide. Màu đỏ là vị trí mồi *hMAM F*, màu xanh là vị trí mồi *hMAM R* trên đoạn DNA bổ xung.



**Hình 3.3: Hình ảnh chromas trình tự gen *hMAM* khuếch đại được từ mô của bệnh nhân mã số 4744-11**



Từ kết quả giải trình tự kiểm tra bằng phần mềm BLAST – NCBI (Basic Local Alignment Search Tool) hoặc FASTA để so sánh đoạn gen *hMAM* nhân bản được với trình tự đoạn gen *hMAM* được công bố tại Ngân hàng gen.

<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">EM_SY:AY893203</a>	Synthetic construct Homo sapiens clone FLH053958.01X secretoglobin family 2A member 2 (SCGB2A2) mRNA, complete cds. <i>Cross-references and related information in:</i> <a href="#">▶ Nucleotide sequences</a> <a href="#">▶ Samples &amp; ontologies</a>	282	202	100.0	6.0E-108
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">EM_SY:AY888136</a>	Synthetic construct Homo sapiens clone FLH019248.01X secretoglobin family 2A member 2 (SCGB2A2) mRNA, complete cds. <i>Cross-references and related information in:</i> <a href="#">▶ Nucleotide sequences</a> <a href="#">▶ Samples &amp; ontologies</a>	282	202	100.0	6.0E-108
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">EM_HUM:U33147</a>	Human mammaglobin mRNA, complete cds. <i>Cross-references and related information in:</i> <a href="#">▶ Gene expression</a> <a href="#">▶ Nucleotide sequences</a> <a href="#">▶ Genomes</a> <a href="#">▶ Protein families</a> <a href="#">▶ Literature</a> <a href="#">▶ Samples &amp; ontologies</a> <a href="#">▶ Protein sequences</a>	503	202	100.0	6.0E-108
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">EM_HUM:BC128402</a>	Homo sapiens secretoglobin, family 2A, member 2, mRNA (cDNA clone MGC:156166 IMAGE:40115099), complete cds. <i>Cross-references and related information in:</i> <a href="#">▶ Gene expression</a> <a href="#">▶ Nucleotide sequences</a> <a href="#">▶ Genomes</a> <a href="#">▶ Protein families</a> <a href="#">▶ Literature</a> <a href="#">▶ Samples &amp; ontologies</a> <a href="#">▶ Protein sequences</a>	362	202	100.0	6.0E-108
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">EM_HUM:BC128252</a>	Homo sapiens secretoglobin, family 2A, member 2, mRNA (cDNA clone MGC:149421 IMAGE:40115103), complete cds. <i>Cross-references and related information in:</i> <a href="#">▶ Gene expression</a> <a href="#">▶ Nucleotide sequences</a> <a href="#">▶ Genomes</a> <a href="#">▶ Protein families</a> <a href="#">▶ Literature</a> <a href="#">▶ Samples &amp; ontologies</a> <a href="#">▶ Protein sequences</a>	362	202	100.0	6.0E-108

**Hình 3.4: Hình ảnh so sánh kết quả giải trình tự bản sao gen *hMAM* nhân bản được với trình tự *hMAM* mRNA công bố tại ngân hàng gen**

Nhận xét: Kết quả giải trình tự bản sao gen *hMAM*, so sánh với các trình tự gen đã đăng trên Ngân hàng Gen Quốc tế có sự trùng lặp 100% với các trình tự đã đăng trên Genbank mã số: AY893203, AY888136, U33147(xem thêm kết quả phần phụ lục).

❖ **Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR gen *survivin* đã khuếch đại được**

```

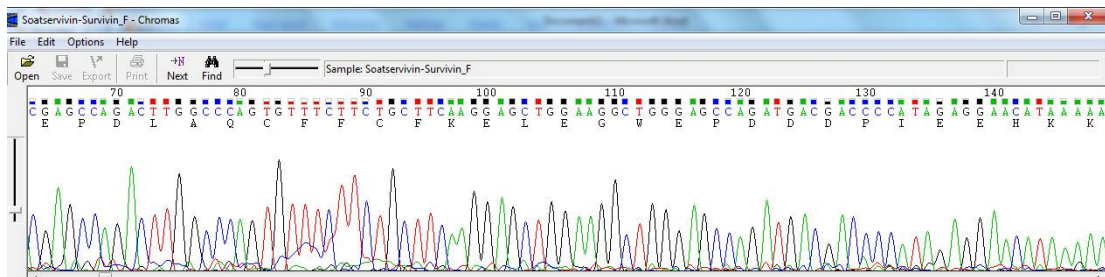
1  AGAACTGGCCCTTCTTGGAGGCTGCGCCTGCACCCCGGAGCGGA
1  N W P F L E G C A C T P E R M
46  TGGCCGAGGCTGGCTTCATCCACTGCCCCACTGAGAACGAGCCAG
16  A E A G F I H C P T E N E P D
91  ACTTGGCCCAAGTGTTCCTTCTGCTTCAAGGAGCTGGAAGGCTGGG
31  L A Q C F F C F K E L E G W E
136 AGCCAGATGACGACCCCATAGAGGAACAIAAAAAG
46  P D D D P I E E H K K

```

**Hình 3.5: Trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của đoạn gen *survivin***

**Nhận xét:** Trình tự nucleotide của đoạn gen *survivin* hoàn chỉnh sẽ có khoảng 170 nucleotide. Màu đỏ là vị trí môisurvivin *F*, màu xanh là vị trí môisurvivin *R* trên đoạn DNA bổ sung.

Kết quả xác định trình tự nucleotide của đoạn gen mã hóasurvivin thể hiện ở hình 3.6.



**Hình 3.6: Hình ảnh chromas trình tự đoạn gensurvivin khuếch đại được từ máu của bệnh nhân mã số 4312-11**

Từ kết quả giải trình tự kiểm tra bằng phần mềm FASTA để so sánh đoạn gen *survivin* nhân bản được với trình tự đoạn gen *survivin* được công bố tại Ngân hàng Gen.

<input checked="" type="checkbox"/>	14	EM_PAT:BD185366	Survivin-like polypeptide and its DNA. Cross-references and related information in: ▶ Ontologies	426	850	100.0	100.0	4.0E-34
<input checked="" type="checkbox"/>	15	EM_PAT:AR184473	Sequence 2 from patent US 6346389. Cross-references and related information in: ▶ Ontologies	426	850	100.0	100.0	4.0E-34
<input checked="" type="checkbox"/>	16	EM_PAT:BD495247	Tumor diagnosis reagent and its utilization. Cross-references and related information in: ▶ Ontologies	426	850	100.0	100.0	4.0E-34
<input checked="" type="checkbox"/>	17	EM_PAT:GC492460	Sequence 1 from patent US 7393666. Cross-references and related information in: ▶ Ontologies	429	850	100.0	100.0	4.0E-34
<input checked="" type="checkbox"/>	18	EM_PAT:CS606063	Sequence 57 from Patent WO2007039192. Cross-references and related information in: ▶ Ontologies	429	850	100.0	100.0	4.0E-34
<input checked="" type="checkbox"/>	19	EM_SY:AY893903	Synthetic construct Homo sapiens clone FLH127874.01L baculoviral IAP repeat-containing 5 (BIRC5) mRNA, partial cds. Cross-references and related information in: ▶ Nucleotide Sequences ▶ Ontologies	429	850	100.0	100.0	4.0E-34
<input checked="" type="checkbox"/>	20	EM_HUM:CR541740	Homo sapiens full open reading frame cDNA clone RZPD0834G0429D for gene BIRC5, baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin); complete cds, incl. stopcodon. Cross-references and related information in: ▶ Nucleotide Sequences ▶ Genomes ▶ Protein Families ▶ Macromolecular Structures ▶ Ontologies ▶ Protein Sequences	429	850	100.0	100.0	4.0E-34
<input checked="" type="checkbox"/>	21	EM_PAT:AX934325	Sequence 11 from Patent WO03087395. Cross-references and related information in: ▶ Nucleotide Sequences ▶ Ontologies	429	850	100.0	100.0	4.0E-34
<input checked="" type="checkbox"/>	22	EM_SY:AY890392	Synthetic construct Homo sapiens clone FLH018597.01X baculoviral IAP repeat-containing 5 (BIRC5) mRNA, complete cds. Cross-references and related information in:	429	850	100.0	100.0	4.0E-34

**Hình 3.7: Hình ảnh so sánh kết quả giải trình tự bản sao gen survivin nhân bản được với trình tự survivin công bố tại ngân hàng gen**

**Nhận xét:** Kết quả giải trình tự bản sao gen *survivin* khi so sánh với các trình tự gen đã đăng trên Ngân hàng Gen Quốc tế chúng tôi nhận được kết quả có sự trùng lặp 100% với các trình tự đã đăng trên Genbank mã số: BD167854, BD185366, AY893903 (xem thêm kết quả phân phụ lục).

### 3.2. RT-PCR phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *Survivin* mRNA trong mô và trong máu bệnh nhân ung thư vú

#### 3.2.1. Đặc điểm nhóm bệnh nhân nghiên cứu

##### 3.2.1.1. Đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học của nhóm ung thư vú nghiên cứu

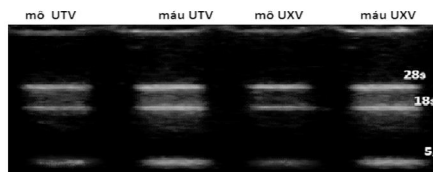
**Bảng 3.1: Đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học của nhóm ung thư vú**

Đặc điểm	n	Tỷ lệ %
<b>Tuổi</b>		
Tuổi $\leq 50$	21	48,8
Tuổi $>50$	22	51,2
Tổng	43	100
<b>Giai đoạn bệnh</b>		
I	8	18,6
II	19	44,2
III	11	25,6
IV	5	11,6
Tổng	43	100
<b>Kích thước u</b>		
T1	10	23,3
T2	17	39,5
T3	13	30,2
T4	3	7,0
Tổng	43	100
<b>Di căn xa</b>		
M0	38	88,4
M1	5	11,6
Tổng	43	100
<b>Di căn hạch</b>		
N0	13	30,2
N1	17	39,6
N2	13	30,2
Tổng	43	100
<b>Thể mô bệnh học</b>		
Thể ống tuyến xâm nhập	29	67,5
Thể tiêu thùy	8	18,6
Thể nhày	6	13,9
Tổng	43	100
<b>Dấu ấn ung thư vú CA15-3 (bình thường &lt;32 U/ml)</b>		
Không tăng	33	76,7
Có tăng	10	23,3
Tổng	43	100

**Nhận xét:** Những bệnh nhân ung thư vú nghiên cứu được chia 2 nhóm tuổi, trên và dưới 50. Tỷ lệ hai nhóm tuổi này sà sà như nhau 48,8% và 51,2%. Nghiên cứu đã thu thập đủ các giai đoạn bệnh, trong đó giai đoạn II là 19/43 chiếm tỷ lệ 44,2%, giai đoạn I là giai đoạn rất sớm có 8/43 bệnh nhân chiếm tỷ lệ 18,6%. Trong số 43 bệnh nhân ung thư vú có đủ kích thước u từ T1 đến T4, trong đó T1 chiếm tỷ lệ 23,3%. Nhóm T4 là có kích thước u lớn xâm lấn thành ngực có 3 bệnh nhân chiếm tỷ lệ 7%, tỷ lệ phát hiện khối u khi còn nhỏ dưới 5cm gặp tương đối nhiều chiếm tỷ lệ 39,5%. Có 13/43 bệnh nhân chưa phát hiện di căn hạch chiếm tỷ lệ 30,2%. Về mô bệnh học, nghiên cứu có 29/43 bệnh nhân carcinom thể ống xâm nhập chiếm tỷ lệ 67,4%, thể tiểu thùy là 8/43 chiếm tỷ lệ 18,6%, thể nhày là 6/43 chiếm tỷ lệ 13,9%. Bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang, điểm ngưỡng 32UI/ml được Roche sử dụng cho hệ Cobas e 601 là ngưỡng cho sự phân biệt bệnh lý và bình thường. Trong số 43 bệnh nhân ung thư vú nghiên cứu có 33 bệnh nhân không có biểu đồ CA15-3 chiếm tỷ lệ 76,7%.

### 3.2.2.2. RNA tổng số ở nhóm ung thư vú và nhóm u xơ vú

RNA tổng số được tách từ 43 mẫu mô và mẫu máu bệnh nhân ung thư, 21 mẫu mô và mẫu máu bệnh nhân u xơ vú. RNA tổng số được kiểm tra chất lượng bằng điện di RNA trên gel agarose 0,8%.



**Hình 3.8. Hình ảnh điện di trên gel agarose 0,8% sản phẩm RNA tách chiết từ mẫu nghiên cứu**

Thứ tự từ trái qua phải là các đường chạy của mô ung thư vú, máu ung thư vú, mô u xơ vú, máu u xơ vú

**Nhận xét:** Kết quả ảnh điện di hình 3.8 cho thấy các RNA tổng số có chất lượng thể hiện 3 băng rõ nét với kích thước 3 tiểu phần rRNA là 28s; 18s; 5,8s, không có dấu hiệu bị tạp nhiễm.

Ngoài điện di trên gen agarose 0,8% các RNA tổng số còn được kiểm tra độ tinh sạch, nồng độ tách chiết trên máy đo quang phổ kế Nano Drop 1000

**Bảng 3.2: Độ tinh sạch và nồng độ RNA tổng số tách chiết trên một vài mẫu nghiên cứu (xem thêm kết quả phân phụ lục)**

TT	Mã lưu trữ	Mô bệnh học	RNA tổng số tách từ máu		RNA tổng số tách từ mô	
			Nồng độ (ng/μl)	OD <sub>260/280</sub>	Nồng độ (ng/μl)	OD <sub>260/280</sub>
1	1013-12	Carcinome thể ống xâm nhập	91,62	1,93	163,38	2,05
2	1366-12	Carcinome thể tiểu thùy	90,6	1,85	197,7	2,03
3	4772-11	Carcinome thể ống xâm nhập	101,5	1,96	102,49	1,65
4	1933-13	Carcinome thể ống xâm nhập	154,4	1,85	232,1	2,01
5	2014-13	Carcinome thể nhày	133,33	2,01	313,89	1,96
6	1949-13	Carcinome thể tiểu thùy	125,5	1,81	302,1	1,99
7	26051-13	U xơ vú	109,7	1,76	303,2	1,9
8	26050-13	U xơ vú	79,9	1,89	206,6	1,74

**Nhận xét:** các sản phẩm RNA tổng số được tách chiết có độ tinh sạch đúng tiêu chuẩn, nồng độ sản phẩm thu được RNA ở các mẫu mô, mẫu máu là khá cao chứng tỏ quá trình tách chiết tốt có thể sử dụng cho kỹ thuật tiếp theo.

**Bảng 3.3: So sánh RNA tổng số ở nhóm ung thư vú và u xơ vú**

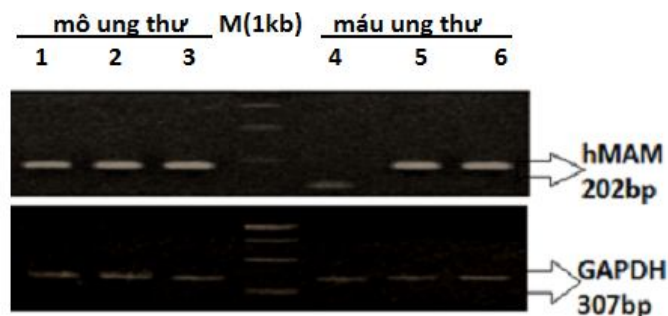
<b>Nhóm bệnh</b>	<b>n</b>	<b>Máu (ng/μl)</b> ( $\bar{x} \pm SD$ )	<b>Mô (ng/μl)</b> ( $\bar{x} \pm SD$ )
ung thư vú (1)	43	110,6±21,3	240,6±64,9
u xơ vú (2)	21	103,0±16,0	220,8±64,7
p (1) và (2)		0,056>0,05	0,85>0,05

**Nhận xét:** Bệnh nhân ung thư vú và u xơ vú được lấy đồng thời cả mô và máu sau khi tách RNA tổng số, các mẫu đủ tiêu chuẩn về độ tinh sạch được đưa vào nghiên cứu. Từ kết quả nồng độ RNA tổng số thu được cho thấy giá trị trung bình RNA tổng số trong mô cao hơn trong máu. Không thấy sự khác biệt về khối lượng RNA tổng số ở mô ung thư và mô u xơ vú, máu ung thư và máu u xơ vú với  $p > 0,05$ .

### **3.2.2. RT-PCR phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong mô bệnh nhân ung thư vú**

#### **3.2.2.1. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen *hMAM*, *survivin***

Từ 100ng RNA tổng số trong 20 μl ống phản ứng tạo cDNA, sau khi nhân bản với mỗi *hMAM* kết quả thể hiện ở hình 3.9.



**Hình 3.9: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản cDNA $hMAM$  và  $GAPDH$  ở mô và máu bệnh nhân UTV giai đoạn II**

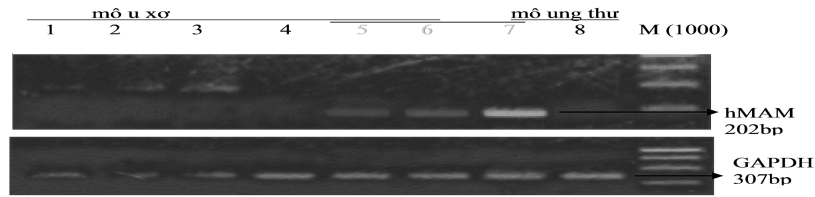
Sản phẩm PCR khuếch đại  $hMAM$  từ mô bệnh nhân ung thư (1-3)

Sản phẩm PCR khuếch đại  $hMAM$  từ máu bệnh nhân ung thư vútương ứng (4-6)

Thang DNA chuẩn 1kb (M)

**Nhận xét:** Độ đậm vạch PCR của  $GAPDH$  là những băng rõ nét, kích thước khá đồng đều, không có sự khác biệt ở mô ung thư vú và máu bệnh nhân ung thư vú. Ở giếng số 1,2,3,5,6 là sản phẩm cDNA $hMAM$  của bệnh nhân UTV giai đoạn II đã khuếch đại được, biểu hiện là những băng rõ nét kích thước khoảng 202 bp, độ đậm vạch không rõ sự khác biệt ở những mẫu mô ung thư vú so với mẫu máu bệnh nhân ung thư vú. Giếng số 4 không thấy sự sao chép  $hMAM$  mRNA. Như vậy bệnh nhân có thể thấy sự sao chép  $hMAM$  ở mô nhưng không thấy sự sao chép ở mẫu máu tương ứng.

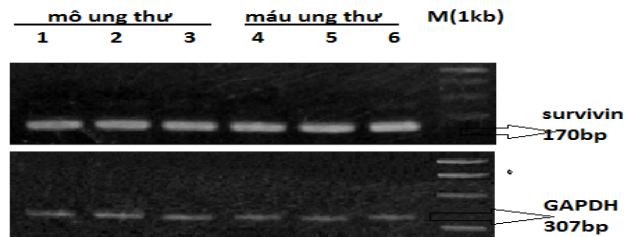




**Hình 3.10: Hình ảnh điện di cDNA của hMAM và GAPDH trên gel agarose mô u xơ (1-6), mô ung thư (7-8), thang DNA chuẩn 1kb (M)**

**Nhận xét:** Độ đậm vạch PCR của *GAPDH* rõ nét, khá đồng đều ở mô u xơ vú và mô ung thư vú. Ở giếng số 5, 6, 7 là mẫu cDNA *hMAM* đã khuếch đại được. Có sự sao chép *hMAM* mRNA ở mô u xơ vú, độ đậm vạch ở mẫu mô ung thư vú đậm và rõ nét hơn mô u xơ.

❖ **Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen survivin**



**Hình 3.11: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản cDNA survivin và GAPDH ở mô và máu bệnh nhân UTV giai đoạn II**

Sản phẩm PCR khuếch đại *survivin* từ mô bệnh nhân ung thư (1-3)

Sản phẩm PCR khuếch đại *survivin* từ máu bệnh nhân ung thư vú tương ứng (4-6)

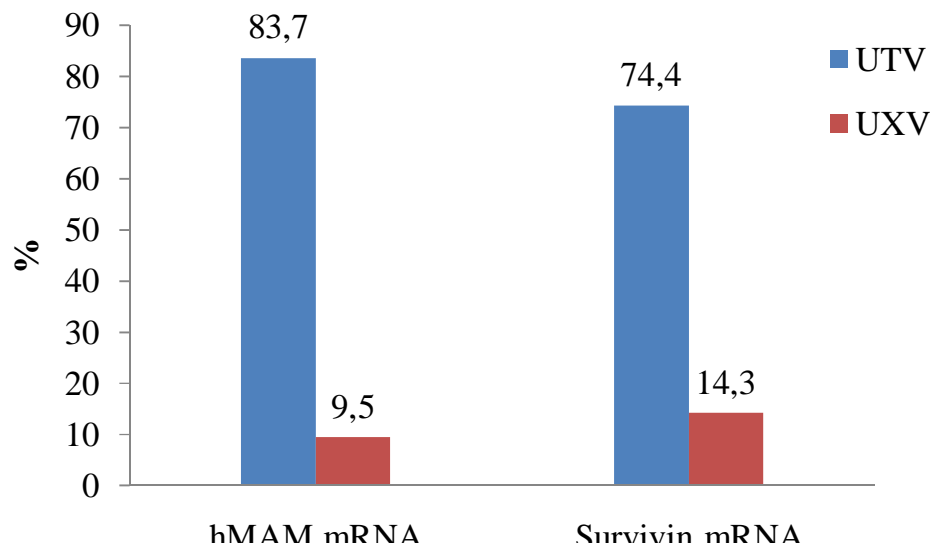
Thang DNA chuẩn 1kb (M)

**Nhận xét:** Độ đậm vạch PCR của *GAPDH* là những băng rõ nét, kích thước khá đồng đều, không rõ sự khác biệt ở mô ung thư vú và máu bệnh nhân ung thư vú. Các giếng từ 1 đến 6 đều thấy băng rõ nét kích thước

khoảng 170bp. Đậm độ băng điện di ở những mẫu mô ung thư vú khuếch đại được gen *survivin* không rõ sự khác biệt so với đậm độ vạch ở mẫu máu ung thư tương ứng khi cùng đưa 100ng RNA tổng số vào phản ứng RT-PCR.

### 3.2.2.2. Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong mô ung thư vú và mô u xơ vú

Dựa vào kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại gen *hMAM* và *survivin*, xác định tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong mô ung thư vú và mô u xơ vú.



**Hình 3.12: Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở mô nghiên cứu**

Nhận xét: Kết quả điện di RT-PCR khuếch đại *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở mô ung thư vú: *hMAM* có 36/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 83,7%), *survivin* có 32/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 74,4%). Ở mô u xơ tỷ lệ phát hiện được *hMAM* là 2/21 trường hợp (chiếm tỷ lệ 9,5%), *survivin* có 3/21 trường hợp (chiếm tỷ lệ 14,3%).

❖ **Mối liên quan giữa tỷ lệ biểu hiện hMAM mRNA trong mô ung thư với các yếu tố sinh học trong bệnh ung thư vú.**

**Bảng 3.4: Mối liên quan giữa tỷ lệ sao chép của hMAM mRNA trong mô ung thư với một số yếu tố sinh học liên quan đến ung thư vú**

Các yếu tố liên quan bệnh ung thư vú	n	hMAM (+)
<b>Tuổi</b>		
≤ 50	21	16/21(76,2%)
>50	22	20/22(90,9%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,19</i>
<b>Kích thước u</b>		
T <sub>1</sub>	10	9/10 (90,0%)
T <sub>2</sub>	17	13/17 (76,5%)
T <sub>3</sub> và T <sub>4</sub>	16	14/16 (87,5%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>P=0,5</i>
<b>Di căn xa</b>		
M <sub>0</sub>	38	31/38 (81,6%)
M <sub>1</sub>	5	5/5 (100%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,29</i>
<b>Di căn hạch</b>		
Không di căn hạch	13	10/13 (76,9%)
Có di căn hạch	30	26/30(86,7%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,4</i>
<b>Giai đoạn bệnh</b>		
I	8	7/8(87,5%)
II	19	15/19(78,9%)
III và IV	16	14/16(87,5%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,75</i>
<b>Thể mô bệnh học</b>		
Thể ống xâm nhập	29	27/29 (93,1%)
Thể tiểu thùy	8	5/8 (62,5%)
Thể nhầy	6	4/6 (66,7%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,06</i>
<b>Biến đổi CA 15-3</b>		
Không tăng	33	29/33(84,4%)
Có tăng	10	7/10 (70,0%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,5</i>

**Nhận xét:** Có 90% phát hiện được bản sao gen *hMAM* ở T<sub>1</sub>, ở nhóm T<sub>3</sub>,T<sub>4</sub> khi kích thước u lớn tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA là 87,5%, không thấy có sự khác biệt về tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA trong mô bệnh nhân ung thư vú theo kích thước u ( $p>0,05$ ). Những trường hợp M<sub>0</sub> có 81,6% phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA, những trường hợp M<sub>1</sub>, khi có biểu hiện di căn rõ trên lâm sàng có tỷ lệ 100% phát hiện có sự sao chép *hMAM*mRNA, không thấy sự khác biệt giữa tỷ lệ phát hiện được *hMAM* ở mô ung thư vú với tình trạng di căn ( $p>0,05$ ). Ở giai đoạn I đã phát hiện được 87,5% có sự sao chép *hMAM* mRNA, không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ phát hiện *hMAM* trong mô với các giai đoạn bệnh ( $p>0,05$ ). Trong số 13 trường hợp chưa phát hiện thấy di căn hạch có 10 trường hợp chiếm tỷ lệ 76,9% phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA, tỷ lệ sao chép *hMAM* mRNA ở nhóm di căn hạch và nhóm chưa di căn hạch khác biệt không có ý nghĩa thống kê (với  $p>0,05$ ). *hMAM* mRNA xuất hiện ở mô ung thư vú thể ống xâm nhập với tỷ lệ khá cao 93,1%, sự khác biệt về tỷ lệ biểu hiện *hMAM* ở các thể mô bệnh học không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ). Ngoài ra không có sự khác biệt về tỷ lệ sao chép *hMAM* mRNA ở mô giữa bệnh nhân ung thư vú có tuổi trên và dưới 50 tuổi, ở nhóm ung thư vú có tăng CA15-3 và nhóm CA15-3 không tăng (với  $p>0,05$ ).

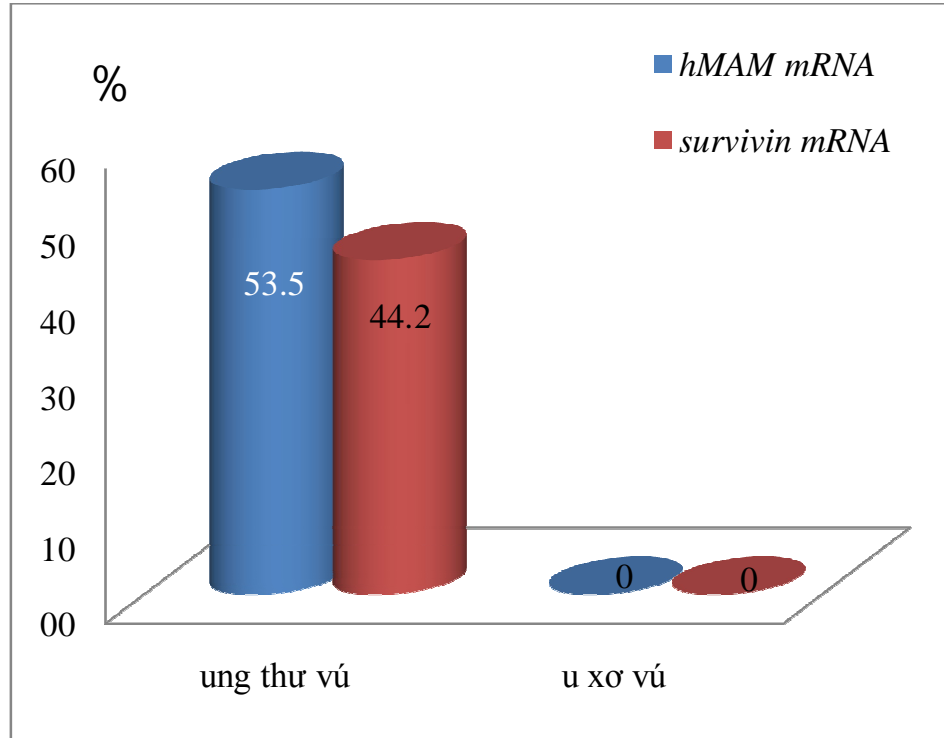
❖ **Mối liên quan giữa tỷ lệ biểu hiện *survivin* mRNA trong mô ung thư với các yếu tố sinh học trong bệnh ung thư vú**

**Bảng 3.5: Mối liên quan giữa tỷ lệ sao chép của *survivin* mRNA trong mô ung thư với một số yếu tố sinh học liên quan đến ung thư vú**

<b>Các yếu tố liên quan ung thư vú</b>	<b>n</b>	<b><i>Survivin</i> (+)(%)</b>
<b>Tuổi</b>		
≤ 50	21	16/21 (76,%)
>50	22	16/22 (72,7%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,7
<b>Kích thước u</b>		
T <sub>1</sub>	10	5/10 (50,0%)
T <sub>2</sub>	17	13/17 (76,5%)
T <sub>3</sub> và T <sub>4</sub>	16	14/16 (87,5%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,1
<b>Di căn xa</b>		
M <sub>0</sub>	38	28/38 (73,7%)
M <sub>1</sub>	5	4/5 (80,0%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,76
<b>Di căn hạch</b>		
Không di căn hạch	13	8/13(61,5%)
Có di căn hạch	30	24/30(80,0%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,2
<b>Giai đoạn bệnh</b>		
I	8	4/8(50,0%)
II	19	14/19(73,7%)
III và IV	16	14/16(87,5%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,13
<b>Thể mô bệnh học</b>		
Thể ống xâm nhập	29	24/29 (82,8%)
Thể tiểu thùy	8	4/8 (50,0%)
Thể nhầy	6	4/6 (66,7%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,15
<b>Biến đổi CA 15-3</b>		
Không tăng	33	26/33(87,8%)
Có tăng	10	6/10(60,0%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,2

**Nhận xét:** Trong số mẫu mô ung thư vú nghiên cứu, có 50% trường hợp phát hiện được bản sao gen *survivin* ở T<sub>1</sub>, không thấy có sự khác biệt về tỷ lệ phát hiện sự sao chép *survivin* mRNA trong mô bệnh nhân ung thư vú theo kích thước u ( $p > 0,05$ ). Có 73,7% mẫu mô ung thư vú chưa thấy di căn xa có sự sao chép *survivin* mRNA, không thấy sự khác biệt giữa tỷ lệ phát hiện được *survivin* mRNA ở mô ung thư vú với tình trạng di căn ( $p > 0,05$ ). Ở giai đoạn I đã phát hiện được 87,5% trường hợp có sự sao chép *survivin* mRNA, không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ sao chép *survivin* mRNA trong mô với các giai đoạn bệnh ( $p > 0,05$ ). Tỷ lệ sao chép *survivin* mRNA trong mô ung thư vú khác biệt ở nhóm di căn hạch và nhóm chưa di căn hạch không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Sự khác biệt về tỷ lệ biểu hiện *survivin* mRNA ở các thể mô bệnh học không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Ngoài ra không có sự khác biệt về tỷ lệ sao chép *survivin* mRNA ở mô giữa bệnh nhân ung thư vú có tuổi trên và dưới 50 tuổi, ở nhóm ung thư vú có tăng CA15-3 và nhóm CA15-3 không tăng ( $p > 0,05$ ).

**3.2.2.3. Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM mRNA* và *survivin mRNA* trong máu bệnh nhân ung thư vú và máu bệnh nhân u xơ vú**



**Hình 3.13: Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM mRNA* và *survivin mRNA* ở máu bệnh nhân ung thư vú và u xơ vú**

Tỷ lệ khuếch đại được *hMAM mRNA* trong máu bệnh nhân ung thư vú là 23/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 53,5%), *survivin mRNA* là 19/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 44,2%). Không phát hiện được bản sao *hMAM mRNA* và *survivin mRNA* trong máu bệnh nhân u xơ vú.

❖ **Mối liên quan giữa tỷ lệ biểu hiện hMAM mRNA trong máu với các yếu tố lâm sàng và cận lâm sàng liên quan đến ung thư vú**

**Bảng 3.6: Mối liên quan giữa tỷ lệ sao chép của hMAM mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú với một số yếu tố liên quan đến ung thư vú**

<b>Các yếu tố liên quan ung thư vú</b>	<b>n</b>	<b>hMAM(+) (%)</b>
<b>Tuổi</b>		
≤50	21	10/21(47,6%)
>50	22	13/22(59,1%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,45</i>
<b>Kích thước u</b>		
T <sub>1</sub>	10	3/10 (30,0%)
T <sub>2</sub>	17	7/17 (41,2%)
T <sub>3</sub> và T <sub>4</sub>	16	13/16 (81,2%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p= 0,02</i>
<b>Di căn xa</b>		
M <sub>0</sub>	38	18/38 (47,4%)
M <sub>1</sub>	5	5/5(100%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p= 0,027</i>
<b>Hạch</b>		
Không	13	5/13 (38,5%)
Có	30	18/30 (60,0%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,19</i>
<b>Giai đoạn bệnh</b>		
I	8	2/8 (25,0%)
II	19	8/19 (42,1%)
III và IV	16	13/16 (81,2%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,01</i>
<b>Thể mô bệnh học</b>		
Thể ống xâm nhập	29	16/29 (55,2%)
Thể tiêu thùy	8	3/8(37,5%)
Thể nhầy	6	4/6((66,7%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,52</i>
<b>Biến đổi CA 15-3</b>		
Không tăng	33	16/33(48,5%)
Có tăng	10	7/10(70,0%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p=0,23</i>



**Nhận xét:** Không có sự khác biệt về tỷ lệ sao chép *hMAM* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú ở nhóm tuổi trên và dưới 50 ( $p > 0,05$ ), không có sự khác biệt ở nhóm có di căn hạch và không có di căn hạch ( $p > 0,05$ ). Tỷ lệ biểu hiện của *hMAM* mRNA trong máu không liên quan đến biến đổi CA15-3 trong ung thư vú (với  $p > 0,05$ ). Tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA trong máu không liên quan đến các thể mô bệnh học khác nhau.

Tỷ lệ sao chép *hMAM* mRNA trong máu cao hơn ở giai đoạn muộn so với giai đoạn sớm, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,01$ . Kích thước u càng lớn, tỷ lệ phát hiện càng cao, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,02$ . Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA ở máu bệnh nhân ung thư vú khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm di căn và nhóm chưa phát hiện thấy di căn với  $p = 0,027$ .

❖ **Mối liên quan giữa tỷ lệ biểu hiện *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú với các yếu tố lâm sàng và cận lâm sàng**

**Bảng 3.7: Mối liên quan giữa tỷ lệ sao chép của *survivin* mRNA ở máu bệnh nhân ung thư vú với một số yếu tố liên quan đến ung thư vú**

Các yếu tố liên quan ung thư vú	n	<i>Survivin</i> (+) (%)
<b>Tuổi</b>		
≤50	21	6/21(28,6%)
>50	22	13/22(59,1%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,051
<b>Kích thước u</b>		
T <sub>1</sub>	10	2/10(20,0%)
T <sub>2</sub>	17	6/17(35,3%)
T <sub>3</sub> và T <sub>4</sub>	16	11/16(68,8%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,03
<b>Di căn xa</b>		
M <sub>0</sub>	38	15/38(39,5%)
M <sub>1</sub>	5	4/5(80,0%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,08
<b>Hạch</b>		
Không	13	3/13(23,1%)
Có	30	16//30(53,3%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,06
<b>Giai đoạn bệnh</b>		
I	8	2/8(25,0%)
II	19	6/19(31,6%)
III và IV	16	11/16(68,8)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,04
<b>Thể mô bệnh học</b>		
Thể ống xâm nhập	29	16/29(55,2%)
Thể tiêu thùy	8	2/8(25,0%)
Thể nhầy	6	1/6(16,7%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,1
<b>Biến đổi CA 15-3</b>		
Không tăng	33	16/33(48,5%)
Có tăng	10	3/10(30,0%)
<b>Tổng</b>	<b>43</b>	<i>p</i> =0,9

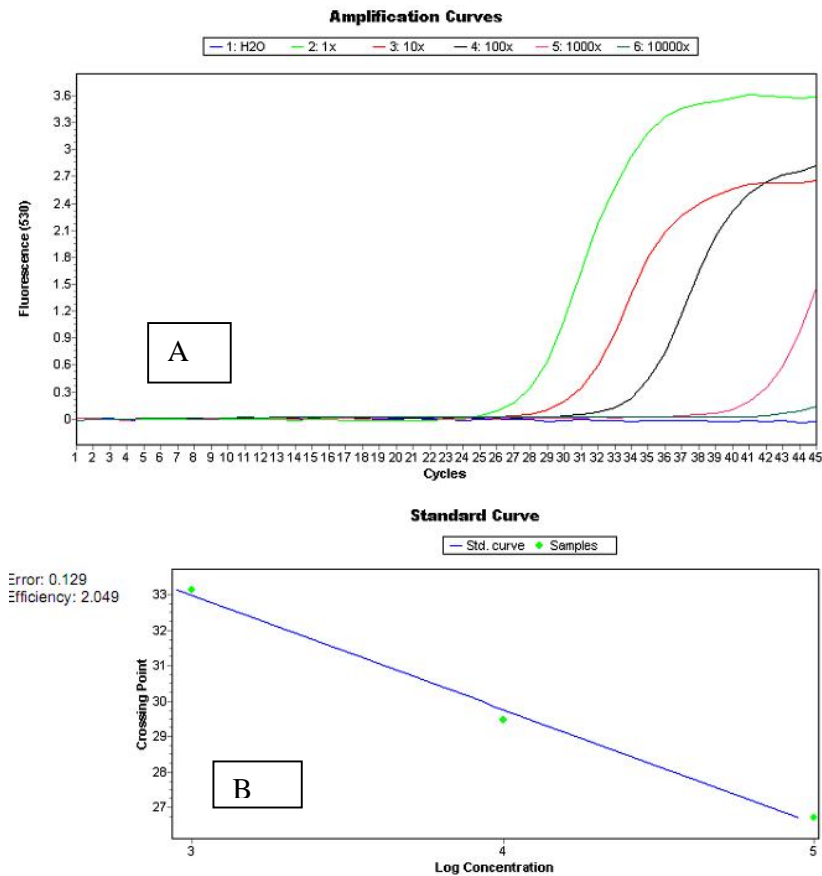
**Nhận xét:** Kết quả bảng 3.7 cho thấy tỷ lệ sao chép *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú có liên quan đến kích thước u, giai đoạn bệnh ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ phát hiện *survivin* mRNA ở nhóm có di căn xa khác biệt không có ý nghĩa thống kê với nhóm chưa thấy di căn xa ( $p > 0,05$ ). Không thấy sự khác biệt giữa tỷ lệ sao chép *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú với tuổi, di căn hạch, thể mô bệnh học, mức độ biến đổi CA15-3 ( $p > 0,05$ ).

### **3.3. Realtime PCR đánh giá mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong nhóm nghiên cứu**

#### **3.3.1. Xây dựng đường chuẩn xác định số bản sao từ dòng tế bào ung thư vú**

##### **❖ Đường chuẩn và ngưỡng phát hiện *hMAM* mRNA từ tế bào ung thư vú BT474**

Sử dụng dòng tế bào ung thư vú BT474: lấy 20.000 tế bào ung thư vú BT474, tách RNA, tạo cDNA, PCR nhân bản gen *hMAM* theo quy trình mục 2.2.3. Đo nồng độ sản phẩm PCR thu được 679 ng. Theo công thức tính số bản sao xây dựng đường chuẩn Realtime PCR mục 2.2.3.10, số bản sao cDNA của *hMAM* được tạo ra từ dòng tế bào ung thư vú BT 474 khoảng  $10^5$  bản sao. Pha loãng theo các tỷ lệ 10/100/1.000/10.000 đưa vào các ống phản ứng. Sau 40 chu kỳ kết quả xây dựng được đường chuẩn hình 3.14



**Hình 3.14: Realtime PCR *hMAM* cDNA xác định đường chuẩn trên dòng tế bào ung thư vú BT474**

A: Đường phản ứng    B: Đường chuẩn

**Nhận xét:** Kết quả xây dựng được đường chuẩn (Standard Curve) xác định số bản sao cho các nghiên cứu phát hiện *hMAM* mRNA. Dựa vào đường chuẩn này có thể tính được số lượng bản sao của *hMAM* mRNA sau khi có kết quả chu kỳ ngưỡng.

**Absolute Quantification****Settings**

Channel	530	Color Compensation	Off
Program	cycles	Method	Automated (F" max) Units

**Results**

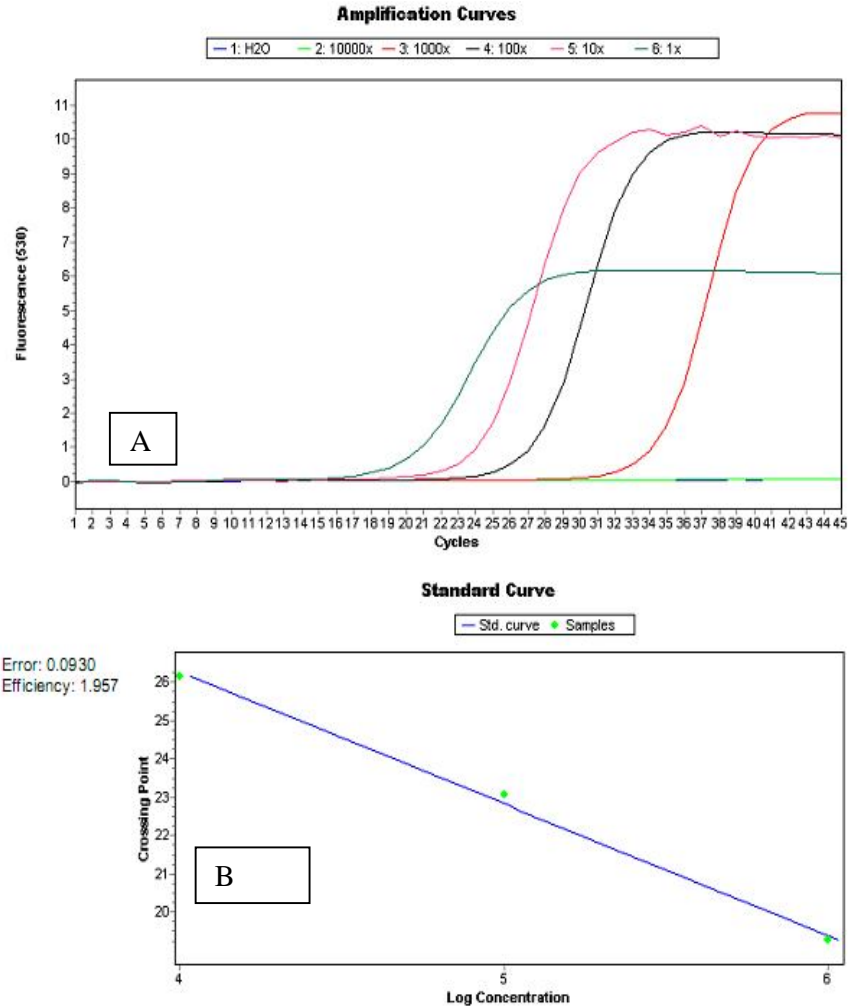
Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentratio	Standard
<input checked="" type="checkbox"/>	1	H2O	Unknown			
<input checked="" type="checkbox"/>	2	1x	Standard	26.72	8.93E4	1.00E5
<input checked="" type="checkbox"/>	3	10x	Standard	29.46	1.25E4	1.00E4
<input checked="" type="checkbox"/>	4	100x	Standard	33.14	8.93E2	1.00E3
<input checked="" type="checkbox"/>	5	1000x	Standard	>40.00	<6.50E0	1.00E2
<input checked="" type="checkbox"/>	6	10000x	Standard	>40.00	<6.50E0	1.00E1

**Hình 3.15: Realtime PCR *hMAM* cDNA xác định ngưỡng phát hiện trên dòng tế bào ung thư vú BT474**

**Nhận xét:** Đường chuẩn được tạo bằng đo CP ở 5 ống phản ứng. Ống 1x là ống cDNA *hMAM* được tạo từ 20.000 tế bào BT474, tương đương  $10^5$  bản sao. Ở mức pha loãng 100 lần, tương đương 200 tế bào ung thư vú thì phát hiện được, với CP là 33,14 và số bản sao 893, thấp hơn ngưỡng này được coi là không phát hiện được. CP càng thấp, số bản sao càng nhiều.

**❖ Đường chuẩn và ngưỡng phát hiện *survivin* mRNA từ tế bào ung thư vú MCF7**

Tương tự như quy trình xây dựng đường chuẩn và ngưỡng phát hiện bằng khuếch đại *hMAM* từ dòng tế bào ung thư vú BT474, ngưỡng phát hiện và đường chuẩn *survivin* sử dụng 20.000 tế bào MCF7 được thiết lập theo hình 3.16.



**Hình 3.16: Realtime PCR survivin cDNA xác định đường chuẩn trên dòng tế bào ung thư vú MCF7**

**A: Đường phản ứng      B: Đường chuẩn**

**Nhận xét** Kết quả xây dựng được đường chuẩn (Standard Curve) xác định số bản sao cho các nghiên cứu phát hiện *survivin* mRNA. Dựa vào đường chuẩn này có thể tính được số lượng bản sao của *survivin* mRNA ở các bệnh nhân nghiên cứu.

## Results

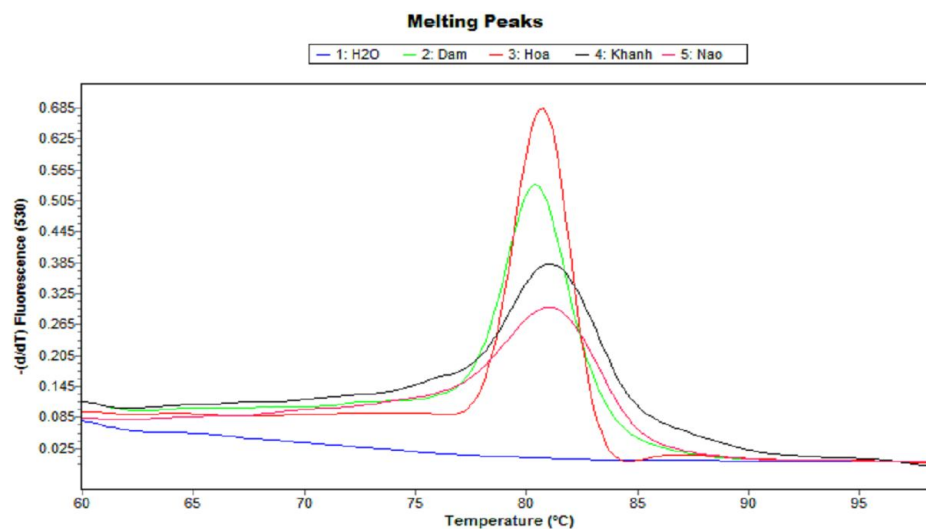
Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentratio	Standard
<input checked="" type="checkbox"/>	1	H2O	Unknown			
<input checked="" type="checkbox"/>	2	10000x	Unknown			
<input checked="" type="checkbox"/>	3	1000x	Unknown	33.19	[9.51E1]	
<input checked="" type="checkbox"/>	4	100x	Standard	26.14	1.08E4	1.00E4
<input checked="" type="checkbox"/>	5	10x	Standard	23.05	8.58E4	1.00E5
<input checked="" type="checkbox"/>	6	1x	Standard	19.28	1.08E6	1.00E6

**Hình 3.17: Real time PCR survivin cDNA xác định ngưỡng phát hiện trên dòng tế bào ung thư vú MCF7**

**Nhận xét:** Dựa vào phần mềm tính toán đã xác định được số lượng bản sao khuếch đại được từ các ống phản ứng. Ở mức pha loãng 100 tương đương 200 tế bào là ngưỡng thấp nhất phát hiện sự sao chép *survivin*. Ngưỡng Cp phát hiện *survivin* cDNA nhân bản được là 26,14, tương đương 1.08E4 bản sao.

*Phân tích kết quả Realtime PCR*

Dựa vào biểu đồ đỉnh của đường cong chảy (Melting Peaks) có thể đánh giá được sản phẩm nhân bản được có đúng là đoạn cDNA *hMAM* hay không.



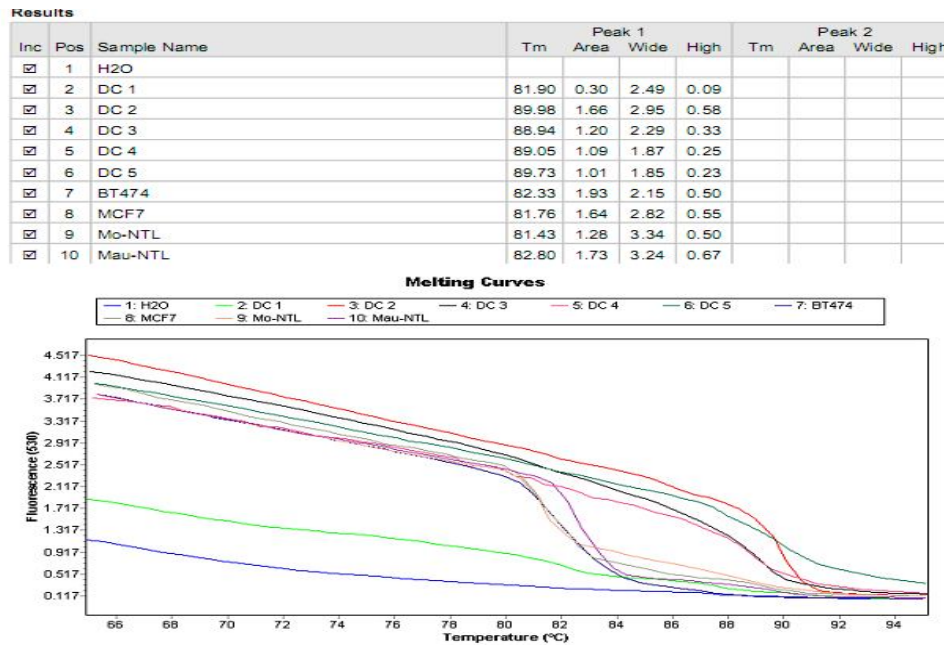
### Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				Peak 2						
			Tm	Area	Wide	High	Tm	Area	Wide	High			
<input checked="" type="checkbox"/>	1	H2O											
<input checked="" type="checkbox"/>	2	Dam	80.66	1.91	2.86	0.51							
<input checked="" type="checkbox"/>	3	Hoa	80.79	1.94	4.16	0.75							
<input checked="" type="checkbox"/>	4	Khanh	81.68	1.81	1.77	0.30							
<input checked="" type="checkbox"/>	5	Nao	81.55	1.39	1.84	0.24							

**Hình 3.18: Kết quả Tm nhân bản cDNA hMAM từ bệnh nhân ung thư vú.**

**Nhận xét:** Kết quả Tm nhân bản *hMAM* cDNA ở bệnh nhân ung thư vú khoảng 80,5-83,0°C, Tm này cũng tương đương với Tm khuếch đại *hMAM* ở dòng tế bào ung thư vú BT474, sản phẩm khuếch đại từ cDNA *hMAM* có Melting Peaks gần như nhau.





**Hình 3.19: Phân tích nhiệt độ chảy nhân bản gen hMAM ở bệnh nhân u xơ vú, dòng tế bào ung thư vú, máu và mô bệnh nhân ung thư vú.**

1: Nước (H<sub>2</sub>O)

2-6: Mô bệnh nhân u xơ vú (DC1,DC2,DC3,DC4,DC5)

7: Dòng tế bào ung thư vú BT474

8: Dòng tế bào MCF7

9: Máu mô bệnh nhân ung thư vú

10: Mẫu máu bệnh nhân ung thư vú

**Nhận xét:** Kết quả phân tích nhiệt độ chảy (Melting Cuves) cho thấy tại thời điểm cường độ huỳnh quang giảm đột ngột trùng khớp với Tm của sản phẩm khuếch đại trong ống phản ứng, ở bệnh nhân u xơ vú khác biệt với bệnh nhân ung thư vú và dòng tế bào ung thư vú. Như vậy, khi quan sát biểu đồ của nhiệt độ chảy, hoàn toàn có thể xác định Tm của sản phẩm khuếch đại trong ống phản ứng, giúp phân biệt sản phẩm của đoạn gen cần nhân bản với đoạn gen khác.

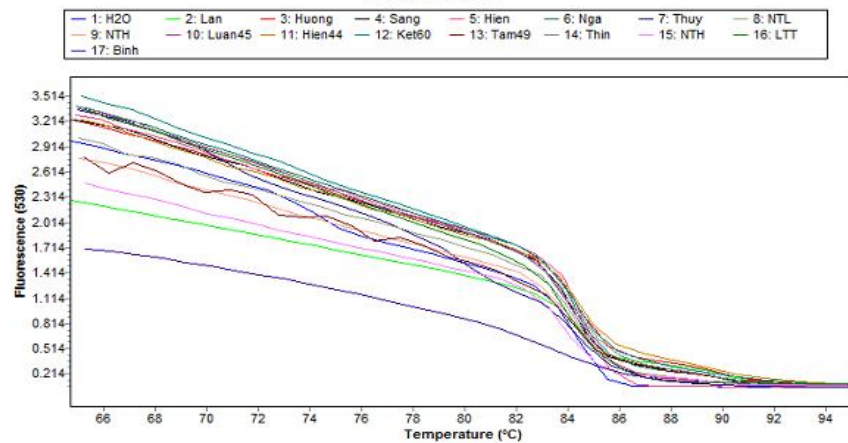
## Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				Peak 2			
			Tm	Area	Wide	High	Tm	Area	Wide	High
<input checked="" type="checkbox"/>	1	H2O	74.31	0.31	2.71	0.10	84.39	1.23	2.74	0.40
<input checked="" type="checkbox"/>	2	Lan	84.32	0.73	2.73	0.23				
<input checked="" type="checkbox"/>	3	Huong	84.52	1.05	2.80	0.34				
<input checked="" type="checkbox"/>	4	Sang	84.31	1.16	2.84	0.39				
<input checked="" type="checkbox"/>	5	Hien	84.77	1.52	2.85	0.51				
<input checked="" type="checkbox"/>	6	Nga	84.49	1.20	2.81	0.40				
<input checked="" type="checkbox"/>	7	Thuy	84.87	0.82	1.89	0.19				
<input checked="" type="checkbox"/>	8	NTL	84.49	1.18	2.58	0.36				

## Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				Peak 2			
			Tm	Area	Wide	High	Tm	Area	Wide	High
<input checked="" type="checkbox"/>	9	NTH	84.57	1.11	2.31	0.31				
<input checked="" type="checkbox"/>	10	Luan45	84.48	1.30	2.55	0.40				
<input checked="" type="checkbox"/>	11	Hien44	84.55	0.99	2.62	0.31				
<input checked="" type="checkbox"/>	12	Ket60	84.56	1.11	2.57	0.34				
<input checked="" type="checkbox"/>	13	Tam49	84.30	0.89	2.32	0.25				
<input checked="" type="checkbox"/>	14	Thin	84.50	1.11	2.42	0.32				
<input checked="" type="checkbox"/>	15	NTH	84.05	0.99	2.65	0.31				
<input checked="" type="checkbox"/>	16	LTT	84.51	1.24	2.31	0.34				
<input checked="" type="checkbox"/>	17	Binh	84.51	0.51	1.39	0.08				

## Melting Curves

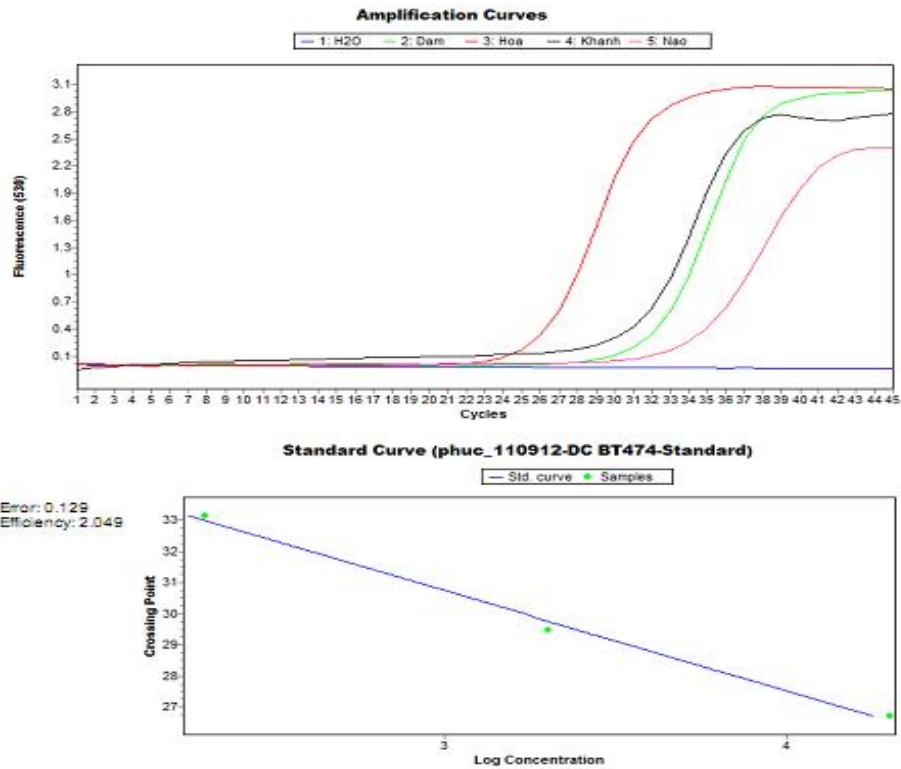


**Hình 3.20: Phân tích nhiệt độ chảy sản phẩm nhân bản gen *survivin* ở bệnh nhân ung thư vú**

1: Nước

2-17: Mẫu mô bệnh nhân ung thư vú

**Nhận xét:** Kết quả Tm nhân bản *survivin* cDNA ở bệnh nhân ung thư vú tương đối đồng nhất khoảng 84-85°C. Điều này chứng tỏ những sản phẩm là bản sao của đoạn gen *survivin* nhân bản được từ mô và máu bệnh nhân ung thư vú có nhiệt độ chảy Melting Cuves gần tương tự nhau.



### Results

Ino	Pos	Name	Type	CP	Concentratio	Standard
<input checked="" type="checkbox"/>	1	H2O	Standard			
<input checked="" type="checkbox"/>	2	Dam	Unknown	30.88	9.14E2	
<input checked="" type="checkbox"/>	3	Hoa	Unknown	24.74	[7.39E4]	
<input checked="" type="checkbox"/>	4	Khanh	Unknown	30.01	1.89E3	
<input checked="" type="checkbox"/>	5	Nao	Unknown	33.58	[1.30E2]	

**Hình 3.21: Đánh giá số lượng bản sao hMAM cDNA bằng Realtime PCR**

**Nhận xét:** Dựa vào đường ngưỡng, từ CP có thể tính được số lượng bản sao của sản phẩm khuếch đại ở cột Concentratio.

### 3.3.2. Mức độ sao chép *hMAM mRNA*, *survivin mRNA* ở mô ung thư vú

Để đánh giá mức độ sao chép của đoạn gen khuếch đại cần tiến hành xác định số bản sao sau cùng chu kỳ luân nhiệt, cùng lượng RNA tổng số (100 ng) đưa vào tạo cDNA. Bệnh nhân có CP càng thấp, số bản sao càng cao, cDNA đích càng nhiều.

**Bảng 3.8: Mức độ sao chép *hMAM mRNA*, *survivin mRNA* ở mô ung thư vú và mô u xơ**

Số bản sao	n	<i>hMAM mRNA</i> ( $\bar{X} \pm SD$ )	<i>Survivin mRNA</i> ( $\bar{X} \pm SD$ )
Mô ung thư	43	5.031E5±2.5888E6	8.278E4±174629
Mô u xơ	21	164 ±543	3733±11537

**Nhận xét:** Kết quả bảng 3.8 cho thấy giá trị trung bình số bản sao gen *hMAM* và *survivin* ở mô ung thư rất cao và không phân bố theo quy luật chuẩn. Để so sánh mức độ sao chép gen *hMAM* và *survivin* ở mô ung thư vú so với mô u xơ vú phải thực hiện trên kiểm định phi tham số (Nonparametric Tests) được sử dụng trong những trường hợp dữ liệu không có phân phối chuẩn, độ lệch chuẩn lớn, hoặc cho các mẫu nhỏ có ít đối tượng.

**Bảng 3.9: So sánh mức độ sao chép *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ vú**

**Mann-Whitney Ranks Test**

	Bệnh	n	Thứ hạng trung bình (Mean Rank)
Bản sao <i>hMAM</i> trong mô ung thư và mô u xơ	Ung thư vú	43	40,94
	U xơ vú	21	15,21
	Mann-Whitney U		88,500
	Đơn vị lệch chuẩn (Z)		-5,374
	Mức ý nghĩa thống kê		0,000

**Nhận xét:** So sánh bản sao *hMAM* trong mô

Thứ hạng trung bình của nhóm ung thư vú: 40,9

Thứ hạng trung bình của nhóm u xơ vú: 15,21

Mann-Whitney U=88,5, đơn vị lệch chuẩn (Z)=-5,374

Mức ý nghĩa quan sát (2 đuôi)  $p < 0,001$

Sự sao chép *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú cao hơn mô u xơ vú có ý nghĩa thống kê.

**Bảng 3.10: So sánh mức độ sao chép *survivin* mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ vú**

**Mann-Whitney Ranks Test**

	Bệnh	n	Thứ hạng trung bình (Mean Rank)
Bản sao <i>survivin</i> trong mô ung thư và mô u xơ	Ung thư vú	43	39,33
	U xơ vú	21	18,52
	Mann-Whitney U		158,000
	Đơn vị lệch chuẩn (Z)		-4,406
	Mức ý nghĩa thống kê		0,000

**Nhận xét:** So sánh bản sao *survivin* trong mô ung thư vú và mô u xơ vú

Thứ hạng trung bình của nhóm ung thư vú: 39,33

Thứ hạng trung bình của nhóm u xơ vú: 18,52

Mann-Whitney U=158,0 đơn vị lệch chuẩn (Z)=-4,406

Mức ý nghĩa quan sát (2 đuôi)  $p < 0,001$

Sự sao chép *survivin* mRNA ở mô ung thư vú cao hơn mô u xơ vú có ý nghĩa thống kê.

**3.3.3. So sánh mức độ sao chép *hMAM mRNA* và *survivin mRNA* trong máu và trong mô bệnh nhân ung thư vú**

**Bảng 3.11: Mức độ sao chép của *hMAM mRNA* và *survivin mRNA* trong máu và trong mô ung thư vú**

<b>Số bản sao</b> <b>Loại mRNA</b>	<b>n</b>	<b>Trong mô ung thư vú</b> <b>(<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>	<b>Trong máu ung thư vú</b> <b>(<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>
<i>hMAM</i>	43	5.031E5±2.5888E6	1.172E5±517494
<i>survivin</i>	43	8.278E4±174629	3.350E5±1.7815E6

**Nhận xét:**Trong cùng 100 ng RNA tổng số, giá trị trung bình số lượng bản sao gen *hMAM* ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú lần lượt là 5,031E5 và 1,172E5, Giá trị trung bình số lượng bản sao gen *survivin* ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú lần lượt là 8,278E4 và 3,350E5

**Bảng 3.12: So sánh mức độ sao chép *hMAM* mRNA ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú**

**Wilcoxon Signed Ranks Test**

		<b>n</b>	Thứ hạng trung bình (Mean Rank)
Bản sao <i>hMAM</i> trong mô- Bản sao <i>hMAM</i> trong máu	Ranks (-)	17 <sup>a</sup>	21,59
	Ranks (+)	19 <sup>b</sup>	15,74
	Ties	7 <sup>c</sup>	
	Tổng	43	
	Đơn vị lệch chuẩn (Z)		-0,534
Mức ý nghĩa thống kê (p)			0,593

a. Bản sao *hMAM* trong mô < Bản sao *hMAM* trong máu

b. Bản sao *hMAM* trong mô > Bản sao *hMAM* trong máu

c. Bản sao *hMAM* trong mô = Bản sao *hMAM* trong máu

**Nhận xét:** Để so sánh mức độ sao chép *hMAM* đồng thời trong mô và máu sử dụng phép kiểm định Wilcoxon ghép cặp, kết quả thu được:

Thứ hạng trung bình chênh lệch (-): 21,59

Thứ hạng trung bình chênh lệch (+): 15,74

Đơn vị lệch chuẩn  $Z = -0,534$

Ý nghĩa thống kê (2 đuôi)  $p = 0,593$

Không có sự khác biệt số bản sao *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú và máu ung thư vú với  $p > 0,05$ .



**Bảng 3.13: So sánh mức độ sao chép *survivin* mRNA ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú**

**Wilcoxon Signed Ranks Test**

		<b>n</b>	Thứ hạng trung bình (Mean Rank)
Bản sao <i>survivin</i> mRNA trong mô-	Ranks (-)	13 <sup>a</sup>	16,77
	Ranks (+)	19 <sup>b</sup>	16,32
Bản sao <i>survivin</i> mRNA trong máu	Ties	11 <sup>c</sup>	
	Tổng	43	
	Đơn vị lệch chuẩn (Z)		-0,860
	Mức ý nghĩa thống kê (p)		0,390

a. Bản sao *survivin* trong mô < Bản sao *survivin* trong máu

b. Bản sao *survivin* trong mô > Bản sao *survivin* trong máu

c. Bản sao *survivin* trong mô = Bản sao *survivin* trong máu

**Nhận xét:** Để so sánh mức độ sao chép *survivin* đồng thời trong mô và máu sử dụng phép kiểm định Wilcoxon ghép cặp, kết quả cho thấy:

Thứ hạng trung bình chênh lệch (-): 16,77

Thứ hạng trung bình chênh lệch (+): 16,32

Đơn vị lệch chuẩn Z= -0,860

Ý nghĩa thống kê (2 đuôi) p=0,39

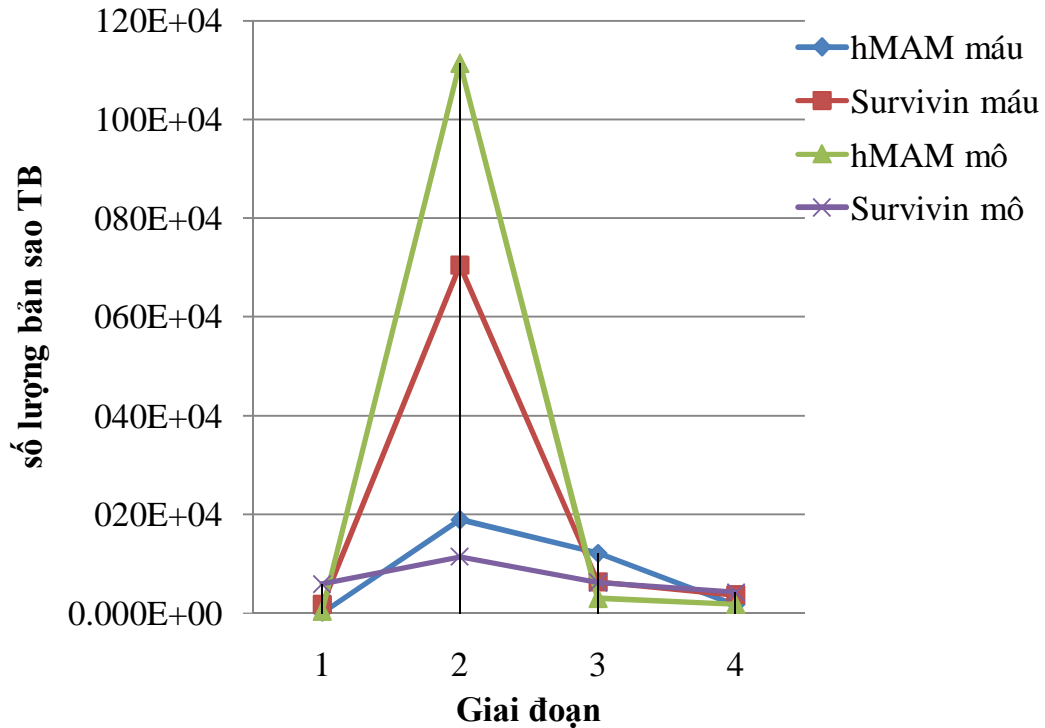
Không có sự khác biệt số bản sao *survivin* mRNA ở mô ung thư vú và máu ung thư vú với p>0,05.

**Bảng 3.14: Mối tương quan giữa mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô và máu bệnh nhân ung thư vú**

	<b>n</b>	<b>Hệ số tương quan (r)</b>	<b>Mức ý nghĩa thống kê (p)</b>
<b><i>hMAM</i> mRNA</b>	43	0,321	0,036
<b><i>survivin</i> mRNA</b>	43	0,479	0,001

**Nhận xét:** Để đánh giá mối tương quan giữa mức độ sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong mô và trong máu bệnh nhân ung thư vú, sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính đơn biến trong đó bản sao ở mô ung thư là biến độc lập, bản sao ở máu bệnh nhân ung thư vú là biến phụ thuộc. Kết quả bảng 3.12 cho thấy mức ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ , hệ số tương quan (r) giữa sự sao chép ở mô và máu của gen *hMAM* và *survivin* nằm trong khoảng (0,3-0,5) tương quan thuận ở mức trung bình.

### 3.3.4. Diễn tiến sự sao chép *hMAM mRNA*, *survivin mRNA* theo giai đoạn bệnh



**Hình 3.22:** Diễn tiến sự sao chép *hMAM mRNA* và *survivin mRNA* trong máu, mô theo các giai đoạn bệnh

**Nhận xét:** Trong 4 giai đoạn ung thư vú, giai đoạn 2 số bản sao cả *hMAM* và *survivin* đều lớn nhất sau đó giảm dần ở giai đoạn 3 và 4. Có sự tương đồng về sự tăng sao chép ở mô và ở máu. Khi ở mô có sự tăng bản sao *hMAM mRNA*, *survivin mRNA* thì cũng có sự tăng tương ứng của các bản sao trong máu.

## Chương 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Xây dựng quy trình phát hiện sự sao chép gen *hMAM* và *survivin* ở dòng tế bào ung thư vú nuôi cấy.

Ung thư vú là bệnh được phát hiện rất sớm từ những năm 1805, trong thời gian dài đã có nhiều thành tựu trong chẩn đoán, điều trị và thu được những thành công đáng kể nhưng cho đến nay ung thư vú vẫn còn nhiều trường hợp phát hiện muộn, mất khả năng sống thêm của bệnh nhân. Chính vì vậy, việc tìm ra các phương pháp mới chẩn đoán được sớm ung thư vú và nhất là có thể dự đoán được khả năng di căn của ung thư vú được coi là mục tiêu quan trọng nhất trong công tác phòng chống ung thư. Có nhiều phương pháp phát hiện tế bào ung thư vú, phương pháp được coi có độ nhạy cao là ứng dụng sinh học phân tử phát hiện gen ung thư từ đó có thể đánh giá mức độ tế bào ung thư trong mô, trong máu. Tuy nhiên để áp dụng kỹ thuật phát hiện mức độ sao chép gen ung thư trong mô và trong máu bệnh nhân ung thư thì cần phải xây dựng quy trình trên tế bào thực nghiệm đó là các dòng tế bào ung thư vú. Một trong những lợi ích chính của việc sử dụng các dòng tế bào nuôi cấy trong nghiên cứu ung thư là nó cung cấp một nguồn vô hạn của một quần thể tế bào tương đối đồng nhất có khả năng tự sao chép trong môi trường nuôi cấy tế bào tiêu chuẩn [73]. Dòng tế bào con người đầu tiên được phân lập trong phòng thí nghiệm Baltimore hơn 50 năm trước đây bởi George Gey dòng tế bào này là HeLa - đặt theo tên Henrietta Lacks, người phụ nữ đã cho tế bào ung thư cổ tử cung. Từ thành công của Gey mở đường cho nuôi cấy tế bào như chúng ta biết ngày hôm nay. Sự phát triển rộng rãi của nó thành một công cụ thử nghiệm quan trọng trong nghiên cứu ung

thư. Dòng tế bào ung thư vú đầu tiên được công bố là BT-20 vào năm 1958 bởi Lasfargues và Ozzello. BT-20 là dòng tế bào ung thư vú được phát hiện sớm nhất nhưng dòng tế bào ung thư vú phổ biến nhất, được ứng dụng rộng rãi trên toàn thế giới vẫn là MCF-7. MCF-7 được xác nhận vào năm 1973 bởi Soule và cộng sự tại Hội Ung thư Michigan, nên nó được mang tên nơi nghiên cứu ra nó (Michigan Cancer Foundation). Sự phổ biến của MCF-7 là phần lớn là do sự nhạy cảm với nội tiết tố estrogen (ER), làm cho nó trở thành một mô hình lý tưởng để nghiên cứu phản ứng hormone [73]. Đến nay đã có hàng chục dòng tế bào ung thư, mặc dù các dòng tế bào hiện nay có nguồn gốc, hình thức chỉ là một tập hợp con của bệnh ung thư nguyên phát nhưng tổng thể những dòng này là một mô hình đáng tin cậy để nghiên cứu các vấn đề cơ bản liên quan đến tăng trưởng tế bào, cái chết, và sinh học cơ bản của ung thư vú, nhiều tiến bộ trong sinh học ung thư vú đã được thực hiện bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư vú [74]. Các dòng tế bào được coi là xương sống cho những nghiên cứu về ung thư. Dòng tế bào ung thư vú có nguồn gốc từ con người, đóng vai trò rất quan trọng trong điều tra sinh học và di truyền, tuy không phản ánh đầy đủ đặc tính của khối u nguyên phát nhưng các dòng tế bào ung thư vú vẫn giữ được tính chất quan trọng của khối u khởi điểm trong thời gian dài, cung cấp mô hình phù hợp trong nghiên cứu y sinh học [75]. Hiện nay, trên thế giới đã phát hiện được rất nhiều dòng tế bào ung thư vú và rất nhiều gen được coi là đặc trưng cho tế bào ung thư vú. Tuy nhiên, chưa thấy có gen nào biểu hiện đồng thời ở tất cả các dòng ung thư vú [75], điều này chứng tỏ ung thư nói chung và ung thư vú nói riêng là bệnh lý hết sức phức tạp, đi sâu vào biểu hiện bệnh lý ở mức dưới tế bào có lẽ sẽ làm sáng tỏ phần nào nguyên nhân sinh bệnh từ đó mới có thể phát hiện sớm bệnh ung thư vú. Các yếu tố góp phần chẩn đoán ung thư vú, ngoài những dấu ấn là những protein,

enzym, thụ thể biểu mô, thụ thể nội tiết...Được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán bệnh, các dấu ấn sinh học phân tử có độ nhạy cao, liên quan đặc biệt đến ung thư vú như *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA đã được nghiên cứu nhằm phát hiện tế bào ung thư vú ở mô, ở máu, ở tủy xương, ở hạch...[76], [33]. Để có thể đưa kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện sự sao chép gen *hMAM*, gen *survivin* trong chẩn đoán bệnh ung thư vú, phải xây dựng được quy trình nhân bản, xác định ngưỡng phát hiện từ dòng tế bào ung thư vú. Sau khi lựa chọn bốn dòng tế bào ung thư vú là MCF7, BT474, MDA-MB231, KPL4, đây là các dòng ung thư vú thường được sử dụng để nghiên cứu mức độ biểu hiện của gen ung thư [77]. Tiến hành tách RNA tổng số. Độ tinh sạch của các mẫu RNA được đo trên máy Nano drope. Độ tinh sạch của phân tử RNA được xác định bằng các chỉ số hấp thụ quang phổ, dựa trên tỷ lệ  $OD_{260/280}$ . Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260nm của các mẫu RNA cho phép xác định nồng độ RNA trong dung dịch. Protein có độ hấp thụ cao nhất ở bước sóng 280nm và độ hấp thụ thấp ở bước sóng 260nm. Tỷ lệ  $OD_{260/280}$  biểu thị mức độ protein còn sót lại trong dịch chiết. RNA được coi là tinh sạch khi giá trị  $OD_{260/280}$  từ 1,7 đến 2,0. Sau khi thu được các RNA tổng số đủ điều kiện kỹ thuật tiến hành tạo cDNA dựa trên khuôn mẫu là các mRNA thực hiện bởi enzym phiên mã ngược bằng kỹ thuật RT-PCR. Để kiểm tra chất lượng cDNA tạo được tiến hành PCR với gen nội chuẩn *GAPDH* nhằm đánh giá chất lượng cDNA và loại trừ âm tính giả do chất lượng cDNA không đảm bảo, trong một số trường hợp *GAPDH* còn ước lượng tương đối nồng độ cDNA tạo được. Trong hình 3.1, sản phẩm RT-PCR với môi *GAPDH* ở cả bốn dòng tế bào là những băng rõ kích thước khoảng 307bp. Điều đó chứng tỏ các cDNA tạo được từ bốn dòng tế bào ung thư vú nuôi cấy đủ chất lượng để tiến hành phản ứng PCR với môi *survivin* và *hMAM*. Trên kết quả điện di hình 3.1, dòng tế bào KPL,

MCF7, BT474 khi được gắn với môi *hMAM R/F* sản phẩm PCR là băng rõ nét kích thước khoảng 202bp, dòng tế bào *MDA-MB231* không thấy sản phẩm. Như vậy *hMAM* được sao chép ở 3/4 dòng tế bào ung thư vú. Sản phẩm PCR với môi *survivin* cho thấy ở vị trí dòng tế bào *MDA-MB231*, MCF7, KPL4 có băng rõ nét kích thước khoảng 170bp, đây chính là kích thước gen *survivin* cần khuếch đại. Như vậy gen *survivin* cũng được sao chép ở 3/4 dòng tế bào ung thư vú nghiên cứu. Điều này chứng tỏ gen *survivin* và *hMAM* là những gen có độ biểu hiện cao ở dòng tế bào ung thư vú. Sản phẩm PCR thu được cho phép định hướng sản phẩm nhân bản được là đoạn gen *hMAM* và *survivin*, tuy nhiên để khẳng định chắc chắn cần giải trình tự sản phẩm PCR nhân bản được bằng môi *hMAM* và *survivin*.

Giải trình tự DNA giúp xác định trình tự của các nucleotide (A, G, C, T) trong một chuỗi DNA oligonucleotide. Năm 1975, trình tự DNA bộ gen đầu tiên được xác định là bacteriophage  $\phi$ X174 dài 5kb. Lần lượt sau đó các trình tự DNA khác được xác định là virus SV40 (dài 5kb, năm 1977), DNA ti thể người (16kb, 1981), bacteriophage lambda (47kb, 1982). Đến năm 1995, trình tự bộ gen sinh vật đầu tiên được xác định là vi khuẩn *Haemophilus influenza* với kích thước 1800kb. Chỉ 6 năm sau đó, Human Genome Project và công ty tư nhân Celera đã xác định được trình tự DNA bộ gen người với độ dài không dưới 3 tỷ cặp base. Cuộc cách mạng này đã tạo điều kiện phát triển kỹ thuật giải trình tự DNA số lượng lớn. Giải trình tự sẽ giúp trả lời câu hỏi gen *hMAM* và *survivin* khuếch đại được có phải là đoạn gen *hMAM*, *survivin* đã công bố tại ngân hàng gen không. Bước đầu tiên, xây dựng được trình tự nucleotide và trình tự amino suy diễn của đoạn gen nhân bản với cặp môi đó. Sau đó, sử dụng sản phẩm PCR sau khi đã tinh sạch được đưa vào máy xác định trình tự tự động ABI 3100 Avant (Applied Biosystems) và xác định trình

tự nucleotide. Từ kết quả chromas giải trình tự so sánh với đoạn gen thiết kế và so sánh với trình tự đoạn gen đã công bố trong ngân hàng gen bằng phần mềm BLAST hay FASTA. Trong nghiên cứu này giải trình tự được thực hiện ở một mẫu dòng tế bào, một mẫu mô ung thư vú, một mẫu mô u xơ vú, một mẫu máu ung thư vú đã nhân bản được đoạn gen *hMAM* và *survivin*, với mục đích xác định sản phẩm *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA được sao chép có khác biệt ở ung thư vú và u xơ vú hay không. Kết quả xác định trình tự nucleotide đã chứng minh sản phẩm PCR sau khi sử dụng cặp mồi *hMAM F/R* và *survivin F/R* chính là gen *hMAM* và *survivin* có độ tương đồng 100% so với gen *hMAM* đã đăng trong Ngân hàng gen quốc tế với mã số AY893203, AY888136, U33147... Tương đồng 100% so với gen *survivin* đã công bố với mã số: AY893903, AY893456, BD167854, BD 185366... Kết quả giải trình tự không những giúp ích cho kiểm tra cặp mồi, mà còn khẳng định đoạn gen *survivin* và *hMAM* nghiên cứu ở dòng tế bào ung thư vú, mô ung thư vú, mô u xơ vú, máu ung thư vú là đồng nhất không có đột biến cấu trúc, có lẽ sự xuất hiện *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA phát hiện được ở bệnh nhân ung thư vú là sự sao chép quá mức các mRNA, dẫn đến hậu quả tăng tổng hợp protein *survivin*, protein *hMAM*, những yếu tố được coi là nguyên nhân của sự phát triển hỗn loạn tế bào ung thư.

## **4.2. RT-PCR phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong mô và trong máu bệnh nhân ung thư vú**

### **4.2.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của nhóm ung thư vú nghiên cứu**

Để xác định sự sao chép của *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở tế bào ung thư vú, nghiên cứu đã được tiến hành trên mẫu mô và máu của 43 bệnh nhân ung thư vú, mẫu mô và máu của 21 bệnh nhân u xơ vú là chứng âm. Các mẫu mô và mẫu máu được lấy đồng thời trên cùng bệnh nhân để đảm bảo đối



chúng chặt chẽ. Quy trình lấy mẫu được quy định nhất quán trong tất cả các mẫu. Các bệnh nhân ung thư vú được phân loại theo tuổi, theo giai đoạn bệnh, mức độ di căn, các dạng mô bệnh học để tìm mối liên quan của gen nghiên cứu với các yếu tố lâm sàng trong bệnh ung thư vú. Một yếu tố được coi là nguy cơ mắc bệnh ung thư vú ở phụ nữ là tuổi. Ung thư vú là căn bệnh liên quan đến nội tiết, tỷ lệ mắc bệnh ung thư vú cao thường nằm ở thời kỳ ngay trước và ngay sau mãn kinh. Theo Nguyễn Bá Đức, tỷ lệ mắc ung thư vú cao ở tuổi trên 50 [3], theo nhiều nghiên cứu khác các tác giả thường lấy tuổi 50 làm mốc vì có sự biến đổi nội tiết rất lớn liên quan đến ung thư vú [62], [78], chính vì thế mà nghiên cứu chia tuổi theo nhóm trên và dưới 50 tuổi để tìm mối tương quan giữa nhóm tuổi có tỷ lệ ung thư cao với sự sao chép gen nghiên cứu. Lựa chọn hai nhóm tuổi sần sần như nhau từ 50 tuổi trở xuống chiếm tỷ lệ 48,8%, trên 50 tuổi chiếm tỷ lệ 51,2% là yếu tố thuận lợi trong tính toán thống kê. Ung thư vú có nhiều loại mô bệnh học khác nhau, nghiên cứu này chỉ đề cập đến ba loại phổ biến nhất trong thực tế là carcinom thể ống xâm nhập (chiếm 67,5%), carcinom thể tiểu thùy (chiếm 18,6%), carcinom thể nhày (chiếm 13,9%). Tỷ lệ carcinom thể ống xâm nhập cao phù hợp với thực tế đây là loại mô bệnh học hay gặp nhất chiếm tỷ lệ 65-80% [79]. Việc phân loại ung thư vú theo giai đoạn tiến triển, theo kích thước u, tình trạng hạch, mức độ di căn... rất quan trọng vì đây là các yếu tố tiên lượng liên quan đến mức độ nặng nhẹ của bệnh, tỷ lệ sống thêm... Trong nghiên cứu, bệnh nhân ung thư vú ở giai đoạn I là 18,6% và II là 44,2% còn lại là giai đoạn III và IV, tỷ lệ này phù hợp với thực tế lâm sàng các bệnh nhân ung thư vú đến khám và điều trị tại cơ sở y tế [4]. Một trong những dấu ấn khá đặc hiệu để chẩn đoán ung thư vú là CA15-3. Trong số 43 bệnh nhân ung thư vú có 10 bệnh nhân chiếm tỷ lệ 23,3% tăng CA15-3, kết quả này phù hợp với nghiên

cứu của Hoàng Văn Sơn, độ nhạy CA15-3 trong chẩn đoán ung thư vú không cao khoảng 30% chủ yếu có giá trị trong theo dõi điều trị [10]. Tuy nhiên tỷ lệ ung thư vú có tăng CA15-3 phụ thuộc vào giai đoạn bệnh[80]. Cho đến nay CA15-3 vẫn là dấu ấn sinh học chủ yếu góp phần chẩn đoán ung thư vú, liên quan đến thời gian sống thêm của bệnh nhân [81]. Mức độ tăng của CA15-3 có liên qua đến sự biểu hiện của gen ung thư trong đó có *hMAM*[82]. Tìm mối liên quan giữa mức độ sao chép của *hMAM* mRNA và *Suvivin* mRNA với các yếu tố lâm sàng và cận lâm sàng sẽ giúp ích cho chẩn đoán, tiên lượng bệnh ung thư vú.

Với số lượng mẫu nghiên cứu còn rất khiêm tốn, chưa phản ánh được tỷ lệ mắc bệnh theo tuổi nhưng nghiên cứu đã thu thập đủ số lượng mẫu cần thiết cho đề tài, có đủ các giai đoạn bệnh, các kích thước u từ nhỏ đến lớn, phù hợp với thực tế lâm sàng và với các kết quả trong nước về giai đoạn bệnh... phần nào dựng được bức tranh toàn cảnh về bệnh ung thư vú đảm bảo tính khoa học của nghiên cứu thực nghiệm.

#### **4.2.2. RNA tổng số, tổng hợp cDNA, điện di sản phẩm RT-PCR**

Trong những năm gần đây tỷ lệ tử vong do ung thư vú đã từng bước giảm dần là nhờ có thành tựu trong phòng bệnh, sàng lọc, chẩn đoán và điều trị, tuy nhiên vẫn còn 5% bệnh nhân có biểu hiện di căn trên lâm sàng và 30-40% có di căn ẩn mà không được phát hiện dẫn đến một tiên lượng xấu, lan tràn khối u không kiểm soát được [83]. Nhờ những hiểu biết mới về quá trình phát sinh, phát triển khối u ở mức độ phân tử. Những sự thay đổi về gen do những tác nhân nào đó bao giờ cũng xuất hiện sớm nhất, tiếp theo là những biến đổi cấu trúc và chức năng phân tử protein từ đó dẫn đến sự thay đổi hình thái chức năng của tế bào sự thay đổi này gây nên hậu quả là sự biến đổi hình thái, chức năng của các cơ quan và tác động đến toàn bộ hoạt động sống. Phát

hiện gen ung thư từ tế bào ung thư ở trong mô đã góp phần vào chẩn đoán, tiên lượng, theo dõi điều trị. Cách tiếp cận đầu tiên để phát hiện TBUTM là PCR phải dựa trên sự khuếch đại các dấu hiệu đặc trưng trong mô của khối u bất thường, sau đó dựa trên sự khuếch đại của mô bình thường, TBUTM dự kiến sẽ thể hiện các dấu hiệu liên quan đến nguồn gốc của khối u nguyên phát [16], vì vậy đầu tiên gen *hMAM* và *survivin* được nhân bản bằng kỹ thuật RT-PCR ở mô ung thư, mô u xơ... Kỹ thuật RT-PCR cho phép nghiên cứu các mRNA tồn tại với hàm lượng rất thấp, không thể phát hiện bằng các phương pháp cổ điển khác như Northern blot [16]. RT-PCR thường được coi là xét nghiệm nhạy nhất để phát hiện dấu ấn phân tử của khối u [84]. RT-PCR cũng cung cấp một độ đặc hiệu cao với thiết kế của cặp mồi đặc hiệu cho gen quan tâm. Không giống như DNA, RNA tự do là không ổn định và nhanh chóng bị phá hủy trong máu ngoại vi, sau tế bào chết hoặc trong quá trình thu thập mẫu máu. Ngoài ra, số lượng mRNA bản sao của một gen nhất định có thể khác nhau trong vòng đời và điều này có thể dẫn đến dương tính giả. Một trở ngại là RT-PCR cũng bị hạn chế bởi độ nhạy cảm rất cao của nó: mẫu bị nhiễm, bắt cặp ở cặp mồi không đặc hiệu có thể dẫn đến kết quả PCR khuếch đại dương tính giả và không thể phân biệt từ sản phẩm PCR từ mRNA nguyên vẹn hay 1 đoạn DNA. Để hạn chế những sai số không mong muốn trong quá trình làm thí nghiệm, các kỹ thuật cần chuẩn hóa, thận trọng, các sản phẩm điện di nghi ngờ phải được tiến hành kiểm tra lại ngay từ bước tách RNA tổng số. Tách RNA tổng số là quy trình khá phức tạp, đòi hỏi sự cẩn thận và chuyên nghiệp của kỹ thuật viên, sự thành công của việc nhân bản được gen nghiên cứu phụ thuộc rất lớn vào quy trình này. Để đánh giá mức độ sao chép của gen *hMAM* và *survivin* trong mô và trong máu ngoại vi bằng kỹ thuật sinh học phân tử, đầu tiên tiến hành tách chiết được RNA tổng số và tổng hợp cDNA. Quy trình tách RNA được chuẩn hóa đảm bảo tính ổn định và tính bền vững, không bị phân hủy trong suốt quá trình tiến hành nghiên cứu. Máu được lấy

trước khi mổ, sau khi lấy máu, cần tiến hành tách chiết RNA tổng số càng nhanh càng tốt, thông thường phải tách RNA trong vòng 4 giờ sau khi lấy máu. Mô ung thư vú sau khi lấy được bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  cho đến khi tiến hành tách chiết. Các phân tử RNA không bền, dễ bị phân hủy bởi các enzym là các ribonuclease (*RNase*). Hơn nữa, các *RNase* lại có mặt ở khắp nơi, có hoạt tính rất cao và rất bền vững với các tác nhân thường dùng để loại bỏ enzym (việc xử lý nhiệt ở  $90^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ không làm mất hoạt tính *RNase*). Vì những lý do đó, việc tách chiết RNA đòi hỏi nhiều biện pháp thận trọng trong điều kiện vô trùng, mọi dụng cụ, hóa chất đều được khử trùng. Nghiên cứu tách chiết RNA tổng số theo kit QIAGEN (QIAamp RNA Blood Mini Kit và Rneasy Mini Kit của hãng QIAGEN) là phương pháp có hiệu quả, tách được phân tử RNA có chất lượng cao, là quy trình tách chiết RNA theo như đã trình bày ở mục 2.2.3.4. Mục tiêu của nghiên cứu là tìm ra phương pháp để phát hiện sự có mặt các tế bào ung thư vú trong máu, tuy nhiên việc phát hiện ra các tế bào ung thư trong máu thực sự là một thách thức vì các tế bào ung thư tồn tại trong máu với số lượng rất thấp chỉ từ  $1 \text{ TBUTM}/10^3 - 1 \text{ TBUTM}/10^7$  tế bào bạch cầu. Để làm tăng khả năng thu được nhiều TBUTM từ máu, chúng tôi đã lựa chọn phương pháp ly tâm dựa vào gradient tỷ trọng theo nguyên tắc: phần nặng hơn (hồng cầu và bạch cầu đa nhân trung tính) sẽ di chuyển xuống dưới và phần nhẹ hơn (bạch cầu đơn nhân, các TBUTM và huyết tương) sẽ ở trên. Nếu không ly tâm ngay thì dưới tác dụng của độ dốc chất lỏng sẽ làm mất các TBUTM xuống dưới. Ly tâm 4.000 vòng trong 20 phút, hút bỏ phần huyết tương, thu lại phần có vòng trắng bạch cầu sẽ giúp cho thu thập thêm nhiều tế bào đơn nhân, với việc tách chiết sử dụng 250 $\mu\text{l}$  máu toàn phần để tách RNA tổng số so với 250 $\mu\text{l}$  máu có tách tế bào bạch cầu sẽ thu được lượng tế bào ung thư vú nhiều hơn. Kiểm tra chất lượng RNA tổng số thu được bằng điện di trên Agarose 0,8%, kết quả hình 3.8 cho thấy sản phẩm tách RNA có chất lượng hiển thị rõ 3 băng là các tiểu phân 28s, 18s, 5,8s. Ngoài điện di kiểm tra chất lượng, các mẫu

RNA tổng số còn phải kiểm tra bằng máy đo phổ kế, xác định độ tinh sạch và nồng độ RNA tách được, những mẫu có nồng độ RNA quá thấp phải được tiến hành tách lại đảm bảo đủ số lượng và chất lượng RNA tổng số cho các thí nghiệm tiếp theo. Trong mẫu tách chiết từ mô và máu thu được, phần lớn giá trị  $OD_{260}/OD_{280}$  từ 1,8 đến 2,0. Điều này cho thấy phương pháp tách chiết RNA trong nghiên cứu đã thu được sản phẩm RNA có chất lượng khá tốt có thể đáp ứng được yêu cầu để tổng hợp cDNA. So sánh nồng độ RNA thu được ở bệnh nhân ung thư vú và u xơ vú cho thấy lượng RNA tổng số ở mô (bao gồm mô ung thư và mô u xơ vú) nhiều hơn trong máu (bao gồm máu ung thư vú và máu bệnh nhân u xơ vú). Kết quả này phù hợp với thực tế ở mô là tổ chức đặc, số lượng tế bào thu được nhiều hơn trong máu. Tuy nhiên, không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ) về lượng RNA tổng số trong máu ung thư so với máu bệnh nhân u xơ vú, mô ung thư và mô u xơ vú. Như vậy bệnh nhân ung thư vú mặc dù có hiện tượng tăng sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA nhưng trên tổng thể các RNA không có sự khác biệt với bệnh nhân u xơ vú. Vì sự khuếch đại gen *hMAM* và *survivin* từ các nguồn không giống nhau: 30gr mô và 250 $\mu$ l máu được tách bạch cầu, nên cần phải chuẩn hóa đầu vào sao cho giống nhau giữa mô và máu để thuận tiện cho việc so sánh kết quả. Để thực hiện được sự chuẩn hóa này, sau khi đo OD để biết khối lượng RNA tổng số trong 1 $\mu$ l sẽ hiệu chỉnh bằng cách pha loãng hoặc bổ sung thêm sao cho có khoảng 100ng RNA tổng số trong 20 $\mu$ l ống phản ứng cDNA.

Quá trình tổng hợp cDNA dựa trên mẫu khuôn là RNA được thực hiện bởi enzym phiên mã ngược thu được 20 $\mu$ l cDNA. Sau mỗi lần tổng hợp cDNA, chất lượng sản phẩm cDNA được kiểm tra bằng phản ứng khuếch đại gen nội chuẩn *GAPDH* với cặp mồi đặc hiệu. *GAPDH* hiện diện ở mọi tế bào của cơ thể và thường được sử dụng để kiểm tra chất lượng của cDNA, loại trừ trường hợp âm tính giả do chất lượng cDNA không đảm bảo. Sau phản ứng khuếch đại,

nếu chất lượng cDNA không tốt, bị đứt gãy hay tạp nhiễm thì băng điện di trên agarose sẽ mờ, bờ không đều, xuất hiện các băng phụ. Kết quả điện di trên hình 3.9, 3.10, 3.11 cho thấy sản phẩm PCR với mỗi *GADPH F/R* thu được 1 băng sáng đậm có kích thước khoảng 307bp phù hợp kích thước theo tính toán thiết kế. Điều này chứng tỏ chất lượng RNA và quá trình tạo cDNA đã thành công, cDNA được tạo ra đáp ứng các điều kiện cần thiết cho quá trình nhân bản gen *hMAM* và *survivin* tiếp theo. Trong nghiên cứu với 43 mẫu mô ung thư vú, 21 mẫu mô u xơ là đối chứng âm. Kết quả điện di hình 3.9 cho thấy sản phẩm khuếch đại gen *hMAM* từ lượng RNA tổng số tương đối bằng nhau ở mô và máu là những băng có rõ nét kích thước khoảng 202bp, đậm độ vạch không rõ sự khác biệt ở những mẫu mô ung thư vú so với mẫu máu bệnh nhân ung thư vú. Có bệnh nhân ung thư vú thấy sự khuếch đại *hMAM* mRNA ở mô những không thấy sự khuếch đại ở máu. Kết quả điện di hình 3.10 cho thấy ở giếng 5,6,7 cho kết quả *hMAM* mRNA dương tính tuy nhiên sản phẩm thu được khi nhân bản ở mô ung thư vú là các băng có đậm độ rõ hơn ở mô u xơ. Điều này gợi ý *hMAM* được tăng cường sao chép ở mô ung thư hơn so với mô u xơ. Kết quả điện di RT-PCR khuếch đại gen *survivin* hình 3.11 là những băng có kích thước khoảng 170bp. Đậm độ băng điện di ở những mẫu mô ung thư vú khuếch đại được gen *survivin* không rõ sự khác biệt so với đậm độ vạch ở mẫu máu ung thư vú tương ứng. Dựa vào kết quả điện di sản phẩm RT-PCR có thể tính được tỷ lệ phát hiện gen *hMAM* và *survivin* trong nhóm nghiên cứu.

#### **4.2.3. Tỷ lệ sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong mô ung thư vú và mối liên quan với các chỉ số lâm sàng, cận lâm sàng trong bệnh ung thư vú.**

Ung thư cho đến nay vẫn được coi là bệnh nan y vì cơ chế bệnh học chưa rõ ràng, tiến triển của bệnh khó kiểm soát dẫn đến nhiều trường hợp khả

năng can thiệp của thầy thuốc hạn chế. Chỉ khi chúng ta hiểu được căn cơ cơ chế bệnh sinh, quá trình phát triển bệnh học thì mới có thể can thiệp một cách tốt nhất, hiệu quả nhất. Có rất nhiều vấn đề trong quá trình phát triển khối u mà chúng ta vẫn chưa thể hiểu rõ được. Mặc dù cơ chế sinh bệnh học ung thư vẫn chưa rõ ràng nhưng rất nhiều nhà khoa học đồng ý rằng sự phát sinh ung thư có nguồn gốc từ bệnh học phân tử, nó liên quan đến quá trình chết tế bào (apoptosis), liên quan đến các yếu tố tham gia quá trình sao chép (replication), quá trình phiên mã (transcription) và quá trình dịch mã (translation)...việc nghiên cứu phát hiện sự sao chép bất thường *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA phần nào gợi mở cho câu hỏi vẫn còn để ngỏ về bệnh học ung thư vú.

*hMAM* là 1 trong 23 thành viên của urteroglobin mã hóa tổng hợp protein dạng biểu mô gồm 93 acid amin với 2 liên kết N ở các vị trí glucosyl hóa. *hMAM* là protein tan trong nước, liên kết với 2 chuỗi carbohydrat có trọng lượng phân tử 23,4 và 16,2 KDa. Bằng kỹ thuật Western blot protein *hMAM* tồn tại ở mô ung thư vú dưới hai dạng 18 và 25 KDa. Các protein này được phát hiện cao hơn rất nhiều so với các u vú lành tính. Điều này khiến cho các nhà khoa học phải tìm hiểu sâu hơn về cơ chế phát sinh và vai trò của *hMAM* trong ung thư vú. Cho đến nay người ta vẫn chưa xác định được tác động rõ ràng của *hMAM* lên quá trình phát sinh, phát triển ung thư vú nhưng bằng kỹ thuật Northern Blot, RT-PCR đã chứng minh *hMAM* là giới hạn của tuyến vú lành tính và ung thư vú, nó được phát hiện ở 90% mô vú ung thư, độc lập với các thể mô học, ở những mô vú lành tính hoặc mô vú của người khỏe mạnh thì không phát hiện được *hMAM* hay phát hiện được ở mức rất thấp [85]. Trong số 43 mẫu mô ung thư vú nghiên cứu: có 36/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 83,7%) phát hiện được sự sao chép của *hMAM* mRNA. Kết quả này cũng gần tương đương với các nghiên cứu trước, tỷ lệ phát hiện

*hMAM*mRNA ở mô ung thư vú theo Rocella và cộng sự là 93% [60]. Theo Raica, bằng kỹ thuật RT-PCR, tỷ lệ phát hiện *hMAM* ở mô ung thư vú nguyên phát là 78,7% [86]. Theo Al Joudi và CS, tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú là 90% [85]. Với tỷ lệ phát hiện rất cao ở mô ung thư vú, *hMAM* mRNA là dấu ấn lý tưởng cho chẩn đoán bệnh ung thư vú. Việc phát hiện *hMAM* trên mô ung thư vú là một chứng dương quan trọng để tìm sự biểu hiện *hMAM* mRNA trong các TBUTM. Tổ chức không ung thư sử dụng làm đối chứng trong nghiên cứu là mô u xơ, có 21 mẫu. Sau khi tiến hành kỹ thuật RT-PCR trên mẫu mô u xơ nghiên cứu, có 2 mẫu (chiếm tỷ lệ 9,5%) phát hiện được bản sao *hMAM* mRNA. Như vậy *hMAM* mRNA có biểu hiện với tỷ lệ thấp ở mô u xơ vú. Theo nghiên cứu của Tạ Thành Văn và cộng sự khi nghiên cứu sự nhân bản của gen HIP, EGFR, những gen ung thư vú có tỷ lệ cao ở bệnh ung thư vú và có tỷ lệ rất thấp ở mô u vú lành tính [70]. Điều này chứng tỏ rằng một số gen được coi là đặc trưng cho ung thư vú cũng có thể phát hiện được ở tổ chức mô không ung thư. Vậy điều gì là sự khác biệt giữa sự sao chép ở tổ chức ung thư và không ung thư. Để làm sáng tỏ cần phải xác định sự khác biệt về mức độ sao chép và mối liên quan của gen nghiên cứu với các yếu tố lâm sàng, mô bệnh học trong bệnh ung thư vú. Hiểu được vai trò *hMAM* mRNA trong bệnh ung thư vú, phải tìm mối liên quan của *hMAM* với các yếu tố được cho là quyết định tình trạng nặng, nhẹ của bệnh như kích thước u, di căn hạch, giai đoạn bệnh, các thể mô bệnh học... Kết quả bảng 3.4 cho thấy, tỷ lệ biểu hiện của *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú rất cao, những trường hợp khối u rất bé <2cm (T1) đã phát hiện được 90% bản sao *hMAM* mRNA, ở giai đoạn I (giai đoạn rất sớm) tỷ lệ phát hiện được bản sao của *hMAM* mRNA 87,5%, những trường hợp chưa có di căn hạch là 76,7%.



Điều này gợi ý cho sự tăng cường sao chép *hMAM* xảy ra rất sớm ở mô ung thư và có thể sử dụng phát hiện *hMAM* mRNA trong mô để chẩn đoán sớm ung thư vú. Kết quả nghiên cứu chỉ ra không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ biểu hiện *hMAM* mRNA với kích thước u, di căn hạch, di căn xa, giai đoạn bệnh. Theo nghiên cứu của Rocella và CS, kết quả nghiên cứu trên 148 mẫu mô ung thư vú cho thấy tỷ lệ biểu hiện *hMAM* mRNA ở bệnh nhân ung thư vú có kích thước u <2cm là 63%, từ 2 đến 5cm là 56%, >5cm là 100%, không có sự khác biệt giữa tỷ lệ biểu hiện *hMAM* mRNA trong mô ung thư vú với kích thước u ( $p=0,75$ ), *hMAM* mRNA là một dấu ấn có độ nhạy cao phát hiện mô ung thư vú. Cũng theo Rocella, tỷ lệ biểu hiện của *hMAM* mRNA trong mô không liên qua đến tuổi ( $p>0,99$ ), các thể mô bệnh học ( $p=0,6$ ), tình trạng di căn hạch ( $p=0,5$ ) [78]. Theo nghiên cứu Fawwar, tỷ lệ phát hiện được *hMAM*mRNA ở mô ung thư vú không liên quan đến kích thước u, tình trạng hôn nhân, tiền sử gia đình mắc ung thư vú, thụ thể nội tiết PR, ER, HER ( $p>0,05$ ) [62]... Như vậy, *hMAM* mRNA được phát hiện với tỷ lệ rất cao và giai đoạn rất sớm của bệnh ung thư vú. Kết quả này mở ra triển vọng sử dụng *hMAM* mRNA như một dấu ấn mới góp phần chẩn đoán ung thư vú.

*Survivin* là gen nằm trong nhóm chất ức chế quá trình apoptosis. Ngoài *survivin* người ta đã tìm ra khoảng 80 gen liên quan đến ức chế quá trình apoptosis. Hiểu rõ vai trò của *survivin* trong mô bình thường so với các tế bào ác tính là rất quan trọng trong việc xác định chiến lược phá vỡ *survivin* trong tế bào ung thư làm cho điều trị antismurvivin có hiệu quả tối ưu nhất [44]. *Survivin* có sự sao chép quá mức ở hầu hết các khối u ác tính nhưng hiếm khi phát hiện được trong các mô trưởng thành bình thường. *Survivin* đã được chứng minh đóng một vai trò quan trọng trong phát hiện bệnh ung thư tiến triển, xác định

tiên lượng trong nhiều bệnh ung thư các loại [87]. Theo Spain tỷ lệ biểu hiện *survivin* mRNA ở mô ung thư vú từ 69,2 đến 93,8%, tỷ lệ này thay đổi theo giai đoạn bệnh [65]. Nghiên cứu trên 43 mẫu mô ung thư vú và 21 mẫu mô u xơ vú cho thấy tỷ lệ phát hiện *survivin* là 32/43 trường hợp (chiếm tỷ lệ 74,4%), ở mô u xơ vú là 3 trường hợp (chiếm tỷ lệ 14,3%). Theo Li[88] kết quả phát hiện *survivin* mRNA ở mô ung thư vú là 85%, không tương quan tuyến tính với tuổi, thể mô bệnh học, kích thước u, có liên quan đến di căn hạch. Theo kết quả bảng 3.5 cho thấy tỷ lệ biểu hiện *survivin* mRNA ở giai đoạn I là 50%, giai đoạn III và IV là 87,5%, tỷ lệ biểu hiện *survivin* mRNA không khác biệt ở các giai đoạn bệnh ( $p=0,13$ ). Ngoài ra tỷ lệ biểu hiện của *survivin* mRNA khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở các nhóm tuổi trên và dưới 50 tuổi ( $p=0,7$ ), ở các nhóm có kích thước u khác nhau ( $p=0,1$ ). Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ phát hiện *survivin* mRN còn được thấy ở nhóm có di căn xa và chưa phát hiện thấy di căn ( $p=0,76$ ), nhóm di căn hạch với nhóm chưa di căn hạch (với  $p=0,2$ ). Ở thể ống xâm nhập, mặc dù tỷ lệ phát hiện *survivin* mRNA rất cao 82,8% so với thể tiểu thùy 50%, nhưng sự khác biệt về phát hiện *survivin* ở các thể mô bệnh học không có ý nghĩa thống kê ( $p=0,15$ ). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước, biểu hiện *survivin* mRNA trong mô không liên quan đến tuổi, độc lập với các thể mô bệnh học [89]. Theo nghiên cứu của Span trên 275 mẫu mô ung thư vú cho thấy, tỷ lệ biểu hiện của *survivin* mRNA trong mô không liên quan đến kích thước u ( $p=0,46$ ), tình trạng di căn hạch ( $p=0,62$ ) [65]. Theo Yamashita, bằng kỹ thuật Realtime qPCR, đã chứng minh được trong các yếu tố: tuổi, tình trạng mãn kinh, kích thước khối u, các thể mô học, tình trạng thâm nhiễm mạch, thụ thể nội tiết PR, ER... thì tỷ lệ phát hiện *survivin* mRNA chỉ liên quan đến kích thước u ( $p=0,01$ ) [90]. Bằng kỹ thuật

sinh học phân tử, các nghiên cứu đưa ra các tỷ lệ khác nhau về sự phát hiện *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở mô ung thư vú, nhưng đều thống nhất là *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA được phát hiện ở mô ung thư vú với tỷ lệ khá cao và phát hiện ở giai đoạn sớm.

Mặc dù cho đến nay, mô bệnh học vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán bệnh ung thư vú tuy nhiên thủ thuật thực hiện trên mô ung thư có những hạn chế là không phải lúc nào cũng thực hiện được, nhất là trường hợp khối u quá nhỏ hoặc không có biểu hiện bên ngoài, những trường hợp sau phẫu thuật, tổ chức u không còn giữ nguyên môc giải phẫu nữa, có thể gây ra những biến chứng như gây đau, xuất huyết sau khi thực hiện thủ thuật, và đặc biệt là không thể tiến hành thường xuyên, lặp đi lặp lại được, dù xác định được tế bào ung thư tại mô ung thư thì cũng không xác định được tính chất di căn, tính chất được coi là quan trọng nhất, đặc trưng nhất của bệnh lý ung thư [91]. Vì vậy việc phát hiện gen ung thư từ các tế bào ung thư trong máu là hướng mới cho phát hiện sớm di căn ung thư vú, tìm hiểu tế bào ung thư trong máu sẽ giúp cho việc đánh giá mức độ di căn, giai đoạn bệnh một cách có hiệu quả hơn.

#### ***4.2.4. Tỷ lệ sao chép hMAM mRNA và survivin mRNA trong máu ung thư vú và mối liên quan với các chỉ số lâm sàng, cận lâm sàng trong bệnh ung thư vú***

Cơ sở sinh học phân tử của ung thư là sự thay đổi DNA dẫn đến thay đổi mRNA từ đó có những thông tin sai lạc đến quá trình tổng hợp protein gây nên hậu quả sinh sản vô tổ chức. Một đặc tính quan trọng nhất của ung thư là xâm lấn lan rộng, tế bào thoát mạch, di chuyển và di căn do hiện tượng phân bào. Các tế bào ung thư di chuyển (TBUTM) đã được chứng minh về vai trò

quan trọng trong bệnh ung thư vú. Nó có giá trị chẩn đoán, tiên lượng, dự báo di căn xa. Sự di chuyển tế bào ung thư qua mạch máu và hệ thống bạch huyết đến “sinh sôi nảy nở” các mô phụ thuộc vào sự thoát mạch và yếu tố vi môi trường. Biểu hiện gen thay đổi phụ thuộc vào đặc tính của khối u và có thể phân biệt TBUTM từ các tế bào bình thường khỏe mạnh. Mặc dù vẫn còn nhiều vấn đề cần làm sáng tỏ về những gen cụ thể của TBUTM, sự thay đổi mức độ biểu hiện gen do đa hình di truyền khối u nhưng phát hiện TBUTM vẫn đóng vai trò quan trọng trong sự nghiệp phòng chống ung thư [92]. Có nhiều phương pháp phát hiện TBUTM, trong đó RT-PCR được coi là phương pháp có độ nhạy, độ đặc hiệu cao đã được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới ghi nhận. Mặc dù nhân bản DNA ổn định hơn RNA và độc lập trên quá trình phiên mã, có thể được sử dụng như là một mục tiêu phát hiện TBUTM, tuy nhiên DNA tự do có thể được tìm thấy trong máu từ các tế bào chết, và tạo ra kết quả dương tính giả, như vậy chỉ có một vài sai lệch nhiễm sắc thể ở người bình thường là trở thành sai số trong việc phát hiện TBUTM. Chính vì thế, mRNA là mục tiêu chính hiện nay của kỹ thuật PCR, và sao chép ngược RT-PCR là phương pháp thường được sử dụng để phát hiện TBUTM[16]. Tuy nhiên, việc áp dụng kỹ thuật RT-PCR tìm sự có mặt của TBUTM không phải đơn giản, vì số lượng rất ít của TBUTM trong máu và độ nhạy cảm cao của kỹ thuật đôi khi dẫn đến âm tính hay dương tính giả. Hơn nữa, việc sử dụng kỹ thuật có độ nhạy cảm cao sau một thủ thuật xâm lấn cũng có thể dẫn đến dương tính giả, mặt khác thay đổi của độ nhạy PCR có thể dẫn đến âm tính giả. Một số lý do có thể giải thích thay đổi này: (i) TBUTM có thể không thể hiện điểm đánh dấu quan tâm do tính không đồng nhất vốn có của nó. (ii) Chất ức chế PCR có thể được tìm thấy trong các mô và dịch cơ thể và làm giảm sự nhạy cảm của các phản ứng. (iii) Các gen mục tiêu có thể được biến

đôi như một hệ quả của điều trị, cuối cùng dựa trên khả năng kết quả dương tính giả và âm tính giả sử dụng phương pháp RT-PCR không phải là dễ và cần có sự hiểu biết sâu sắc về vấn đề nghiên cứu [41]. Để khắc phục những hạn chế này, nghiên cứu phát hiện tế bào ung thư đồng thời cả trong mô và máu của bệnh nhân ung thư ngoài tính đồng nhất còn là tính chặt chẽ. Mô ung thư chính là đối chứng dương cho mẫu máu ung thư.

Sau quá trình nghiên cứu tỷ mỉ, kết quả RT-PCR mà chúng tôi nhân bản từ *hMAM* mRNA trên 43 mẫu máu ung thư vú là những băng rõ nét kích thước 202bp (hình 3.9). Nhìn sơ bộ, các băng nhân bản từ mẫu mô ung thư vú và mẫu máu ung thư vú tương ứng có kích thước và đậm độ như nhau. Tỷ lệ nhân bản *hMAM* mRNA trong số 43 mẫu máu của bệnh nhân ung thư vú có 23 mẫu phát hiện có sự sao chép *hMAM* mRNA chiếm 53,5%. Trong số 21 mẫu máu của bệnh nhân u xơ vú, không phát hiện được mẫu nào có bản sao *hMAM* mRNA. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Cheng, Shen, Rocella [7], [93]. Từ năm 1996, Watson và Fleming đã coi *hMAM* là ngưỡng để phân biệt người lành và ung thư vú. So sánh với kết quả nghiên cứu của Rocella và CS, thực hiện kỹ thuật RT-PCR lồng thì tỷ lệ biểu hiện *hMAM* mRNA ở máu ngoại vi là 12%, không thấy biểu hiện *hMAM* ở máu bệnh nhân u vú lành tính và người khỏe mạnh [60]. Theo nghiên cứu của Cheng Y (2014), bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR, *hMAM* được phát hiện ở trong máu bệnh nhân ung thư vú là 75,4%, không phát hiện thấy ở ung thư biểu mô khác, bệnh vú lành tính, cũng như người khỏe mạnh. Mức độ biểu hiện giảm đáng kể sau 7 ngày điều trị ( $p < 0,01$ ) [69]. Obermayr và CS (2010) sau khi nghiên cứu 6 gen được coi là liên quan đến ung thư ở phụ nữ như ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung đã kết luận rằng *hMAM* trong máu

chỉ đặc hiệu cho ung thư vú và là chỉ giới cho ung thư vú di căn với tỷ lệ phát hiện là 38,7% [94]. Theo Radwan, bằng kỹ thuật RT-PCR lồng đã phát hiện 50% sự sao chép *hMAM* trong máu bệnh nhân ung thư vú, không thấy sự sao chép gen này ở mô bệnh nhân u xơ vú và bệnh nhân khỏe mạnh, nghiên cứu sau 34 tháng cho thấy 5 bệnh nhân trong số có biểu hiện *hMAM* (+) xuất hiện di căn, những bệnh nhân *hMAM* (-) không phát hiện được trường hợp nào di căn trong cùng thời gian trên [95]. Một số nghiên cứu khác đánh giá rất cao vai trò của *hMAM* mRNA trong chẩn đoán bệnh ung thư vú, tỷ lệ phát hiện *hMAM* trong máu ngoại vi bằng kỹ thuật RT-PCR thông thường là 28%, trong đó 6% dương tính ở trường hợp không có bằng chứng của bệnh, khi sử dụng Realtime PCR kết hợp với “làm giàu” tế bào bằng IMS độ nhạy có thể đạt 62%, kết hợp thêm những gen khác tạo thành multimarker làm cho độ nhạy có thể đạt tới 84% [96]. Điều này chứng tỏ *hMAM* mRNA là một công cụ hữu ích cho việc phát hiện TBUTM trong bệnh ung thư vú, được coi là một dấu ấn tiềm năng trong phát hiện sớm tiền di căn, đánh giá lâm sàng về hiệu quả điều trị và theo dõi sau điều trị bệnh nhân ung thư vú [93]. Khi so sánh về tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú với giai đoạn bệnh cho thấy 2 trong tổng số 8 bệnh nhân ung thư vú giai đoạn I phát hiện được *hMAM* mRNA chiếm tỷ lệ 25%, tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA trong máu liên quan đến giai đoạn bệnh ( $p=0,01$ ). Tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA trong máu ở bệnh nhân ung thư vú có kích thước u rất bé, dưới 2cm là 30%. Có sự khác biệt về tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA trong máu theo kích thước u ( $p=0,02$ ), di căn xa ( $p=0,027$ ). Kết quả nghiên cứu cho thấy bằng phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA, tế bào ung thư vú trong máu được phát hiện thấy rất sớm khi khối u còn rất bé, chưa có biểu hiện di căn thực sự trên lâm sàng. Theo nghiên

cứu của Lee GW, tỷ lệ phát hiện *hMAM* mRNA trong máu giai đoạn I,II là 23,4%, giai đoạn III,IV là 82,9%, tỷ lệ biểu hiện *hMAM* mRNA trong máu liên quan đến di căn hạch, di căn xa, các thụ thể nội tiết [61]. Nakagawa và CS phát hiện TBUTM trong máu ở giai đoạn I là 29%, giai đoạn II là 45%, giai đoạn III là 77%, không phát hiện thấy TBUTM trong máu ở người bình thường [76].Grünewald K và CS đã chứng minh được *hMAM* trong máu là ngưỡng của ung thư vú và người bình thường khi nghiên cứu trên *hMAM*, EGFR, CK19, cho thấy tỷ lệ biểu hiện *hMAM* là 10% không cao bằng tỷ lệ CK19 48% nhưng *hMAM* không phát hiện thấy ở người bình thường, trong khi CK19 phát hiện thấy 25% ở người bình thường và 10% ở bệnh máu ác tính. *hMAM* liên quan đến kích thước u, di căn hạch trong khi các gen khác không thấy được sự liên quan này [97]. Theo nghiên cứu của Zao S (2013) trên 98 bệnh nhân ung thư vú và 60 người bình thường về mức độ biểu hiện của 3 gen *EpCAM*, *CK19*, *hMAM* thì biểu hiện của *hMAM* trong nhóm ung thư là cao nhất chiếm 69,4%, *EpCAM* là 51%, *CK19* là 43%, khi kết hợp 3 gen này tỷ lệ phát hiện TBUTM là 87%, tỷ lệ phát hiện liên quan đến di căn xa và hạch [82]. Theo Zehentne B, *hMAM* biểu hiện 80% ở mô ung thư vú, 61% ở mẫu máu ung thư vú, phát hiện protein mammaglobin trong máu 38%, không thấy mối liên quan giữa biểu hiện *hMAM* trong máu với kích thước u, giai đoạn bệnh, không phát hiện thấy *hMAM* trong máu người bình thường[98]. *hMAM* mRNA trong máu không những là yếu tố góp phần chẩn đoán ung thư mà còn tham gia với vai trò gợi ý cho sự di căn sớm ung thư vú. Phát hiện được tế bào ung thư trong máu ở giai đoạn sớm ngoài ý nghĩa tiên lượng khả năng di căn (giai đoạn Mx) mà còn giúp các nhà lâm sàng có quyết định điều trị phù hợp. Tỷ lệ phát hiện mRNA của *hMAM* trong các nghiên

cứu khác nhau ở nhiều nước trên thế giới, có thể còn do kỹ thuật tiến hành, phương pháp “làm giàu” tế bào, tình trạng nặng nhẹ của đối tượng tham gia nghiên cứu. Ở những nghiên cứu có tỷ lệ bệnh nhân ở giai đoạn sớm như giai đoạn 0, I cao thì tỷ lệ phát hiện thường thấp hơn. Tuy nhiên các nghiên cứu có chung một điểm là đã xác định được bản sao gen *hMAM* ở giai đoạn rất sớm và không phát hiện thấy *hMAM* mRNA ở trong máu không phải ung thư vú. Để giúp cho tiên lượng và lựa chọn phương pháp điều trị phù hợp, kỹ thuật xác định tế bào ung thư trong máu được các nhà lâm sàng đánh giá rất cao. Nhiều nghiên cứu cho thấy *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA từ các TBUTM còn có ý nghĩa về mặt tiên lượng, nghĩa là sự sao chép của các gen này có liên quan đến tuổi, kích thước u, giai đoạn bệnh... Theo nghiên cứu của nhiều tác giả đánh giá sao chép của một gen có ý nghĩa thấp hơn so với nghiên cứu kết hợp nhiều gen. Một gen *hMAM* khả năng phát hiện ung thư vú di căn hạch là 52%, không di căn hạch là 38%, khi kết hợp với Beta-HCG tỷ lệ phát hiện tăng lên 68% và 46% [99]. Như vậy sự kết hợp hai gen để chẩn đoán ung thư vú làm tăng độ nhạy lên rất nhiều.

Kết quả phát hiện *survivin* mRNA trong máu là 19 trường hợp chiếm tỷ lệ 44,2%. Không phát hiện thấy bản sao *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân u vú lành tính. Theo kết quả nghiên cứu của Yie SM và CS, tỷ lệ phát hiện *survivin* mRNA trong máu là 50,7% [100], không phát hiện thấy ở người khỏe mạnh. Sau khi nghiên cứu trên 76 bệnh nhân ung thư vú Yamashita và CS đã đưa ra kết luận *survivin* mRNA ở giai đoạn I là 16,1%, giai đoạn II là 33,3%, giai đoạn III là 88,8%, có sự liên quan giữa tỷ lệ phát hiện *survivin* trong máu với giai đoạn bệnh ( $p < 0,001$ ). *Survivin* mRNA trong máu còn liên quan đến kích thước u, di căn hạch [66]. Kết quả bảng 3.7 cho thấy tỷ lệ sao chép *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú giai đoạn I là 25%, giai



đoạn II là 31,6%, giai đoạn III và IV là 68,8%, sự liên quan giữa *survivin* mRNA trong máu và các giai đoạn bệnh là có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . *Survivin* mRNA phát hiện trong máu bệnh nhân ung thư vú khi khối u ở giai đoạn nhỏ dưới 2cm là 20%, từ 2 đến 5cm là 35,3%, trên 5cm là 68,8%, sự khác biệt về tỷ lệ phát hiện *survivin* mRNA theo kích thước u có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,03$ . Nghiên cứu cũng chứng minh được không có sự khác biệt về tỷ lệ phát hiện *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú với tuổi, thể mô bệnh học, sự tăng CA15-5, trình trạng hạch. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Yamashita[66].

**Bảng 4.1: Tỷ lệ phát hiện hMAM mRNA và survivin mRNA ở bệnh nhân ung thư vú trong một số nghiên cứu**

Tác giả	<i>hMAM</i> mRNA trong mô (%)	<i>hMAM</i> mRNA trong máu (%)	<i>survivin</i> mRNA trong mô (%)	<i>survivin</i> mRNA trong máu (%)
NC này	83,7	53,4	74,4	44,2
Spain			69,2 – 93,8	
Al Joudi	90,0			
Roccella	93,0	12,0		
Raica	78,7			
Li			85,0	
Cheng		75,4		
Yie				50,7
Zehentne	80,0	61,0		
Radwan		50,0		
Lin		30,0		
Shen		33,6		33,0
Grunewald		11		

Tóm lại, sử dụng kỹ thuật RT-PCR đã phát hiện được sự sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân ung thư vú ở giai đoạn sớm, tỷ lệ phát hiện liên quan đến kích thước u, giai đoạn bệnh.

#### **4.3. Realtime PCR đánh giá mức độ sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong nhóm nghiên cứu**

Có nhiều phương pháp đánh giá được mức độ sao chép của *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA, hiện nay thường dùng kỹ thuật Realtime PCR. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành kỹ thuật Realtime PCR sử dụng tín hiệu huỳnh quang SYBR Green thực hiện trên máy Light Cycle II của Roche. Realtime PCR là kỹ thuật PCR mà kết quả khuếch đại DNA đích hiển thị tại mỗi chu kỳ nhiệt của phản ứng. Nói chung có hai phương pháp đánh giá Realtime PCR: Xác định số lượng tuyệt đối và tương đối. Để định lượng tuyệt đối cần xây dựng đường cong chuẩn. Ngược lại để định lượng tương đối chỉ cần so sánh gen cần nhân bản với một gen tham chiếu gọi là gen nội chuẩn bởi vì nó có mặt ở khắp nơi trên cơ thể. Gen nội chuẩn nhiều nhất được sử dụng là *GAPDH* hoặc *Beta-actin*. Vấn đề quan trọng nhất là tìm được gen có độ nhạy cảm cao, biểu hiện nhiều ở bệnh nhân ung thư vú mà không biểu hiện ở người thường. Ưu điểm Realtime PCR so với PCR truyền thống: (i) Realtime PCR kiểm soát lượng huỳnh quang giải phóng ra trong phản ứng, từ đó có thể biết được lượng sản phẩm PCR tại từng thời điểm (chu kỳ) của quá trình khuếch đại, cho phép chúng ta định lượng số copy khởi đầu của khuôn mẫu với độ chính xác và độ nhạy cao trên một phạm vi động học lớn. Các kết quả của Realtime PCR có thể là chất lượng (sự có mặt hoặc không của trình tự đích) hoặc định lượng (số bản copy của DNA). Số liệu của Realtime PCR có thể đánh giá mà không cần điện di gel, thời gian thí nghiệm được rút ngắn và số lượng nguyên liệu đưa vào quá trình được tăng lên. Với PCR truyền thống, chỉ biết được lượng sản phẩm được khuếch đại ở thời điểm cuối

cùng của phản ứng bằng chạy điện di trên gel sau khi phản ứng PCR kết thúc. Mặt khác, gel agarose có nhiều hạn chế như độ phân giải thấp, do vậy kết quả định lượng thường không chính xác. (ii) Độ đặc hiệu của Realtime PCR cao hơn rất nhiều PCR truyền thống do sử dụng các mẫu dò đặc hiệu để phát hiện sản phẩm khuếch đại, trong khi đó PCR truyền thống chỉ phân biệt sản phẩm PCR dựa vào kích thước của các băng sản phẩm PCR trên gel. Trong phản ứng PCR, có nhiều trường hợp sản phẩm PCR không đặc hiệu cũng có kích thước bằng kích thước của sản phẩm PCR mong muốn, do đó chúng ta có thể nhầm lẫn [35]. (iii) Thời gian cho phản ứng Realtime PCR chỉ mất 1-2h, trong khi đó PCR truyền thống phải mất từ 3-5h. (iiii) Đặc biệt, Realtime PCR là hệ thống kín, do đó ít có nguy cơ tạp nhiễm. Nhờ có nhiều ưu điểm nên Realtime PCR là kỹ thuật nhạy cảm nhất để phát hiện TBUTM hiện nay[37]. Kết quả RT-PCR nhân bản *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA cho biết sự có mặt của gen nghiên cứu, nói một cách khác đó là kỹ thuật định tính. Muốn xác định mức độ nhân bản phải tiến hành kỹ thuật Realtime PCR định lượng bằng cách xây dựng đường chuẩn. Mức độ sao chép của *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA được tính bằng số bản sao trong mẫu mô hay mẫu máu nghiên cứu.

#### **4.3.1. Xây dựng đường chuẩn xác định số bản sao từ dòng tế bào ung thư vú**

Để xây dựng đường chuẩn (Standard Curve) phải dựa vào dòng tế bào ung thư vú có sự tăng cường sao chép gen nghiên cứu. Theo kết quả RT-PCR, dòng tế bào BT474 phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA nên có thể sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Sau khi đếm số lượng tế bào cụ thể/ml thực hiện các bước tạo RNA tổng số, tạo cDNA, PCR với môi *hMAM*, đo khối lượng sản phẩm thu được từ phản ứng PCR đây chính là lượng gen *hMAM* sau khuếch đại. Dựa vào công thức quy đổi từ khối lượng ra bản sao để tính được số lượng bản sao gen *hMAM* sau khuếch đại chia cho  $2^{25}$  (25 là số chu kỳ phản ứng PCR) sẽ được số lượng bản sao cDNA *hMAM* tách từ 20.000 tế bào BT474 lúc đầu. Pha loãng theo tỷ lệ: 1/10/100/1.000/10.000 đưa vào 5 ống

phản ứng Realtime PCR xây dựng được đường chuẩn phát hiện *hMAM* và ngưỡng phát hiện. Theo kết quả hình 3.14, 3.15 ở mức pha loãng 100 lần tương đương với 200 tế bào ung thư vú, Ct: 33,14, khoảng 893 bản sao là ngưỡng thấp nhất có thể phát hiện được sự sao chép *hMAM*. Theo nghiên cứu của Chen ngưỡng phát hiện TBUTM từ  $1/10^4$  đến  $1/10^7$  bạch cầu[60]. Theo Zehetner và CS, bằng kỹ thuật RT-PCR trộn dòng tế bào ung thư vú BT474 với 5ml máu bình thường khỏe mạnh thì ngưỡng phát hiện là 100 TB BT474/1ml máu, ngưỡng bản sao phát hiện được lớn hơn 1.000 [98]. Tương tự như xây dựng đường chuẩn phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA, sự sao chép *survivin* được thực hiện trên 20.000 tế bào ung thư vú MCF7. Vì sao lại chọn hai dòng tế bào khác nhau cho hai gen nghiên cứu? Vấn đề đặt ra là mặc dù có thể dùng một dòng tế bào có biểu hiện đồng thời cả hai gen như MCF7, KPL4; nhưng nếu chỉ sử dụng một dòng tế bào cho hai gen sẽ khó đánh giá được độ nhạy của kỹ thuật có tương đương ở những dòng tế bào khác nhau hay không. Việc lựa chọn hai dòng tế bào khác nhau để xây dựng độ nhạy và đường chuẩn sẽ đồng thời nghiên cứu được mức độ biểu hiện của gen ung thư trên các dòng tế bào ung thư vú. Quy trình tiến hành giống như quy trình xây dựng đường chuẩn phát hiện *hMAM* ở dòng tế bào ung thư vú BT474. Đường chuẩn phát hiện *survivin* từ dòng tế bào ung thư vú MCF7 được thiết lập theo kết quả hình 3.16, 3.17 với ngưỡng thấp nhất phát hiện được là 200 tế bào tương đương Ct là 26,14 và  $1,08E4$  bản sao.

Tóm lại, dựa vào dòng tế bào ung thư vú nghiên cứu đã xây dựng được đường chuẩn phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA từ dòng tế bào ung thư vú, đưa ra được ngưỡng thấp nhất phát hiện cho từng gen. Tuy có sự khác nhau về điểm cắt số lượng bản sao giữa trường hợp âm tính và dương tính của từng gen nhưng lượng tế bào ung thư tối thiểu để phát hiện được sự sao chép *hMAM* và *survivin* đều là 200 tế bào/1ml. Rất nhiều nghiên cứu cho rằng ngay cả khi Realtime PCR có điểm ngưỡng phân biệt các khối u và tế bào

bình thường, kỹ thuật này không cung cấp một đánh giá chính xác số lượng các tế bào ung thư trong mẫu do sự thay đổi trong tỷ lệ sao chép mRNA giữa các tế bào khối u [101]. Chính vì vậy để đánh giá mức độ sao chép gen nghiên cứu sử dụng đường chuẩn xác định số bản sao sẽ cung cấp thông tin chính xác và gần với thực tế hơn.

#### **4.3.2. Sao chép hMAM mRNA và survivin mRNA ở mô ung thư vú và mô u xơ vú**

SYBR Green có ưu điểm là độ nhạy cao do khả năng chèn vào sợi đôi cao nhưng không làm sợi đôi bị gắn chặt vào nhau khi bị biến tính, càng nhiều sợi đôi càng có nhiều sản phẩm PCR tạo ra thì tín hiệu huỳnh quang càng mạnh. Hạn chế của SYBR Green là chèn vào bất cứ sợi đôi nào trong ống phản ứng sau các chu kỳ luân nhiệt kể cả sợi đôi không phải là DNA đích do đó có thể dẫn đến những sản phẩm không đặc hiệu là sản phẩm không phải được khuếch đại từ DNA muốn nghiên cứu. Để khắc phục nhược điểm này phải dựa vào những yếu tố đặc trưng cho sản phẩm DNA nhân bản, phân biệt được bản sao là của DNA đích phải dựa vào nhiệt độ chảy (Melting-Tm). Là nhiệt độ làm cho sợi đôi DNA biến tính 50%, tức là nhiệt độ làm cho 50% sợi đôi biến tính hoàn toàn, nhiệt độ này phụ thuộc vào thành phần CG và độ dài của sợi đôi DNA đích. Thành phần CG càng nhiều, đoạn DNA càng dài, Tm càng cao [102]. Dựa vào biểu đồ Melting Peaks có thể đánh giá được sản phẩm nhân bản được có đúng là đoạn cDNA *hMAM* và *survivin* hay không. Dựa vào đặc trưng Tm sản phẩm cần nhân bản, đối chiếu trên Melting Peaks, Melting Cuves sẽ khắc phục được nhược điểm này. Kết quả hình 3.18, 3.19, 3.20, 3.21 cho thấy nhiệt độ đỉnh chảy sản phẩm nhân bản *hMAM* khoảng 80,5-83,0 nhân bản sản phẩm *survivin* khoảng 84,0-85,0. Nhiệt độ này tương đồng với Tm nhân bản *hMAM*, *survivin* từ dòng tế bào ung thư vú. Sau khi lựa chọn được sản phẩm đặc hiệu, đánh giá kết quả bản sao dựa vào đường

ngưỡng đã xác định và phần mềm tính toán tự động. Dựa vào kết quả bảng 3.6 cho thấy số bản sao *hMAM* mRNA được khuếch đại ở mô ung thư vú:  $5,031E5 \pm 2,5888E6$ ; mô u xơ vú  $164 \pm 543$ . Tương tự số bản sao của *survivin* mRNA được khuếch đại ở mô ung thư vú  $8,278E4 \pm 174,629$ ; mô u xơ vú  $3,733 \pm 11,537$ . Vì số bản sao không tuân theo quy luật chuẩn, để kiểm định sự khác biệt về mức độ sao chép của mô ung thư vú so với mô u xơ vú phải sử dụng kiểm định phi tham số Mann-Whitney cho kiểm định các trung vị. Kết quả cho thấy sự sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô ung thư vú cao hơn mô u xơ vú có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ . Năm 2004, Shi và CS đã chứng minh được *hMAM* được phát hiện ở mô ung thư vú, mô vú lành tính, không phát hiện thấy ở mô lành tính khác, mức độ biểu hiện của *hMAM* ở mô ung thư vú tăng gấp 10 lần so với mô u vú lành tính, sự tăng cường sao chép này liên quan đến tăng 345bp đầu tiên của promotor mã hóa [103]. O' Brien NA cho rằng *hMAM* mRNA ở mô ung thư vú cao gấp 10 đến 20 lần mô vú bình thường, hiếm khi ở các mô bình thường khác [104]. Mặc dù có sự sao chép ở mô u xơ nhưng mức độ sao chép rất thấp thể hiện ở kết quả bảng 3.8. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu trước, *hMAM* mRNA tăng rất cao ở mô ung thư vú và dòng tế bào ung thư vú [85]. Điều này gợi ý rằng sự tăng sao chép bất thường của các gen gây ung thư là nguyên nhân dẫn đến rối loạn trong bệnh lý ung thư mà hậu quả là sự mất cân bằng phát triển tế bào, mô, di căn đến tổ chức khác dẫn đến tử vong. Vấn đề đặt ra là ở mô lành tính cũng có bản sao của gen gây ung thư là *hMAM* và *survivin* thì sự khác biệt của nó là gì? Sự khác biệt gen gây ung thư (*hMAM* và *survivin*) trong biểu hiện và chức năng giữa mô ung thư và mô không ung thư ở chỗ, mặc dù chúng được thể hiện và được quy định trong các mô bình thường đặc trưng bởi tự đổi mới và phổ biến, biểu hiện của nó là thấp hơn đáng kể so với các tế bào ung thư. Điều này đặt ra câu hỏi về cơ chế tác động của *hMAM*, *survivin* lên các mô ung thư. Biểu hiện gen ung thư có thể cao hơn, đơn giản chỉ vì tế bào ung thư phát

triển nhân nhanh hơn dẫn đến sự tăng mức độ của các gen này trong nhiều bệnh ung thư. Tuy nhiên, sự có mặt của *survivin* và *hMAM* không được ghi nhận ở một số dòng ung thư, và một số bệnh nhân ung thư được xác định rõ cho thấy biểu hiện *survivin* và *hMAM* có thể không phải là một hệ quả trực tiếp của tăng sinh tế bào. Người ta cho rằng các con đường trong tế bào, kích hoạt *survivin* sao chép hoặc khỏi *survivin* mất kiểm soát có thể gây nên tính chất ác tính hơn trong các mô bình thường. Tương tác DNA-protein trong promoter *survivin* là khác biệt giữa tế bào bình thường và tế bào ung thư, cho thấy sự khác biệt trong quy định về biểu hiện *survivin*[44]. Để đánh giá mức độ sao chép còn nhiều điều cần phải nghiên cứu thêm, theo một số nghiên cứu biểu hiện của mRNA này không phải đơn thuần là do tăng trưởng tốc độ phân chia tế bào[85]. Mức độ sao chép *survivin* mRNA không tuyến tính với giai đoạn bệnh nhưng nó liên quan đến di căn, thời gian tái phát và thời gian sống thêm[90].

#### ***4.3.3. So sánh mức độ sao chép hMAM mRNA và survivin mRNA trong máu và trong mô bệnh nhân ung thư vú***

Vai trò TBUTM đến nay vẫn còn nhiều ý kiến khác nhau, người ta thấy rằng các tế bào khối u di chuyển theo đường máu là con đường cơ bản của sự di căn ung thư. Những nghiên cứu trong hơn hai thập kỷ qua cho thấy TBUTM đang được sử dụng như một dấu ấn sinh học có ý nghĩa chẩn đoán sớm tiên lượng, hướng dẫn điều trị, ví dụ như liệu pháp HER2 trong những trường hợp mô ung thư vú nguyên phát âm tính HER2. Chỉ với kết quả TBUTM chưa thể đánh giá được tình trạng di căn trong ung thư vú, một số trường hợp có rất nhiều TBUTM nhưng không có bằng chứng di căn, mặc dù vậy TBUTM đưa ra những cảnh báo gần cho sự di căn thực sự trên lâm sàng. Với hạn chế về số lượng rất hiếm trong máu, tính không đồng nhất khối u của các cá thể khác nhau, trường hợp ung thư vú biểu hiện gen này,

có ung thư vú biểu hiện gen khác, tuy nhiên Realtime PCR đại diện cho một phương pháp xâm lấn tối thiểu, có độ nhạy tối ưu cho việc phát hiện TBUTM giúp ích cho chẩn đoán bệnh, điều trị ung thư vú[105]. Để tìm hiểu mối tương quan giữa sự sao chép gen *hMAM*, *survivin* giữa mô và máu bệnh nhân ung thư vú đầu tiên cần phải hiệu chỉnh RNA tổng số đưa vào sao cho lượng RNA tổng số trong 20 $\mu$ l ống phản ứng tạo cDNA đồng nhất giữa mô và máu. Sau khi hiệu chuẩn đảm bảo RNA tổng số đưa trong tất cả các mẫu xấp xỉ 100ng, sử dụng kỹ thuật Realtime PCR với SYBR Green định lượng bản sao cDNA *hMAM* và *survivin* thu được theo bảng 3.10 thì số bản sao trung bình của *hMAM* trong máu ung thư vú: 1,170E5, số bản sao trung bình của *survivin* trong máu bệnh nhân ung thư vú là 3,350E5. Sử dụng kiểm định Wilcoxon Signed Ranks Test cho kết quả không có sự khác biệt về số lượng bản sao *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở mô ung thư vú và máu ung thư vú với  $p > 0,05$ . Mối tương quan giữa mức độ sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở trong máu bệnh nhân ung thư vú với mô ung thư vú là mối tương quan thuận ở mức trung bình với hệ số tương quan  $r$  từ 0,3-0,5 với mức ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ . Theo một vài tác giả mức độ biểu hiện của *hMAM* trong máu bệnh nhân ung thư vú cao gấp 8 lần so với bệnh nhân u vú lành tính [106]. Cho đến nay vẫn còn nhiều ý kiến khác nhau về vai trò và mối liên quan giữa mức độ biểu hiện của gen *survivin*, *hMAM* trong mô, trong máu bệnh nhân ung thư vú. Chúng tôi chưa thấy có nghiên cứu nào đánh giá tương quan giữa mức độ sao chép gen ung thư ở các tế bào ung thư trong mô với các tế bào ung thư lưu hành trong máu. Để tìm hiểu mối tương quan này cần được nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn tuy nhiên sự sao chép quá mức của các mRNA này ở mô và máu của bệnh nhân ung thư đều được các tác giả khác công nhận là cao hơn sự sao chép ở mô không ung thư.



Ở các giai đoạn bệnh khác nhau, không những khác nhau về tỷ lệ biểu hiện các gen *hMAM* và *survivin* mà còn khác nhau về mức độ biểu hiện. Theo kết quả hình 3.22, cho thấy số bản sao *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở mô ung thư vú tăng cao ở giai đoạn II, sau đó giảm dần ở giai đoạn III và IV. Trên biểu đồ diễn tiến của sự biến đổi mRNA trung bình của cả hai gen nghiên cứu có sự thống nhất ở một điểm: bản sao *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA ở trong mô tăng ở giai đoạn II thì trong máu cũng tăng ở giai đoạn II. Về sự tăng cao ở giai đoạn II vẫn còn nhiều điều cần phải nghiên cứu thêm, theo một số nghiên cứu biểu hiện của mRNA này không phải đơn thuần làm tăng trưởng tốc độ phân chia tế bào [85]. Có nhiều ý kiến khác nhau về đánh giá mức độ sao chép gen ung thư liên quan đến bệnh ung thư vú. Theo Evis S ở giai đoạn càng muộn thì tế bào ung thư trong máu càng nhiều do có sự xâm nhập tế bào ung thư đồng thời cả ở mô nguyên phát và mô di căn thứ phát vào máu dẫn đến tình trạng tăng tế bào ung thư ở giai đoạn muộn [107]. Một số ý kiến cho rằng các tế bào ung thư ở mô có khả năng sống sót cao hơn, các hoạt động trong tế bào mạnh mẽ hơn dễ dàng xâm nhập vào máu [20]. Trên thực tế, chúng tôi thấy nhiều trường hợp sự sao chép *hMAM* và *survivin* ở máu cao hơn ở mô (xem phụ lục). Mặc dù mRNA của gen đặc hiệu ung thư phản ánh sự có mặt của tế bào ung thư nhưng một số tác giả đã cho rằng số lượng bản sao mRNA không đánh giá chính xác số lượng tế bào ung thư trong mẫu vì sự thay đổi tỷ lệ sao chép giữa các các giai đoạn của tế bào khối u, chưa thấy có nghiên cứu nào đánh giá mức độ sao chép mRNA của tế bào ung thư vú với giai đoạn bệnh. Vì sao có sự tăng sao chép cả hai gen *hMAM* và *survivin* ở giai đoạn II. Có thể ở giai đoạn II sự sao chép quá mức của *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA dẫn đến sự tổng hợp bất thường các protein *hMAM*, *survivin* dẫn đến những rối loạn mất kiểm soát của bệnh lý ung thư, dẫn đến “mất phanh” kiểm soát sự chết theo chương trình [50], các tế bào tăng sinh hỗn loạn dẫn đến giai đoạn III và IV. Khi lượng protein *hMAM*, *survivin* tăng quá mức

sẽ tác động ngược trở lại vùng đáp ứng tín hiệu tế bào làm giảm quá trình sao chép *hMAM* và *survivin*. Đây là phản ứng bảo vệ chung của cơ thể. Sự tăng quá mức của *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA vẫn còn nhiều ý kiến khác nhau, cần phải được nghiên cứu rõ hơn để phân tích mối tương quan DNA, mRNA, protein, và promoter. Một số tác giả cho rằng sự tăng sao chép mRNA độc lập với kích thước u, giai đoạn bệnh, nhiều trường hợp tăng *hMAM* mRNA nhưng protein *hMAM* dưới ngưỡng, nhiều trường hợp protein *hMAM* rất cao nhưng *hMAM* mRNA âm tính[98]. Nhiều nghiên cứu cho thấy mối liên quan giữa tế bào ung thư trong máu với thời gian tái phát, khả năng sống thêm, thời gian tiến triển thành di căn thực sự trên lâm sàng. Trên thực tế có những trường hợp bệnh nhân được phát hiện sớm ở giai đoạn I, II sau phẫu thuật vài tháng phát hiện di căn xa. Những trường hợp di căn sớm như vậy đã được các nhà khoa học chứng minh là do quá trình vi di căn đã bị “che khuất” trong thời điểm chẩn đoán, nếu không phát hiện được sẽ dẫn đến thất bại trong điều trị. Ngoài khám vú, chụp vú..., các xét nghiệm sinh học phân tử phát hiện acid nucleic là một công cụ có giá trị để phát hiện ung thư vú ở bệnh nhân có khối u còn nhỏ, chưa có triệu chứng, dự báo di căn xa. TBUTM có thể được đưa đến rất nhiều cơ quan tuy nhiên quá trình di căn thực sự nhìn thấy được ở mức vĩ mô nhiều khi là ngẫu nhiên. Quá trình này diễn ra nhanh hay chậm, cơ quan lựa chọn “thứ cấp” của khối u ác tính phụ thuộc vào nhiều yếu tố sự thích nghi, sức đề kháng, sự chọn lọc ở mức độ cao, sự tương tác khối u với cơ thể sống, phản ứng tạo mạch, phản ứng miễn dịch, phản ứng viêm... tất cả đều ảnh hưởng tới các TBUTM và có sự khác nhau giữa các bệnh nhân ung thư dựa trên mô hình bệnh tật, tuổi mắc, bệnh đi kèm và tính chất di truyền cá thể[108]. Trên thực tế nghiên cứu, lượng TBUTM là rất hiếm. Người ta ước tính trong mỗi ml máu toàn phần có khoảng 5 tỷ tế bào hồng cầu, 10 triệu tế bào bạch cầu và chỉ có khoảng 10 TBUTM, phát hiện TBUTM là tìm chìa khóa cho chẩn đoán sớm ung thư. Có khoảng  $1.10^6$  tế

bào ung thư/mỗi gram mô ung thư xâm nhập vào máu mỗi ngày, sự xâm nhập này không liên tục, đại đa số các tế bào bị hủy trong lưu chuyển, hoặc trở nên bất hoạt ở các vị trí di căn xa do thiếu yếu tố tăng trưởng thích hợp. Tuy nhiên, chỉ cần một tế bào di căn có hoạt tính đến được vị trí được thiết lập nó kéo theo các tế bào ung thư tiếp theo và quá trình di căn ung thư được khởi động mạnh mẽ dẫn đến sự lan tràn đến rất nhiều cơ quan hậu quả của nó có thể dẫn đến tử vong[107]. Chính sự phức tạp của bệnh lý ung thư vú, sự không đồng nhất giữa các tế bào ung thư về sự sao chép mRNA, sự biến động ở các thời điểm tế bào ung thư di chuyển trong máu mà xác định tế bào ung thư vú trong máu gặp nhiều khó khăn và cần có thêm nhiều nghiên cứu chuyên sâu để làm rõ thêm về cơ chế bệnh học của tế bào ung thư vú.

Tóm lại, mặc dù còn có những hạn chế nhất định, các kết quả nghiên cứu đã đưa ra một bức tranh tổng thể về mức độ sao chép của *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong bệnh ung thư vú, cho thấy vai trò của *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong bệnh học phân tử ung thư vú. Kết quả nghiên cứu với hy vọng góp phần nhỏ bé trong việc phát hiện *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA như một dấu ấn có độ nhạy cao, ít xâm lấn, có thể kiểm tra nhắc lại nhiều lần khi cần thiết góp phần trong chẩn đoán ung thư vú, tiên lượng, phát hiện sớm di căn, ứng dụng trong vấn đề theo dõi điều trị ung thư vú.

## KẾT LUẬN

### 1. Sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA từ mô ung thư vú

- Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong mô ung thư vú lần lượt: 36/43 (chiếm tỷ lệ 83,7%), 32/43 (chiếm tỷ lệ 74,4%).

- Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM*mRNA, *survivin* mRNA trong mô u xơ vú lần lượt: 2/21 (chiếm tỷ lệ 9,5%), 3/21 (chiếm tỷ lệ 14,3%).

- Mức độ sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở mô ung thư vú cao hơn mô u xơ vú ( $p < 0,05$ ).

- Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở mô ung thư vú không liên quan đến tuổi, kích thước u, tình trạng hạch, giai đoạn bệnh, tình trạng di căn xa, các thể mô bệnh học, sự biến đổi CA15-3 ( $p > 0,05$ ).

### 2. Sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA từ tế bào ung thư vú lưu hành trong máu

- Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA, *survivin* mRNA trong máu ung thư vú lần lượt là: 23/43 (chiếm tỷ lệ 53,5%), 19/43 (chiếm tỷ lệ 44,2%).

- Không phát hiện được sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA trong máu bệnh nhân u xơ vú.

- Tỷ lệ phát hiện sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA ở máu liên quan đến kích thước u, giai đoạn bệnh ( $p < 0,05$ ).

- Mức độ sao chép của *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA không có sự khác biệt giữa máu và mô ung thư vú ( $p > 0,05$ ).

## **KIẾN NGHỊ**

Tiếp tục nghiên cứu sự sao chép *hMAM* mRNA và *survivin* mRNA với cỡ mẫu lớn hơn độ nhạy, độ đặc hiệu trong chẩn đoán sớm và theo dõi điều trị, để có thể ứng dụng các gen này trong chẩn đoán, theo dõi điều trị bệnh nhân ung thư vú.

## **DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Nguyễn Minh Hiền**, Phạm Thiện Ngọc, Lê Thị Minh Phúc, Lê Quang Huân (2012), Nghiên cứu phát hiện Survivin mRNA, hMAM mRNA từ các tế bào ung thư trong máu, *Tạp chí Y học Việt Nam*, tháng 8-số 2/2012, trang 5-12.
2. **Nguyễn Minh Hiền**, Phạm Thiện Ngọc, Lê Thị Minh Phúc, Lê Quang Huân (2012), Nghiên cứu sự sao chép (Transcription) gen Survivin từ các tế bào ung thư vú lưu hành trong máu, *Tạp chí Y học thực hành số 846-2012*, trang 204-208.
3. **Nguyễn Minh Hiền**, Phạm Thiện Ngọc, Lê Thị Minh Phúc, Lê Quang Huân (2013), Nghiên cứu phát hiện hMAM mRNA từ các tế bào ung thư vú trong máu, *Tạp chí ung thư học Việt Nam*, số 1-2013, trang 443-450.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thụy Liên (1991). Ung thư vú, *Bách khoa thư bệnh học*, 2, Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
2. Đặng Huy Quốc Thịnh (2013). Nhìn lại những tiến bộ trong chẩn đoán và điều trị ung thư vú. *Tạp chí Ung Thư học Việt Nam*, 1, 259-269.
3. Nguyễn Bá Đức, Nguyễn Chấn Hùng (2005). Tình Hình bệnh ung thư ở Việt Nam giai đoạn 2001-2004 qua ghi nhận ung thư ở 5 tỉnh thành Việt Nam, *Tạp chí Ung thư học*, 8.
4. Bùi Diệu và CS (2012). Gánh nặng bệnh ung thư và chiến lược phòng chống ung thư quốc gia đến năm 2020. *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, 1: 13-16.
5. Nguyễn Bá Đức (2003). Bệnh ung thư vú, Nhà xuất bản Y học.
6. MarquesARet al(2009). Detection of human mammaglobin mRNA in serial peripheral blood samples from patients with non-metastatic breast cancer is not predictive of disease recurrence. *Breast Cancer Res Treat*, 114(2), 223-32.
7. Shen Changxin et al (2009). The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR. *Clinbiochem*, 42(3), 194-200.
8. Chen C C et al (2006). Combination of Multiple mRNA Markers (PTTG1, Survivin, UbcH10 and TK1) in the Diagnosis of Taiwanese Patients with Breast Cancer by Membrane Array. *Oncology*, 70, 348-446.
9. Phạm Minh Thông và CS (2013). Điện quang can thiệp ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị ung thư. *Tạp chí Ung thư học*, 1, 17-21.
10. Hoàng Văn Sơn (2009). Đại cương về chỉ tổ ung thư. *Ý nghĩa lâm sàng của các xét nghiệm hóa sinh*. Hà nội, Nhà xuất bản Y học, 287-337.

11. Hoàng Văn Sơn (2004). On measurement of tumor markers in Vietnam. *Journal of Tumor Markers Oncology*, 53.
12. Sheri A and Dowsett M (2012). Developments in Ki67 and other biomarkers for treatment decision making in breast cancer. *Ann Oncol*, 23 Suppl 10, 219-27.
13. Tạ Văn Tờ và CS (2001). Nghiên cứu thụ thể phát triển biểu mô trong ung thư vú bằng nhuộm hóa mô miễn dịch. *Số đặc biệt chuyên đề ung bướu học*, phụ bản số 4(5), 23-28.
14. Đặng Thị Tuyết Minh, Trần Thị Vân Khánh, Nguyễn Thị Hà, Tạ Thành Văn (2008). Tăng cường sao chép Heparansulfate Interacting Protein (HIP) ở mô ung thư vú. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 53, 8-12.
15. Ross J Set al (2003). The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist*, 8(4), 307-25.
16. Noha G et al (2010). New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Oxford Journals Medicine British Medical Bulletin*, 94(1), 49-64.
17. Armakolas A et al (2010). Detection of the circulating tumor cells in cancer patients. *Future Oncol*, 6(12), 1849-56.
18. Zhang L, Riethdorf Set al (2012). Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 18(20), 5701-10.
19. Banys Met al (2013). Circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Chim Acta*, 423, 39-45.
20. Zach O et al (1999). Detection of circulating Mammary carcinoma cells in peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for Mammaglobin mRNA. *Journal of clinical oncology*, 17, 2015-2025.



21. Wang H et al (2013). Gene expression markers in circulating tumor cells may predict bone metastasis and response to hormonal treatment in breast cancer. *Mol Clin Oncol*, **1**(6), 1031-1038.
22. Lopez ME and Mendez MM (2013). Markers of circulating breast cancer cells. *Adv Clin Chem*, **61**, 175-224.
23. Marija B et al (2005). Cancer metastasis: advances in the detection and characterization of disseminated tumour cells facilitate clinical translation. *The National Medical Journal of India*, **18**(5), 250-5.
24. Somlo G et al (2011). Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage IV breast cancer, using a novel detection technology. *Breast Cancer Res Treat*, **128**(1), 155-63.
25. Grover PK, Price TJ, Hardingham E et al (2014). Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *Annals of Oncology*, **25**(4).
26. Jaeger BA et al (2014). Evaluation of two different analytical methods for circulating tumor cell detection in peripheral blood of patients with primary breast cancer. *Biomed Res Int*, 491-459.
27. Karhadkar M et al (2014). Circulating tumor cells in non-metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **147**(2), 325-333.
28. Krawczyk N, et al (2013). Circulating tumour cells in breast cancer. *Ecancermedicalscience*, **7**, 352.
29. Xiaoshen D, Massimo C, et al (2012). Circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer: a diagnostic tool for prognosis and molecular analysis. *Chinese journal of cancer research*, **4**, 388-398.

30. Bas F, Walter JB, Istvan V et al (2012). Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Research*, **14**:R133(5).
31. MartinMet al (2013). Circulating tumor cells following first chemotherapy cycle: an early and strong predictor of outcome in patients with metastatic breast cancer. *Oncologist*, **18**(8), 917-23.
32. AndreopoulouEet al (2012). Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system. *Int J Cancer*, **130**(7), 1590-7.
33. TewesMet al (2014). Detection of disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of patients with early-stage male breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*.
34. Awe JA, Wechsler J et al (2013). Three-Dimensional Telomeric Analysis of Isolated Circulating Tumor Cells (TBUTMs) Defines TBUTM Subpopulations. *Transl Oncol*, **6**(1), 51-65.
35. Nguyễn Văn Kinh, Nguyễn Tuấn Anh (2007). *Thực hành ứng dụng gen trị liệu*. Nhà xuất bản Y học.
36. Tạ Thành Văn (2010). *PCR và một số kỹ thuật y sinh học phân tử*. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học.
37. Lankiewicz S, Rivero BG and Bocher O (2006). Quantitative real-time RT-PCR of disseminated tumor cells in combination with immunomagnetic cell enrichment. *Mol Biotechnol*, **34**(1), 15-27.
38. Strati A, Markou A, Disclosures E (2013). Comparison of Three Molecular Assays for the Detection and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. *Breast Cancer Res*, **15**(2).
39. Pawlowski V et al (2000). A real-time one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction method to quantify c-erbB-2 expression in human breast cancer. *Cancer Detect Prev*, **24**(3), 212-23.

40. De Albuquerque A, Breier G, Krabisch P, Fersis N (2012). Multimarker Analysis of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Metastatic Breast Cancer Patients: A Step Forward in Personalized Medicine. *Breast Care (Basel)*, **7**(1), 7-12.
41. Andergassen U, Hutter S et al (2013). Detection of Circulating Tumour Cells from Blood of Breast Cancer Patients via RT-qPCR. *Cancers*, **5**, 1212-1220.
42. JiXQ et al (2006). Real-time quantitative RT-PCR detection of disseminated endometrial tumor cells in peripheral blood and lymph nodes using the LightCycler System. *Gynecol Oncol*, **100**(2), 355-60.
43. Baculoviral IAP Repeat Containing 5 (2013). *Genecards plus*.
44. Fukuda S and PelusLM (2011). Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *American Association for Cancer Research*, **5**.
45. Pavlidou A et al (2011). Survivin isoforms and clinicopathological characteristics in colorectal adenocarcinomas using real-time qPCR. *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(12), 1614-21.
46. Khan S et al (2014) Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer*, **14**: p. 176.
47. Berthelet J and Dubrez L (2013). Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells*, **2**(1), 163-87.
48. Li F (2003) Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol*, **197**(1), 8-29.
49. Wang Q et al (2013). Survivin up-regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP) through attenuating the suppression of p53 on NF-kappaB expression in MCF-7/5-FU cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **45**(9), 2036-44.

50. Ambrosini G, Altieri DC (1997). A novel anti- apoptosis gene, Survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, **3**.
51. XuCet al (2014). High survivin mRNA expression is a predictor of poor prognosis in breast cancer: a comparative study at the mRNA and protein level. *Breast Cancer*, **21**(4), 482-90.
52. KimHJet al (2013). Combinatorial molecular marker assays of WT1, survivin, and TERT at initial diagnosis of adult acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*, **91**(5), 411-22.
53. PavlidouAet al (2014). Validation of a real-time quantitative polymerase chain reaction method for the quantification of 3 survivin transcripts and evaluation in breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer*, **14**(2), 122-31.
54. Watson MA, Drazen BZet al (1998). Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to Chromosome 11q13. *Oncogene*, **16**(6), 817-824.
55. BelloneSet al (2013). Mammaglobin B (SCGB2A1) is a novel tumour antigen highly differentially expressed in all major histological types of ovarian cancer: implications for ovarian cancer immunotherapy. *Br J Cancer*, **109**(2), 462-71.
56. TassiRAet al (2009). Mammaglobin B is an independent prognostic marker in epithelial ovarian cancer and its expression is associated with reduced risk of disease recurrence. *BMC Cancer*, **9**, 253.
57. ZafrakasMet al (2006). Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies. *BMC Cancer*, **6**, 88.

58. Carletti AM et al (2006). Expression of human mammaglobin gene in pleural effusions of patients with malignant mesothelioma. *Thorax*, **61**(3).
59. ClassenLI et al (2012). Mammaglobin 1: not only a breast-specific and tumour-specific marker, but also a hormone-responsive endometrial protein. *Histopathology*, **61**(5), 955-65.
60. Roncella S et all (2005). Humam Mammaglobin mRNA is a Reliable Molecular Marker for Detecting Occult Breast Cancer Cell in peripheral Blood. *J.Exp. Clin.cancer Res*, **24**(2), 265-271.
61. LeeGWet al (2012). Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer. *Genet Mol Res*, **11**(4): p. 4034-42.
62. Fawwaz SA, Ismarulyusda I et al (2011). Expression of human mammaglobin and clinicopathologic correlations in breast cancer: The findings in Malaysia. *Indian journal Pathology and Microbiology*, **54**(2), 284-289.
63. Lin YC, Swei H, Yung FL et al (2005).Lack of correlation between expression of human mammaglobin mRNA in peripheral blood and known prognostic factors for breast cancer patients. *cancer science*, **94**(1), 99-102.
64. Tamm I et al (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, **52**(23), 5315-20.
65. Span PN et al (2004).Survivin Is an Independent Prognostic Marker for Risk Stratification of Breast Cancer Patients. *Clinical Chemistry*, **50**,1986-1993.
66. Yamashita SC et al (2007).Survivin Expression Predicts Early Recurrence in Early-stage Breast Cancer. *Anticancer Res*, **27**(4c), 2803-8.

67. FerroPet al (2010). Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors. *Anticancer Res*, **30**(6), 2377-82.
68. LiuYet al (2012). Expression of human mammaglobin as a marker of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *Exp Ther Med*, **3**(3), 550-554.
69. Chen Y et al (2010). Detection of cytokeratin 19, human mammaglobin, and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer. *Int J Biol Marker*, **25**(2), 59-68.
70. Phan Tôn Hoàng, Tạ Thành Văn (2005). Sự sao chép Heparansulfate Interacting Protein ở mô ung thư vú. *Tạp chí nghiên cứu y học*, **38**(5), 5-9.
71. [http://vi.scribd.com/doc/95544022/creating standar PCR](http://vi.scribd.com/doc/95544022/creating_standar_PCR).
72. [http://SciencePrimer.com/copy number calculator for Realtime PCR](http://SciencePrimer.com/copy_number_calculator_for_Realtime_PCR).
73. Deborah LH and all (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, **13**(4), 215.
74. TranAT et al (2013). Autophagy inhibitor 3-methyladenine potentiates apoptosis induced by dietary tocotrienols in breast cancer cells. *Eur J Nutr*.
75. ChekhunSet al (2013). Expression of biomarkers related to cell adhesion, metastasis and invasion of breast cancer cell lines of different molecular subtype. *Exp Oncol*, **35**(3), 174-9.
76. Nakagawa T et al (2007). *Detection of Ciculating Tumor Cell in Early-Stage Breast Cancer Metastassis to Axillary Lymph Nodes*. *Clin Cancer Res*, **13**(14).

77. YuCand Deng HY (2006). Effects of a JAK inhibitor, AG490, on proliferation and survivin expression of breast cancer cell line MDA-MB-231. *Ai Zheng*, **25**(10), 1227-31.
78. Roncella S et al (2006). Relationship between Human Mammaglobin mRNA Expression in breast cancer Tissue and Clinico- Pathologic Features of the Tumors. *J.Exp. Clin.cancer Res*, **25**(1), 65-73.
79. Đặng Thị Tuyết Minh (2010). *Nghiên cứu sự thay đổi của HEPARANSULFATE INTERACTING PROTEIN và EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) ở mô ung thư vú*. luận án tiến sỹ y học, trường đại học Y Hà Nội.
80. ZhengHand LuoRC(2005). Diagnostic value of combined detection of TPS, CA153 and CEA in breast cancer. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, **25**(10), 1293-1298.
81. ChenYet al (2011). Clinical and prognostic significance of preoperative serum CA153, CEA and TPS levels in patients with primary breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, **33**(11), 842-6.
82. ZhaoSet al (2013). Circulating tumor cells (CTCs) detected by triple-marker EpCAM, CK19, and hMAM RT-PCR and their relation to clinical outcome in metastatic breast cancer patients. *Cell Biochem Biophys*, **65**(2), 263-73.
83. De AlbuquerqueAet al (2012). Development of a molecular multimarker assay for the analysis of circulating tumor cells in adenocarcinoma patients. *Clin Lab*, **58**(5-6), 373-84.
84. XiLet al (2007). Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung cancers. *Clin Chem*, **53**(7), 1206-15.

85. Al JoudiFS (2014). Human mammaglobin in breast cancer: a brief review of its clinical utility. *Indian J Med Res*, **139**(5), 675-85.
86. RaicaMet al (2009). Analysis of the immunohistochemical expression of mammaglobin A in primary breast carcinoma and lymph node metastasis. *Rom J Morphol Embryol*, **50**(3), 341-7.
87. DuffyMJ, O'DonovanN et al (2007). Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett*, **249**(1), 49-60.
88. LiX, DangX and SunX (2012). Expression of survivin and VEGF-C in breast cancer tissue and its relation to lymphatic metastasis. *Eur J Gynaecol Oncol*, **33**(2), 178-82.
89. NasuSet al (2002). Survivin mRNA expression in patients with breast cancer. *Anticancer Res*, **22**(3), 1839-43.
90. YamashitaSet al (2007). Survivin expression predicts early recurrence in early-stage breast cancer. *Anticancer Res*, **27**(4C), 2803-8.
91. TurnerNet al (2014). Can biomarker assessment on circulating tumor cells help direct therapy in metastatic breast cancer? *Cancers (Basel)*, **6**(2), 684-707.
92. BolkeEet al (2009). Gene expression of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Eur J Med Res*, **14**(10), 426-32.
93. ChengMet al (2014). The clinical utility of circulating tumor cells in breast cancer patients: detection by a quantitative assay of h-MAM gene expression. *Int J Biol Markers*
94. ObermayrEet al (2010). *Assessment of a six gene panel for the molecular detection of circulating tumor cells in the blood of female cancer patients*. *BMC Cancer*, **10**, 666.
95. RadwanWMet al (2013). *Peripheral blood mammaglobin gene expression for diagnosis and prediction of metastasis in breast cancer patients*. *Asia Pac J Clin Oncol*, **9**(1), 66-70.



96. Zieglschmid V, Hollmann C and Bocher O (2005). *Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **42**(2), 155-96.
97. Grunewald K et al (2000). Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19. *Lab Invest*, **80**(7), 1071-7.
98. Zehentner B K et al (2004). Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA. *Clin Chem*, **50**(11), 2069-76.
99. Fabisiewicz A et al (2004). Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Acta Biochim Pol.*, **51**(3), 747-55.
100. Yie SM, Luo B, Ye NA, Xie K et al (2006). Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA. *Clinical and Experimental Metastasis*, **23**(5-6), 279-289.
101. Eroglu Z, Fielder O and Somlo G (2013). Analysis of circulating tumor cells in breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, **11**(8), 977-85.
102. Hồ Huỳnh Thùy Dương (2003). *Sinh học phân tử* Hà Nội: Nhà xuất bản giáo dục.
103. Shi C X et al (2004). The human SCGB2A2 (mammaglobin-1) promoter/enhancer in a helper-dependent adenovirus vector directs high levels of transgene expression in mammary carcinoma cells but not in normal nonmammary cells. *Mol Ther*, **10**(4), 758-67.
104. O'Brien N A et al (2005). Mammaglobin a in breast cancer: existence of multiple molecular forms. *Int J Cancer*, **114**(4), 623-7.

105. CastleJet al (2014). The significance of circulating tumour cells in breast cancer: A review. *Breast*.
106. ReinholzMMet al (2005).Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res*, **11**(10), 3722-32.
107. Lianidou ES and Markou A (2011).Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Detection Systems, Molecular Characterization, and Future Challenges. *Clinical Chemistry*, **57**(9), 1242-1255.
108. LiGet al (2011).Human mammaglobin: a superior marker for reverse-transcriptase PCR in detecting circulating tumor cells in breast cancer patients. *Biomark Med*, **5**(2), 249-60.