

land, Achim Heinecke, Thomas Buchner, Wolfgang Hiddemann. A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cyto-

genetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group. *Haematologica*, 2004;89: 408 - 418

Summary

APPLICATION PCR TECHNIQUE FOR ANALYSIS OF FUSION GENE TRANSCRIPTS IN THE ACUTE MYELOGENOUS LEUKEMIA PATIENTS

Objectives: Firstly apply PCR technique for analysis of fusion gene transcripts in the acute myelogenous leukemia patients. **Materials and method:** 19 patients with acute myelogenous leukemia were studied. RNA were extracted from leukemic cells and PCR for AML1/ETO, CBF β /MYH11, PMR/RAR α fusion transcript was done. **Results and conclusions:** AML1/ETO positive in 16% including 3 patients M4 and M4eo. CBF β /MYH11 positive in 11 % including 2 patients M4 and M2 with type F. PMR/RAR α positive in 11% including 2 patients M3 with Bcr3 (S type).

Keywords: fusion gene, AML1/ETO, CBF β /MYH11, PMR/RAR α , AML

Chú thích: Công trình này thuộc về đề tài nghiên cứu cơ bản của Bộ Khoa học Công nghệ: Nghiên cứu mối liên quan giữa những biến đổi gen đặc trưng với các đặc điểm lâm sàng và huyết học của bệnh nhân lơ xê mi cấp dòng tủy.

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT FISH PHÁT HIỆN GEN LẠI ABL/BCR Ở BỆNH NHÂN LƠ XÊ MI KINH DÒNG HẠT

Phạm Quang Vinh¹, Trần Công Hoàng², Nguyễn Quốc Cường², Bạch Khánh Hòa¹

¹Bộ môn Huyết học - Trường Đại học Y Hà Nội

²Viện Huyết học - Truyền máu Trung Ương

Phát hiện gen bệnh ABL/BCR có ý nghĩa trong chẩn đoán và theo dõi điều trị lơ xê mi kinh dòng hạt - một bệnh khá thường gặp. **Mục tiêu:** Ứng dụng kỹ thuật xét nghiệm FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) phát hiện sự có mặt gen ABL/BCR ở bệnh nhân lơ xê mi kinh dòng hạt. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 10 bệnh nhân lơ xê mi kinh dòng hạt được chẩn đoán bằng xét nghiệm máu và tủy. Sử dụng kỹ thuật xét nghiệm FISH với nhân tế bào gian kỳ (interphase) cho 5 bệnh nhân, xét nghiệm FISH với nhiễm sắc thể kỳ giữa cho 5 bệnh nhân, so sánh với kết quả xét nghiệm tế bào di truyền. **Kết quả:** Phát hiện gen ABL/BCR ở bệnh nhân có nhiễm sắc thể Ph1, hình ảnh đầu dò với gen ABL/BCR rõ ràng cả ở nhân tế bào interphase và nhiễm sắc thể metaphase. **Kết luận:** Áp dụng thành công kỹ thuật xét nghiệm FISH tìm gen lại ABL/BCR ở bệnh nhân lơ xê mi kinh dòng hạt. Sử dụng kỹ thuật FISH cho phép phát hiện gen bệnh ABL/BCR cả nhân tế bào interphase và nhiễm sắc thể metaphase.

Từ khóa: Lơ xê mi kinh dòng hạt. Gen lại ABL/BCR; Lai tại chỗ gắn huỳnh quang

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lơ xê mi kinh dòng hạt (lơ xê mi hạt kinh) là bệnh phổ biến nhất trong các bệnh thuộc hội chứng tăng sinh tủy. Đặc tính của bệnh là sự tăng sinh quá mức dòng bạch cầu hạt mà tế bào vẫn trưởng thành được. Khoảng 95% bệnh nhân có chuyển đoạn nhiễm sắc thể t(9; 22) (q34; q11) hình thành nhiễm sắc thể (NST) Ph1. Chuyển đoạn này mang oncogene ABL ở NST 9 đến nối với đoạn giữa của gen BCR trên NST 22 tạo nên gen lai ABL/BCR. Người ta thấy điểm gãy trên gen BCR ở vùng M (Major) gọi là M - BCR. Gen lai ABL/M - BCR mã hoá một protein có trọng lượng phân tử 210 KD có hoạt tính kinase mạnh hơn sản phẩm của gen ABL bình thường, làm tế bào tăng sinh và sinh bệnh [1,4]. Việc phát hiện NST Ph1 hay gen lai ABL/BCR đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán và theo dõi điều trị bệnh [3, 4]..

Thông thường phát hiện NST Ph1 bằng phương pháp tế bào di truyền [6]. Tuy nhiên hạn chế của phương pháp này là phải nuôi cấy, nhuộm băng và chỉ có thể phân tích được khi có tế bào phân bào, và tỷ lệ tế bào có gen bất thường này trên 1% [2] .

Hiện nay các trung tâm điều trị bệnh máu trên thế giới sử dụng kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction) và kỹ thuật FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) để phát hiện trực tiếp gen lai ABL/BCR. Các kỹ thuật này vừa cho phép phát hiện chính xác tổn thương gen gây bệnh, thời gian thực hiện nhanh, vừa có kết quả nhạy vì phát hiện cả khi không thể nuôi cấy tạo được cụm NST kỳ giữa, và khi tỷ lệ tế bào có tổn thương thấp [2]. Tuy nhiên ở Việt Nam chưa có các công bố về việc ứng dụng kỹ thuật FISH để phát hiện gen bệnh gây lơ xê mi kinh dòng hạt. Vì vậy chúng tôi tiến hành đề tài nhằm mục tiêu:

Sử dụng kỹ thuật FISH xác định gen lai ABL/BCR ở tiêu bản tế bào gian kỳ (interphase) và tiêu bản nhiễm sắc thể (metaphase) trong bệnh lơ xê mi kinh dòng hạt.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

- 10 bệnh nhân lơ xê mi kinh dòng hạt được chẩn đoán bằng phương pháp hình thái và hóa học tế bào. Các mẫu máu và tủy của bệnh nhân được nuôi cấy phân tích NST Ph1 bằng kỹ thuật tế bào di truyền, nhuộm băng G [6].

Trong đó:

+ 5 bệnh nhân được xét nghiệm FISH trực tiếp tế bào không qua nuôi cấy (phương pháp FISH với nhân tế bào gian kỳ = interphase).

+ 5 bệnh nhân được xét nghiệm FISH với tiêu bản NST kỳ giữa (tiêu bản metaphase).

2. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu máu, dịch tủy xương:

+ Lấy 0,5 ml máu và 0,5 ml dịch tủy xương của các bệnh nhân ở giai đoạn bệnh toàn phát, chưa điều trị. Máu và dịch tủy được chống đông bằng EDTA cho 5 bệnh nhân xét nghiệm theo phương pháp FISH với tế bào interphase. Máu và dịch tủy được chống đông bằng heparin 10 đơn vị/ml cho 5 bệnh nhân xét nghiệm FISH với NST metaphase.

- Probe dùng là probe thương mại LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion translocation Probe của hãng Vysis được biến tính bằng cách cho vào bể ấm 73°C trong 5 phút. Sau đó lấy ra khỏi bể ấm đặt vào tủ ấm 48°C và chuẩn bị lại.

3. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Phát hiện NST Ph1 qua nuôi cấy tế bào, theo kỹ thuật do Verma giới thiệu [6].

3.2. Phát hiện gen ABL/BCR bằng kỹ thuật FISH.

Để thực hiện xét nghiệm FISH chúng tôi tiến hành 4 bước chính là: (1) Chuẩn bị tiêu bản, (2) Làm biến tính, (3) Lai probe với ADN tiêu bản, (4) Rửa và phát hiện.

3.2.1. Chuẩn bị tiêu bản

Chuẩn bị tiêu bản nhân tế bào gian kỳ (interphase) cho 5 mẫu bệnh phẩm.

Thực hiện theo kỹ thuật chuẩn bị tiêu bản nhân tế bào không qua nuôi cấy.

Chuẩn bị tiêu bản NST kỳ giữa (metaphase) cho 5 mẫu bệnh phẩm

Thực hiện theo kỹ thuật nuôi cấy ngắn hạn tế bào tủy xương không dùng chất kích thích phân bào do Verma giới thiệu [6].

Làm biến tính ADN tiêu bản và probe: (theo quy trình kỹ thuật do Barch giới thiệu) [1].

- Tiêu bản được xử lý tiêu protein bằng cách cho vào ống chứa dung dịch Protease I ở 37°C trong 10 phút. Sau đó được rửa sạch bằng dung dịch PBS 1x rồi khử nước bằng hệ thống ống chứa cồn 70°, 85° và 95°. Chờ tiêu bản khô tự nhiên rồi biến tính ADN bằng dung dịch 70% formamide/20 x SSC ở 73°C. Làm mất nước tiêu bản bằng cách ngâm lần lượt trong cồn 75°, 85° và 95°.

3.2.3. Lai với probe

Nhỏ 5 µl probe vào khu vực được đánh dấu từ trước trên tiêu bản. Che phủ khu vực được nhỏ probe bằng lá kính để dịch được thấm đều trên toàn khu vực được đánh dấu. Phủ kín lá kính bằng xi măng cao su rồi đặt tiêu bản vào hộp lai, để ủ ấm 37°C qua đêm (12 - 16 giờ).

3.2.4. Rửa và đọc, phân tích kết quả

Lấy tiêu bản ra khỏi hộp lai, gỡ bỏ xi măng cao su và lá kính. Rửa sạch ARN bằng dung dịch NP - 40/2xSSC ở 73°C. Tiếp đó để tiêu bản vào ống chứa dung dịch NP - 40/ 1 x PBS ở nhiệt độ phòng. Nhỏ 1 - 2 giọt dung dịch DAPI/ antiface theo tỷ lệ 1: 20 lên bề mặt tiêu bản. Dàn đều dung dịch DAPI/antiface trên toàn bề mặt tiêu bản và lại phủ lá kính.

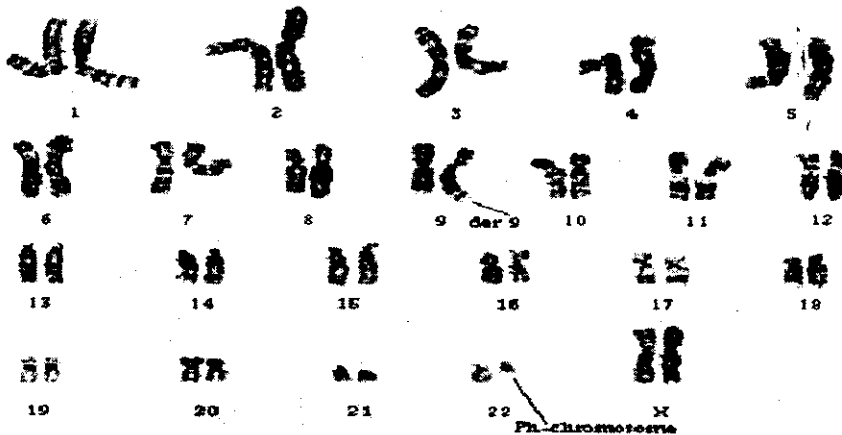
Đọc tiêu bản dưới kính hiển vi huỳnh quang với 3 màng lọc đơn DAPI, Rohdamin và FITC và 1 màng lọc kép. Với mỗi bệnh nhân phân tích 100 nhân tế bào (interphase) trước khi đưa ra kết quả. Tín hiệu đỏ tương ứng với gen ABL nằm trên nhiễm sắc thể số 9 còn tín hiệu xanh tương ứng với gen BCR nằm trên nhiễm sắc thể số 22, tín hiệu da cam (đỏ/xanh) tương ứng với gen hỗn hợp ABL/BCR [1].

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả xét nghiệm tế bào di truyền

Phân tích NST 10 bệnh nhân, phát hiện 8 bệnh nhân có NST Ph1. (hình 1, bảng 1):

2 bệnh nhân không có NST Ph1 là bệnh nhân có số lượng bạch cầu không cao: một bệnh nhân có 28×10^9 bạch cầu/l. bệnh nhân khác có 36×10^9 bạch cầu/l.

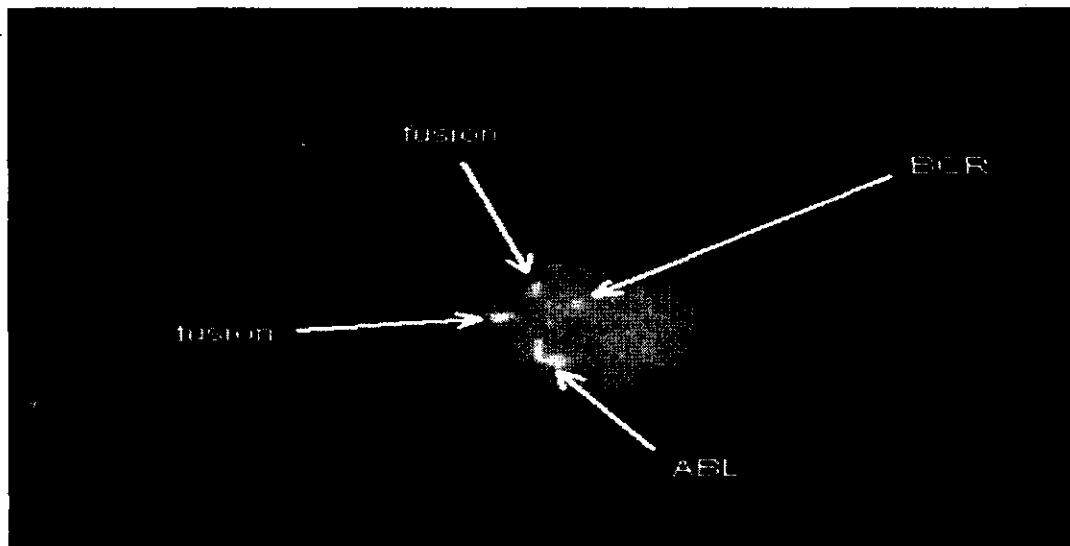


Hình 1. Karyotype bệnh nhân có nhiễm sắc thể Philadelphia

2. Kết quả xét nghiệm FISH

2.1. Phương pháp FISH với nhân tế bào gian kỳ (interphase)

Sử dụng kỹ thuật FISH với tiêu bản interphase 5 bệnh nhân đều phát hiện gen lai AML/BCR (bảng 1, hình 2).



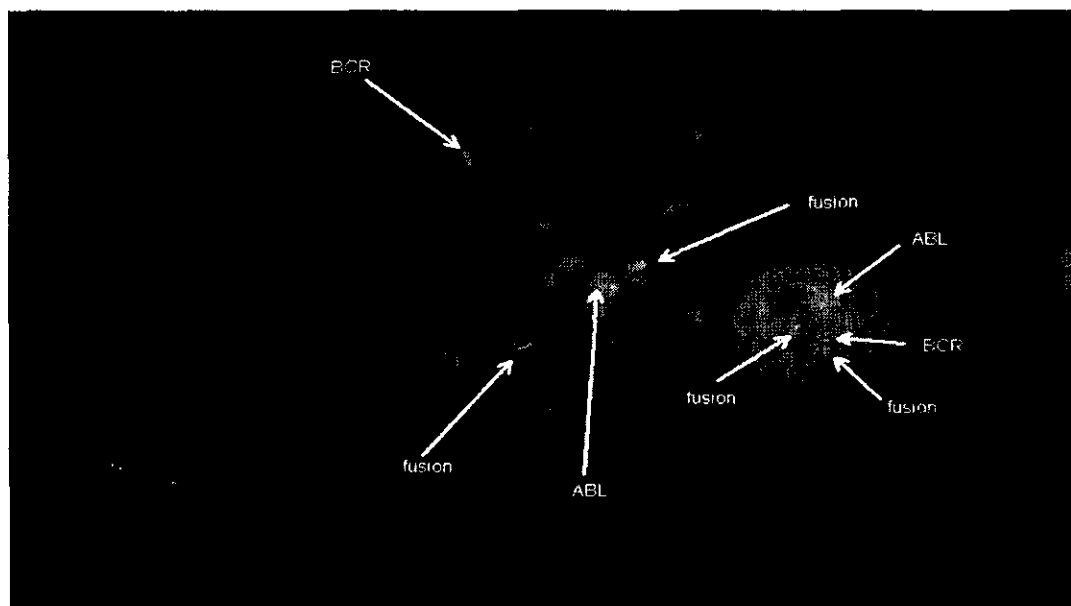
Hình 2. Hình ảnh nhân tế bào gian kỳ có gen lai (fusion gen)

3. Phương pháp xét nghiệm FISH NST kỳ giữa (metaphase)

- Xét nghiệm FISH với tiêu bản metaphase 5 bệnh nhân, phát hiện 3 bệnh nhân có gen ABL/BCR (hình 3).

- Hai bệnh nhân không phát hiện được NST Ph1 đều không có gen ABL/BCR.

- So sánh kết quả phân tích NST và FISH được trình bày ở bảng 1



Hình 3. Hình ảnh nhân và metaphase đều có gen hỗn hợp ABL/BCR

Bảng 1. So sánh kết quả tế bào di truyền và FISH

FISH		Tế bào di truyền (Phân tích NST)		
		Có Ph1	Không Ph1	Tổng số
Interphase	Có ABL/BCR	5	0	5
	Không ABL/BCR	0	0	0
	Tổng số	5	0	5
Metaphase	Có ABL/BCR	3	0	3
	Không ABL/BCR	0	2	2
	Tổng số	3	2	5

Nhận xét:

- Với phương pháp FISH tế bào interphase: Cả 5 bệnh nhân đều có Ph1 và đều có gen ABL/BCR.

- Với phương pháp FISH metaphase:

3 bệnh nhân có NST Ph1, được phát hiện gen lai ABL/BCR

2 bệnh nhân không NST Ph1, không phát hiện gen ABL/BCR

IV. BÀN LUẬN

Kết quả phân tích NST cho hình ảnh rõ ràng, tuy nhiên không phải lúc nào cũng có thể thực hiện được vì chỉ phát hiện được khi tế bào đang phân chia. Theo Blancato, thì việc nuôi cấy tế bào dù trong điều kiện tốt cũng chỉ có thể giúp phát hiện NST Ph1 khi có trên 1% tế bào trong tủy còn mang NST bất thường này. Trong khi đó để điều trị đạt lui bệnh lơ xê mi hạt kinh thì yêu cầu hết tế bào có NST Ph1 trong tủy. Với kỹ thuật FISH theo Blancato, Dewatd có thể phát hiện khi tỷ lệ tế bào có gen bất thường ở mức 1/100.000 [2, 4].. Như vậy so với kỹ thuật tế bào di truyền thì kỹ thuật FISH nhạy hơn 1000 lần. Độ nhạy cao này là thuận lợi để xác định mức tồn lưu bệnh tối thiểu (MRD = Minimal Residual Disease), một tiêu chuẩn quan trọng trong việc theo dõi điều trị bệnh lơ xê mi [3, 4].

Với hình ảnh kết quả gen lai rõ ràng có thể quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang ở tiêu bản nhân tế bào interphase và tiêu bản NST metaphase cho thấy có thể sử dụng kỹ thuật FISH để phát hiện bất thường gen trong lơ xê mi hạt kinh.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy 5 bệnh nhân lơ xê mi kinh dòng hạt được phân tích gen đều dương tính và so sánh với kết quả phân tích tế bào di truyền thì 5 bệnh nhân này cũng đều có NST Ph1. Như vậy dù số lượng bệnh nhân chưa nhiều nhưng kết quả bước đầu cũng nói lên sự chính xác của phương pháp xét nghiệm FISH với tiêu bản nhân tế bào interphase. Đồng thời do phương pháp này không cần nuôi cấy tế bào cho thấy lợi ích của kỹ thuật FISH với tế bào interphase bởi vì việc nuôi cấy đòi hỏi thời gian, hơn nữa không phải lúc nào cũng có thể tạo được những cụm NST phân bào rõ ràng, chưa nói đến rất nhiều trường hợp không có tế bào phân chia nhất là khi bệnh nhân đang được điều trị bằng các thuốc chống phân chia tế bào.

Đối với 5 bệnh nhân được xét nghiệm FISH với NST metaphase thì kết quả tương tự như xét nghiệm tế bào di truyền. Hình ảnh đầu dò quan sát được cho thấy ở những bệnh nhân này việc hình thành NST Ph1 là do chuyển đoạn NST 9 và 22. Có hai bệnh nhân không có NST Ph1 và cũng không có gen ABL/BCR sự phù hợp này góp thêm

bằng chứng nói lên sự chính xác của kỹ thuật FISH. Những bệnh nhân không có NST Ph1 và gen ABL/BCR có thể do đây là bệnh nhân không điển hình vì số lượng bạch cầu thấp. Một số nghiên cứu cũng cho thấy những bệnh nhân lơ xê mi kinh dòng hạt không điển hình thường không có NST Ph1 và gen ABL/BCR [5].

Như vậy với kết quả về hình ảnh đầu dò phát hiện ở nhân tế bào gian kỳ và NST kỳ giữa cho thấy đã thực hiện thành công xét nghiệm FISH để phát hiện gen bệnh ABL/BCR ở bệnh nhân lơ xê mi hạt kinh và có thể sử dụng kỹ thuật này trong việc xác định sự có mặt của gen bệnh ngay cả với nhân tế bào gian kỳ. Đây là ưu điểm quan trọng của kỹ thuật FISH, tuy chi phí cao nhưng có thể ứng dụng kiểm soát mức tồn lưu bệnh tối thiểu (MDS) mà các kỹ thuật tế bào di truyền cổ điển không giải quyết được.

V. KẾT LUẬN

Sử dụng kỹ thuật FISH đối với nhân tế bào gian kỳ và NST kỳ giữa máu và tủy bệnh nhân lơ xê mi kinh dòng hạt, so sánh với kết quả phân tích nhiễm sắc thể có thể kết luận:

- Áp dụng thành công kỹ thuật xét nghiệm FISH tìm gen bệnh ABL/BCR ở bệnh nhân lơ xê mi kinh dòng hạt.

- Có thể thực hiện xét nghiệm FISH với tế bào gian kỳ không qua nuôi cấy để phát hiện gen ABL/BCR.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barch Mj. (1997), "The ACT Cytogenetic Laboratory Manual", 3th ed., New York, Raven press. 91 - 105.
2. Blancato J. K., (1999), "Fluorescence in situ hybridization in the principles of clinical cytogenetics edited by Gersen S., Keagle M. B.", Humana Press, New Jersey, pp. 443 - 472.
3. .Buno I., Wyatt W.A., Zinsmeister A.R., et al (1998), "A special fluorescent in situ hybridization technique to study peripheral blood and assess the effectiveness of interferon therapy in chronic myelogenous leukemia". Blood, 9(2): 2315 - 2321.
4. Dewald G.W., Wyatt W.A., Juneau A.L., et al(1998), "Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia". Blood, 9(1):3357 - 3365.
5. Markovic V. D., Bouman D., Bayani J., Al - Maghrabi, Kamel - Reid and Squire J. A.(2000), "Lack of BCR/ABL reciprocal fusion in variant Philadelphia chromosome translocations: a use of double fusion signal FISH and spectral karyotyping", Leukemia, vol 14, 1157 - 1160.
6. Verma R. S., Babn A., (1994), "Tissues culture techniques and chrosome preparation", in Human chronosomes - principles and techniques, edited by Verma R. S. and Babn A., Mc Graw - Hill, pp. 6 - 63.

Summary

APPLICATION OF FISH TECHNIQUE FOR DETECTION OF FUSION GEN ABL/BCR IN CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA

Detection of BCR/ABL fusion gen is important for dignostic and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. **Ojective:** Application of fish technique for detection of fusion gen abl/bcr in chronic myelogenous leukemia. **Material and methods:** Peripheral blood and bonne marrow samples of 10 patients of chronic myelogenous leukemia were analyzed by FISH techniques on the slide of interphase and metaphase cell. . **Results:** 8/10 patiens showed bcr/abl fusions gene. the results are according to cytogenetic results. **Conclusion:** FISH technique have been applicated to detect ABL/BCR gen. This technique is performed on slide with interphase and metaphase cell cycle also.

Keyword: CML, bcr/abl fusion gen , FISH