

XÁC ĐỊNH TỶ LỆ ĐỘT BIẾN XÓA ĐOẠN GEN LMP1 VÀ MỐI TƯƠNG QUAN VỚI NỒNG ĐỘ EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) TRONG UNG THƯ VÒM HỌNG

Lê Hạ Long Hải¹, Trần Thị Lan¹, Tạ Văn Thọ¹,
Nguyễn Văn An^{2,3}, Phạm Hà Anh^{1,4}, Nguyễn Hoàng Việt¹

TÓM TẮT

Ung thư biểu mô vòm họng (NPC) là loại ung thư phổ biến nhất trong số các bệnh ung thư đầu cổ tại Việt Nam. Sự xuất hiện Protein màng tiềm ẩn 1 (LMP1) của virus Epstein Barr (EBV) được cho là có liên quan đến sự phát triển của tế bào ung thư NPC. Chúng tôi tiến hành xác định tỷ lệ đột biến xóa đoạn 30bp gen LMP1 và mối tương quan với nồng độ EBV trên bệnh nhân ung thư vòm họng. Thiết kế nghiên cứu mô tả cắt ngang thực hiện trên 140 mẫu mô sinh thiết của bệnh nhân ung thư vòm họng tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Đột biến gen LMP1 được phát hiện bằng kỹ thuật PCR; nồng độ EBV trong mẫu mô được xác định bằng phương pháp Realtime PCR. Kết quả cho thấy có 127/140 (90,7%) mẫu dương tính với gen LMP1 và 75/127 (59,1%) mẫu mang đột biến mất đoạn 30bp trên gen LMP1. Tuy nhiên nồng độ EBV ở nhóm có đột biến cao hơn nhóm không có đột biến xóa đoạn gen LMP1 mặc dù không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Kết quả nghiên cứu chúng tôi chỉ ra rằng đột biến xóa đoạn LMP-1 của EBV chiếm ưu thế trong quần thể làm tăng khả năng sống sót của virus nhưng lại không làm gia tăng đáng kể lượng EBV trong mô NPC. **Từ khóa:** Ung thư vòm họng, gen LMP1, Epstein-Barr virus.

SUMMARY

LMP-1 EBV GENE DELETION MUTATIONS AND ASSOCIATED WITH EPSTEIN-BARR VIRUS STATUS IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is the most common type of head and neck cancer in Vietnam. Epstein Barr virus (EBV) plays important role to the development of NPC cancer cells via the Latent Membrane Protein 1 (LMP1). We conducted this study with the goal of determining the rate of deletion mutations in the 30bp LMP1 gene and its correlation with EBV concentrations in nasopharyngeal cancer tumors. Cross-sectional descriptive study design conducted on 140 biopsy tissue samples derived from nasopharyngeal cancer patients at Hanoi Medical University Hospital. LMP1 gene mutations were detected by PCR technique and EBV concentration in tumors were measured by Realtime PCR method. The

results showed that 127/140 (90.7%) samples positive with the LMP1 gene and among them 75/127 (59.1%) samples carried to LMP-1 gene 30bp deletion mutation. Besides, the EBV concentration in the group with the mutation was higher than the group without the LMP1 gene deletion mutation, however $p > 0.05$. Our results showed that the LMP-1 deletion mutation of EBV is dominant in the population, increasing the ability of the virus to survive but does not significantly increase the EBV status in NPC tissues.

Keywords: Nasopharyngeal cancer, LMP1 gene, Epstein-Barr Virus.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư biểu mô vòm họng (NPC) là bệnh lý ác tính xuất phát từ các tế bào biểu mô vùng vòm mũi họng. NPC là bệnh đặc hữu ở miền Nam Trung Quốc, một số khu vực ở Đông Nam Á và Châu Phi. Theo thống kê của Globocan năm 2022, tỷ lệ mắc ung thư vòm họng ở Việt Nam khoảng 5613 ca chiếm 5,6% số ca ung thư vòm họng ở Châu Á. Dựa vào phân loại mô bệnh học, WHO chia ung thư vòm họng làm 2 loại là ung thư biểu mô tế bào vảy (UTBMTB) sừng hóa và UTBMTB vảy không sừng hóa¹. Yếu tố nguy cơ của NPC bao gồm: môi trường, dinh dưỡng, vùng địa lý, yếu tố di truyền dựa trên tính đa hình HLA (kháng nguyên bạch cầu người), nhiễm Epstein-Barr Virus (EBV)...

EBV thuộc họ Human Herpes Virus, một loại virus liên quan đến nhiều loại ung thư phổ biến như: ung thư vòm họng, u lympho Hodgkin, ung thư dạ dày... Mối liên quan giữa NPC và EBV lần đầu tiên được phát hiện bởi các nghiên cứu dịch tễ huyết thanh học cho thấy kháng thể IgA chống EBV tăng cao trong huyết thanh bệnh nhân NPC². Sự hiện diện của virus EBV ở các tế bào ung thư vòm họng có nguồn gốc vô tính gợi ý mối liên quan chặt chẽ của EBV với sinh bệnh học NPC³.

Gen Protein màng tiềm ẩn 1 (LMP1) là một gen của virus EBV, được phát hiện trong hầu hết các sinh thiết mũi họng của bệnh nhân mắc NPC⁴. Gen LMP1 có khả năng gây biến đổi, ức chế tế bào biểu mô và hoạt động như một protein, khởi đầu cho sự biến đổi ác tính của tế bào⁴. Đột biến gen LMP1, đặc biệt là đột biến xóa 30 bp trên gen LMP1 tạo ra các sản phẩm LMP1 đột biến giúp EBV né tránh đáp ứng miễn dịch của cơ thể, khả năng biến đổi cao hơn từ đó hình thành khối u⁵.

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Học viện Quân y

³Bệnh viện Quân y 103

⁴Trường Đại học Kinh doanh và Công nghệ Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Lê Hạ Long Hải

Email: lehalonghai@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 8.5.2024

Ngày phản biện khoa học: 19.6.2024

Ngày duyệt bài: 18.7.2024

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xác định tỷ lệ đột biến xóa đoạn gen LMP1 và mối tương quan giữa đột biến gen LMP1 với nồng độ EBV trên bệnh nhân ung thư vòm họng. Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần làm sáng tỏ cơ chế gây bệnh của virus EBV với sinh bệnh học ung thư vòm họng, hướng tới các liệu pháp điều trị đích.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. Nghiên cứu được thực hiện trên 140 mẫu mô đúc nền của bệnh nhân đã được chẩn đoán ung thư vòm họng nguyên phát tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ năm 2019-2021. Bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều được thu thập thông tin về tuổi, giới, tiền sử và phân loại mô bệnh học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA. Mẫu mô đúc nền sẽ được cắt lát mỏng 5µm và thu thập trong ống eppendorf 1,5mL. Tiến hành tách chiết DNA tổng số bằng QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, 56404) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó mẫu DNA được bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Xác định nồng độ EBV bằng Realtime-PCR. Để xác định nồng độ EBV trong mẫu DNA, nhóm nghiên cứu sử dụng bộ kit GeneProof Epstein-Barr virus (EBV) PCR (EBV/ISEX/100) có nồng độ của chuẩn dương tính nằm trong khoảng 10¹ đến 10⁷ (số bản sao/µL). Phản ứng Realtime-PCR được thực hiện theo khuyến cáo của nhà sản xuất trên máy QuantStudio3 của hãng Applied Biosystems. Do kích thước khối u giữa các bệnh nhân là hoàn toàn không đồng nhất nên do đó giá trị kết quả nồng độ EBV của mẫu có đơn vị là số bản sao/µg DNA.

Xác định đột biến xóa đoạn 30 bp trên gen LMP1 bằng PCR. PCR khuếch đại gen LMP1 sử dụng cặp mồi Fw: 5'-CTA GCG ACT CTG GAA AT- 3' và Rv: 5'-CGC GGA TCC TTA GTC ATA GTA GCT TAG- 3'⁵. Thành phần phản ứng PCR gồm: 2,5 µL DNA; 5 µL GoTaq Green Mastermix 2X; 1 µL mỗi mồi; 0,5 µL nước cất. Chu kỳ nhiệt như sau: 95°C trong 7 phút; 35 chu kỳ: 94°C trong 90 giây, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 90 giây; 72°C trong 7 phút. Tiến hành điện di trên gel Agarose 2%, đệm TBE 1X, điện áp 120V, 45 phút. Sản phẩm khuếch đại có kích thước 200bp là mang đột biến xóa 30bp gen LMP1, sản phẩm khuếch đại có kích thước 230bp là không có đột biến xóa đoạn LMP1.

Xử lý số liệu. Kết quả được xử lý bằng phần mềm Graph Prism 8.0.1. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi p < 0,05.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

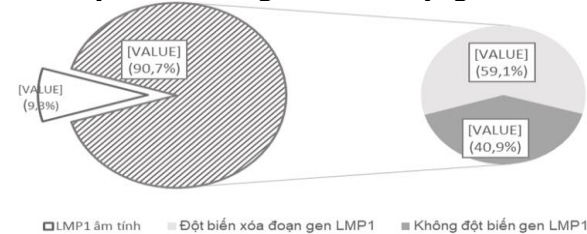
Bảng 1: Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm		Ung thư vòm họng (%)	EBV dương tính (%)
Tuổi (trung bình ± độ lệch chuẩn)		52,68 ± 13,4	
Giới	Nam	106 (75,7)	97 (76,4)
	Nữ	34 (24,3)	30 (23,6)
Phân loại mô bệnh học	UTBMTB vảy sừng hóa	5 (3,6)	3 (2,4)
	UTBMTB vảy không sừng hóa	135 (96,4)	124 (97,6)
Tổng		140 (100)	127 (100)

Nghiên cứu thực hiện trên 140 bệnh nhân được chuẩn đoán mắc ung thư vòm họng nguyên phát ở độ tuổi trung bình: 52,68 ± 13,4. Bệnh gặp chủ yếu ở nam giới với tỷ lệ nam/nữ là 3,1 và thuộc loại UTBMTB vảy không sừng hóa (96,4%). (Bảng 1)

Tỷ lệ nhiễm EBV tương đối cao 127/140 (90,7%) bệnh nhân dương tính với EBV. Trong đó tỷ lệ nam mắc EBV cao hơn nữ gấp 3,2 lần và nhiễm EBV gặp hầu hết ở nhóm ung thư biểu mô tế bào vảy không sừng hóa (124/127). (Bảng 1)

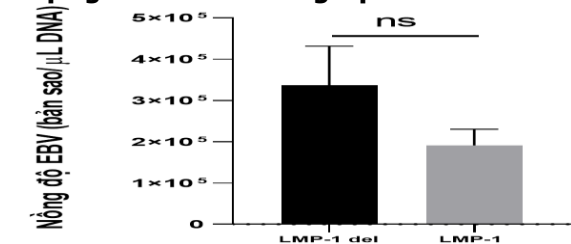
3.2. Tỷ lệ đột biến xóa đoạn gen LMP1 trên bệnh nhân ung thư vòm họng



Hình 1: Tỷ lệ đột biến xóa đoạn 30 bp trên gen LMP1 ở bệnh nhân ung thư vòm họng

Nghiên cứu cho thấy 127/140 (90,7%) mẫu dương tính với gen LMP1. Trong đó tỷ lệ đột biến xóa 30bp gen LMP1 chiếm tới 75/127 (59,1%); tỷ lệ gen LMP1 không có đột biến xóa đoạn là 52/127 (40,9%). (Hình 1)

3.3. Mối tương quan giữa đột biến xóa đoạn gen LMP1 và nồng độ EBV



Hình 2: Tương quan giữa đột biến xóa đoạn

30bp gen LMP1 và nồng độ EBV trên bệnh nhân ung thư vòm họng

Nồng độ virus EBV tăng cao hơn trên những mẫu có đột biến xóa đoạn 30bp gen LMP1 so với nhóm không có đột biến, tuy nhiên giá trị $p > 0,05$.

IV. BÀN LUẬN

Nhiễm virus EBV được cho là yếu tố nguy cơ cao liên quan đến nhiều loại ung thư trong đó có NPC, mặc dù cơ chế gây bệnh vẫn chưa được làm rõ. EBV biểu hiện một số protein ở dạng tiềm ẩn để duy trì trạng thái ngủ đông trên các tế bào bị nhiễm, trong đó LMP1 là một gen gây ung thư quan trọng của virus này. LMP1 đã được chứng minh rằng gây ra biến đổi nguyên bào sợi của loài gặm nhấm trong ống nghiệm và gây ra khối u ở chuột khỏa thân⁶. Ở chuột biến đổi gen, LMP1 gây ra bệnh viêm da tăng sản với biểu hiện Keratin bất thường. Đối với tế bào lympho B trên cơ thể người, gen LMP1 liên quan tới việc kích thích tế bào tổng hợp DNA và chống lại quá trình apoptosis bằng cách điều chỉnh lại biểu hiện bcl-2⁷.

Trong cơ chế bệnh sinh của NPC, gen LMP1 mã hóa cho một protein xuyên màng tiềm ẩn của EBV. Gen có hai vùng hoạt hóa chính là C Terminal Activation Region 1 (CTAR1) và C Terminal Activation Region 2 (CTAR2), tham gia vào việc kích hoạt con đường truyền tín hiệu nội bào thông qua NF-kB. NF-kB giữ vai trò quyết định trong điều hòa đáp ứng miễn dịch với tình trạng nhiễm trùng. Việc kích hoạt quá mức NF-kB có thể dẫn đến ung thư, bệnh lý tự miễn, sốt nhiễm trùng, nhiễm virus⁸. Đặc biệt, đột biến mất đi 30 nucleotide ở vị trí mã hóa cho 10 axit amin gần vùng hoạt hóa CTAR2, làm mất vị trí cắt của enzym giới hạn XhoI, có liên quan tới tình trạng chuyển trạng thái tế bào từ tiền ung thư sang ung thư⁷. Như vậy việc phát hiện và đánh giá tỷ lệ đột biến gen LMP1 so với nồng độ virus EBV có ý nghĩa quan trọng, nhằm hiểu rõ cơ chế bệnh sinh NPC hướng tới các liệu pháp điều trị đích.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra 127/140 (90,7%) mẫu mô có gen LMP1, trong đó 75/127 (59,1%) mẫu mô phát hiện đột biến mất đoạn 30bp trên gen LMP1. Tỷ lệ mẫu DNA có phát hiện đột biến xóa 30bp gen LMP1 trong số mẫu có gen LMP1 trên nghiên cứu của chúng tôi tại miền Bắc Việt Nam (59,1%) tương đồng với nghiên cứu của Trịnh Thị Hồng Cửa tại miền Nam Việt Nam (57,5%)⁹ và nghiên cứu của Hui Shien See ở Malaysia với 19/34 (55,9%)⁷. Mặt khác, tỷ lệ đột biến xóa đoạn gen LMP1 của chúng tôi thấp hơn một nghiên cứu khác tại

miền Nam Việt Nam của Đặng Khánh Duy: 51/70 (72,9%)⁵. Sự khác biệt này có thể do vị trí địa lý, khuynh hướng di truyền dựa trên đa hình HLA (kháng nguyên bạch cầu ở người) và một số yếu tố môi trường như: thuốc lá, rượu bia...giữa các đối tượng nghiên cứu.

Nghiên cứu cho thấy nồng độ EBV ở nhóm có đột biến cao hơn nhóm không mang đột biến xóa 30bp gen LMP1. Kết quả này phù hợp với giả thuyết ban đầu của chúng tôi do cơ chế né tránh đáp ứng miễn dịch khi xuất hiện đột biến gen này. Đột biến ở đầu C của protein LMP1, gần vùng hoạt hóa CTAR2 làm mất vị trí gắn của enzym cắt giới hạn XhoI, một loại enzym tham gia vào cơ chế sửa đổi DNA và hạn chế DNA ngoại lai từ vi sinh vật nhân sơ như virus⁷. Do đó đột biến mất đoạn 30bp của gen LMP1 có thể làm tăng nồng độ DNA của virus EBV. Nghiên cứu góp phần hiểu rõ cơ chế sinh ung thư của đột biến gen LMP1, hướng tới phương pháp điều trị như khôi phục đoạn 30bp trên gen LMP1¹⁰ trên những bệnh nhân ung thư vòm họng liên quan đến EBV.

V. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát hiện tỷ lệ đột biến xóa đoạn 30bp trên gen LMP1 trong những mẫu có gen LMP1 với tỷ lệ 59,1%. Bên cạnh đó, nồng độ EBV ở nhóm có đột biến cao hơn nhóm không có đột biến xóa đoạn gen LMP1 tuy nhiên giá trị $p > 0,05$. Kết quả nghiên cứu mang ý nghĩa bước đầu quan trọng đánh giá mối liên quan giữa tỷ lệ đột biến xóa đoạn gen LMP1 và nồng độ EBV tại Việt Nam hướng đến hiểu rõ cơ chế gây bệnh của EBV phục vụ điều trị đích bệnh NPC.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi quỹ NAFOSTED trong đề tài mã số 108.02-2018.312.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Stelow, E. B. & Wenig, B. M.** Update From The 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Nasopharynx. *Head Neck Pathol* 11, 16–22 (2017).
2. **Brousset, P. et al.** Persistence of the same viral strain in early and late relapses of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease. *Blood* 84, 2447–2451 (1994).
3. **Pathmanathan Rajadurai, Prasad Umapati, Sadler Robert, Flynn Kathryn, & Raab-Traub Nancy.** Clonal Proliferations of Cells Infected with Epstein-Barr Virus in Preinvasive Lesions Related to Nasopharyngeal Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 333, 693–698 (1995).
4. **Kanda, T., Yajima, M. & Ikuta, K.** Epstein-Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci* 110, 1132–1139 (2019).

5. **Trinh, C. T. H. et al.** LMP1-EBV Gene Deletion Mutations and HLA Genotypes of Nasopharyngeal Cancer Patients in Vietnam. *Pathophysiology* 30, 1–12 (2023).
6. **Wang, D., Liebowitz, D. & Kieff, E.** An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43, 831–840 (1985).
7. **See, H. S., Yap, Y. Y., Yip, W. K. & Seow, H. F.** Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) 30-bp deletion and Xho I-loss is associated with type III nasopharyngeal carcinoma in Malaysia. *World J Surg Onc* 6, 18 (2008).
8. **Wu, L., Nakano, H. & Wu, Z.** The C-terminal Activating Region 2 of the Epstein-Barr Virus-encoded Latent Membrane Protein 1 Activates NF- κ B through TRAF6 and TAK1 *. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2162–2169 (2006).
9. **Của T. T. H., Tô T. V., Phi P. T. P. & Dung T. N.** Tần suất và đột biến gen LMP1 của virus Epstein-Barr ở mẫu sinh thiết vòm của bệnh nhân ung thư vòm mũi họng điều trị tại Bệnh viện Ung bướu Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ* 55, 66–71 (2019).
10. **Li, S. N., Chang, Y. S. & Liu, S. T.** Effect of a 10-amino acid deletion on the oncogenic activity of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Oncogene* 12, 2129–2135 (1996).

BÁO CÁO CA LÂM SÀNG: THOÁT THUỐC CẢN QUANG VÀO TRUNG THẤT QUA CATHETER TĨNH MẠCH TRUNG TÂM

Nguyễn Quang Trung¹, Lê Tuấn Linh^{1,2}, Bùi Thị Mai¹

TÓM TẮT

Chụp cắt lớp vi tính có tiêm thuốc cản quang ngoài việc sử dụng các đường truyền tĩnh mạch ngoại vi có thể phải sử dụng qua đường tĩnh mạch trung tâm (catheter) đặc biệt khi trong các trường hợp việc tiếp cận ngoại vi khó thực hiện do thể trạng của người bệnh do đó tĩnh mạch trung tâm là một giải pháp được lựa chọn. Thoát thuốc cản quang sử dụng đường truyền tĩnh mạch ngoại vi đã được báo cáo nhiều nhưng với thoát thuốc vào trung thất thì có nhiều nguy cơ hơn, các biến chứng và dấu hiệu lâm sàng ít được báo cáo. Chúng tôi trình bày một trường hợp thoát mạch thuốc cản quang vào trung thất qua catheter tĩnh mạch trung tâm, các dấu hiệu lâm sàng người bệnh sau thoát thuốc và một số hướng xử trí được thực hiện ngay sau thoát thuốc cản quang. Trường hợp được trình bày chia sẻ kinh nghiệm cách đánh giá đường truyền tĩnh mạch trung tâm đạt tiêu chuẩn trước khi thực hiện việc tiêm thuốc cản quang, cách xử trí sau khi bị thoát thuốc.

Từ khóa: thoát thuốc cản quang, CMEV

SUMMARY

CLINICAL CASE REPORT: EXTRAVASATION OF CONTRAST MEDIA INTO THE MEDIASTINUM THROUGH CENTRAL VENOUS CATHETER

Contrast-enhanced computed tomography in addition to the use of peripheral intravenous lines may require the use of a central venous line (catheter), especially in cases where peripheral access is difficult to achieve. Due to the patient's condition or

emergency situations that need to be done quickly, central veins are the solution of choice. Extravasation contrast media using a peripheral intravenous line has been widely reported, but with mediastinal drainage, what are the side effects? Complications and clinical signs are rarely reported. We present a case of extravasation of contrast medium into the mediastinum through the central vein, the patient's clinical signs after extravasation and some treatment options performed immediately after contrast extravasation. The presented case shares experiences on how to evaluate the central venous line to meet standards before performing contrast injection and how to handle after drug leakage.

Keywords: extravasation contrast media, CMEV

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thoát mạch do thuốc cản quang (CMEV) được định nghĩa là sự rò rỉ của thuốc cản quang được tiêm tĩnh mạch từ khoang nội mạch bình thường vào các mô mềm xung quanh thường gặp trong chụp cắt lớp vi tính (CT) có tiêm thuốc do sử dụng tốc độ và áp lực tiêm cao, thể tích thuốc tiêm lớn¹. Trên lâm sàng một số bệnh nhân chúng ta không thể tiếp cận thiết lập đường truyền tĩnh mạch vị trí ngoại vi (mu bàn tay, khủy tay, bàn chân) do thể trạng người bệnh và thường hay gặp nhất là những bệnh nhân ung thư đã điều trị hóa xạ trị hoặc những trường hợp cấp cứu tối cấp cần thực hiện việc chụp CT nhanh nhất để chẩn đoán, với những bệnh nhân này thì sử dụng catheter tĩnh mạch trung tâm (CVC) để tiêm thuốc cản quang là giải pháp². Một số báo cáo về việc thoát thuốc cản quang vào trung thất qua CVC đã được báo cáo nhưng chưa đưa ra đầy đủ các thông tin³⁻⁵. Qua ca lâm sàng này chúng tôi trình bày một trường hợp thoát mạch thuốc cản quang vào trung thất qua CVC bao gồm các dấu hiệu lâm sàng sau

¹Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

²Trường đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Quang Trung

Email: quangtrungxray@gmail.com

Ngày nhận bài: 9.5.2024

Ngày phản biện khoa học: 21.6.2024

Ngày duyệt bài: 19.7.2024