

CYFRA21.1 - CHỈ THỊ ĐẶC HIỆU CHẨN ĐOÁN UNG THƯ PHỔI**Lê Đình Chấn^{1*}, Nguyễn Tài Lương², Lê Quang Huấn²**^(1*)Trường đại học Hồng Đức, Thanh Hóa, chachedinh@yahoo.com⁽²⁾Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT: Trong thực tế, người ta đã sử dụng nhiều loại kháng nguyên để chẩn đoán ung thư phổi như Carcinoembryonic antigen (CEA), 19cyfra21.1 cytokeratin, tế bào thần kinh cụ thể enolase (NES), CA125... với hiệu quả tương đối khả quan. Tuy nhiên, vẫn còn gặp phải nhiều hạn chế do độ nhạy cảm của các loại kháng nguyên trên không chỉ đặc trưng cho ung thư phổi dạng tế bào không nhỏ. Sử dụng kháng nguyên Cyfra21.1 là một trong những phương pháp mới trong chẩn đoán và định hướng điều trị ung thư phổi tại Việt Nam, đã khắc phục được những hạn chế trên và mang lại hiệu quả cao. Cyfra21.1 có cấu trúc là một mảnh của cytokeratin 19 (một trong cấu trúc sợi trung gian của khung tế bào) và quyết định kháng nguyên của Cyfra 21.1 trong khoảng từ 311 đến 368 axit amin trên phân tử 19 cytokeratin. Đây là một chỉ thị có tính đặc hiệu cao cho các bệnh ung thư phổi dạng tế bào không nhỏ hiệu quả nhất, được biểu hiện bởi sự nhạy cảm đặc hiệu với đa số các loại UTP dạng (NSCLC: SCLC = 8,6: 2,5 ng/ml, p = 0,006). Do đó, Cyfra 21.1 được xem là một chỉ thị hữu ích trong chẩn đoán và định hướng điều trị ung thư phổi dạng tế bào không nhỏ.

Từ khóa: Cyfra21.1, cytokeratin, chỉ thị kháng nguyên, kháng nguyên, ung thư phổi.

MỞ ĐẦU

Ung thư phổi (UTP) là một trong những căn bệnh do sự tăng sinh không bình thường của tế bào, đặc biệt là những người đã hoặc đang hút thuốc lá. Đây là một trong những căn bệnh có tỷ lệ tử vong lớn nhất trong các ca bệnh ung thư, chiếm 31% trong các ca bệnh. Thực tế cho thấy, ở nước ta tỷ lệ người mắc ung thư phổi khá cao, chiếm 20% trong các loại ung thư.

Vì vậy, việc phát hiện sớm UTP có tầm quan trọng rất lớn, mang ý nghĩa sống còn đối với người không may mắc phải căn bệnh nguy hiểm này.

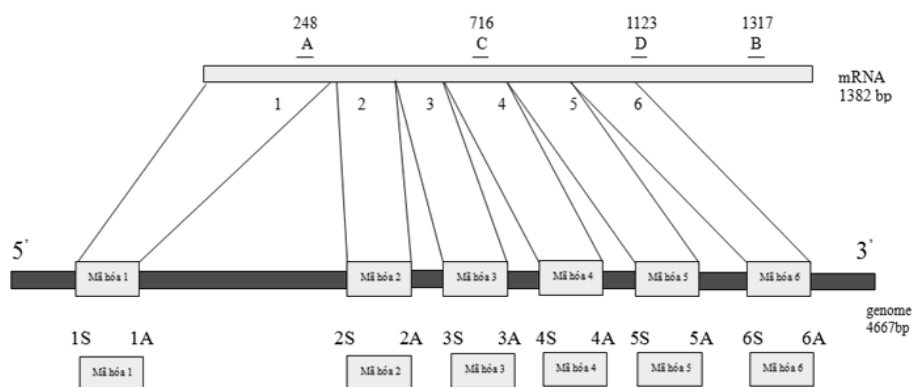
Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều các chỉ thị kháng nguyên được sử dụng để chẩn đoán ung thư phổi như: Carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin 19cyfra21.1, neuron specific enolase (NES), CA125,... và một số các kháng nguyên khác. Trong đó Cyfra21.1 (cytokeratin fragment) là một trong những kháng nguyên có độ nhạy cao đối với UTP mà đặc biệt là UTP dạng tế bào không nhỏ.

Cyfra21.1 nằm trong nhóm chỉ thị của cytokeratin, một cấu trúc trong bộ khung của tế bào và là một phân đoạn của cytokeratin 19, được tiết ra khi tế bào biểu mô phổi tăng sinh một cách bất thường trong ung thư, chính vì vậy mà nó được đặt tên theo chữ viết tắt của từ

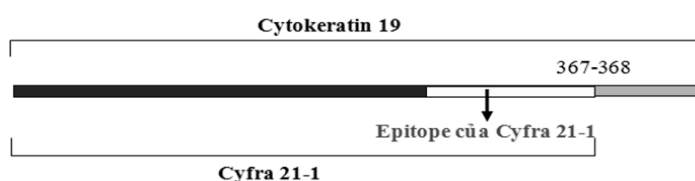
cytokeratin fragment (mảnh cytokeratin).

Cũng như các phân tử cytokeratin khác, cytokeratin 19 cũng có cấu trúc vùng trung tâm với 4 domain xoắn là 1A, 1B, 2A và 2B, kích thước khoảng 40 kDa, gồm 400 axit amin đã được nghiên cứu bởi Haszakit et al. (2002) và Niemeyer et al. (2003) [3, 5]. Gen mã hóa cho cytokeratin 19 nằm trên nhiễm sắc thể số 17, có kích thước 4667 bp với 6 exon mã hóa cho phân tử mRNA kích thước 1382 bp (hình 1), đã được mô tả bởi Stigbrand et al. (1998) [6].

Nghiên cứu Cyfra 21.1 với vai trò là kháng nguyên đặc hiệu ung thư phổi, chúng tôi quan tâm chủ yếu đến phân quyết định kháng nguyên (epitope) của phân tử này. Theo một kết quả nghiên cứu, sử dụng các phân tử kháng thể để nhận ra vùng quyết định kháng nguyên của cytokeratin, người ta nhận thấy, vùng quyết định kháng nguyên của Cyfra 21.1 nằm trong khoảng axit amin từ 311 đến 368 trên phân tử cytokeratin 19 (hình 2), đã được nghiên cứu bởi Stigbrand et al. (1998) [6]. Kết quả này cũng được khẳng định trong một phép thử sử dụng hai kháng thể đơn dòng: Ks 19.1 (kháng thể nhận biết các amino acid từ vị trí 311 đến 335 trên cytokeratin 19) và BM19-21 (kháng thể nhận biết các amino acid từ vị trí 346 đến 367) theo tác giả Fujita et al. (2004) [1].



Hình 1. Sơ đồ mã hóa cho cytokeratin 19, Stigbrand et al. (1998)



Hình 2. Vị trí của cyfra21.1 trên cytokeratin 19, Stigbrand et al. (1998)

Trong chẩn đoán, do Cyfra 21.1 có thể tồn tại với hàm lượng cao trong huyết thanh của bệnh nhân ung thư phổi dưới dạng tự do nên chúng dễ dàng được phát hiện nhờ phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng Cyfra 21.1. Vì vậy, khi kết hợp với các phương pháp chẩn đoán khác thì việc chẩn đoán ung thư phổi thông qua việc xác định sự có mặt của Cyfra 21.1 trong huyết thanh sẽ cho kết quả nhanh và chính xác hơn.

Giá trị y học của việc nhận biết các mảnh protein cytokeratin trong dịch cơ thể chính là việc phát hiện sớm và đánh giá nhanh hiệu quả điều trị đối với các khối u biểu mô ác tính. Ba chỉ thị cytokeratin được ứng dụng nhiều nhất trong y học là các kháng nguyên polypeptide mô (tissue polypeptide antigen (TPA)), kháng nguyên polypeptide đặc hiệu mô (tissue polypeptide specific antigen (TPS)) và Cyfra 21-1. TPA có phổ kiểm tra rộng, được dùng để đánh giá cytokeratin 8, 18 và 19. TPS và Cyfra 21.1 đặc hiệu hơn và dùng đánh giá cytokeratin 18 và cytokeratin 19 theo thứ tự, được công bố bởi Gianfranco (2003) [2].

Vì vậy, cytokeratin được sử dụng như là một chỉ thị khối u hiệu quả bởi những lý do sau: Các tế bào khối u không thay đổi cấu trúc sợi trung gian; sợi trung gian có tính chất đặc trưng

mô, trong đó lớp I và II cấu tạo bởi các cytokeratin đặc trưng cho các tế bào biểu mô; dấu hiệu cytokeratin rất thấp ở các tế bào bình thường, nhưng sẽ tăng mạnh khi xuất hiện các tế bào ung thư. Trong bài viết này, chúng tôi đề cập đến cấu trúc và tầm quan trọng của kháng nguyên Cyfra21.1 trong việc chẩn đoán sớm ung thư phổi làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Huyết thanh các bệnh nhân đã được chẩn đoán ung thư phổi tại Khoa Ung bướu, Khoa giải phẫu, bệnh viện K, Hà Nội.

Mẫu máu bệnh nhân do bệnh viện Bạch Mai và bệnh viện K, Hà Nội cung cấp.

Sử dụng các hóa chất trong nghiên cứu sinh học phân tử như Agarose, Acetic acid, Tris-base, EDTA, EtBr, Phenol, Ethanol, Trizol, Chloroform, Isopropanol.

Phương pháp

Tách chiết ARN từ máu theo Kit S.N.A.P của hãng Invitrogen. Quy trình nhân đoạn gen CK19 từ RNA tổng số được tiến hành theo kit “one-step RT-PCR” của hãng Invitrogen với cặp mồi CYFRAF: 5'-aagctaacatgcagaa

cctcaacgaccgc-3' và CYFRAR: 5'-ttattggcaggtcaggagaagagcc-3'.

Phương pháp gắn sản phẩm PCR vào vector Topo-TA-PCR™ 2.1 tiến hành theo kit của hãng Invitrogen.

Thống kê sinh học để đánh giá độ tin cậy của các mẫu nghiên cứu về mặt định lượng.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá các chỉ thị cytokeratin dùng trong ung thư phổi ở Việt Nam

Các chất chỉ thị khối u là những đại phân tử khi xuất hiện ở những bệnh nhân ung thư có nồng độ thay đổi theo chiều hướng tăng lên liên quan đến sự phát sinh, tăng trưởng của những khối u ác tính. Các chỉ thị này có thể chia làm các dạng sau:

Chỉ thị tế bào: bao gồm các kháng nguyên trên bề mặt tế bào, các thụ thể hoocmon và thụ thể yếu tố tăng trưởng, những biến đổi gen của tế bào.

Chỉ thị dịch thể: bao gồm các chất hóa sinh xuất hiện với nồng độ quá mức bình thường trong huyết thanh, nước tiểu hoặc các dịch khác

của cơ thể. Các chất này được tổng hợp trực tiếp từ khối u hoặc được tạo thành như là một phần ứng của cơ thể đối với khối u mà Lê Quang Huân và nnk. (2009) [4] đã đề cập.

Thực tế cho thấy, nếu xét về vai trò chẩn đoán thì chỉ thị thể dịch thể hiện nhiều ưu điểm hơn chỉ thị tế bào, đặc biệt là việc thu mẫu bệnh phẩm và tiến hành xét nghiệm. Do đó, người ta chủ yếu sử dụng các chỉ thị thể dịch trong chẩn đoán ung thư.

Để so sánh tính chính xác và độ nhạy của các chỉ thị ung thư, Hatzakit et al. (2002) [3] đã tiến hành nghiên cứu trên mẫu bệnh phẩm của 102 bệnh nhân mắc ung thư phổi có độ tuổi từ 54-71. Kết quả nghiên cứu cho thấy, 84 bệnh nhân (82%) mắc ung thư không phải tế bào nhỏ (NSCLC), trong đó có 34 bệnh nhân (33%) mắc ung thư tế bào sừng (SQCLC), 23 bệnh nhân (22,5%) mắc ung thư tế bào tuyến, 24 bệnh nhân (23,5%) mắc ung thư tế bào lớn (LCC), còn lại 18 bệnh nhân (18%) mắc ung thư tế bào nhỏ (SCLC). Qua nghiên cứu, chúng tôi thu được nồng độ của các chỉ thị khối u trong các dạng ung thư phổi được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả biểu hiện của các chỉ thị khối u

KN \ UTP	Cyfra (ng/ml)	NSE (ng/ml)	TPA (U/ml)	CA 125 (U/ml)	CEA (ng/ml)	SCCAg (ng/ml)
SCLC	2,5 ± 0,4 n = 18	52,2 ± 12,4 n = 18	174,4 ± 53,8 n = 18	66,7 ± 19,3 n = 12	12,3 ± 4,9 n = 13	1,1 ± 0,3 n = 11
NSCLC	8,6 ± 1,7 n = 79	19,7 ± 2,3 n = 79	241,3 ± 26 n = 79	96,2 ± 27,3 n = 44	46,9 ± 23,3 n = 48	3,4 ± 1 n = 34
SQCC và SCLC	8,3: 2,5 n = 33 p = 0,006	13:1,3 n = 33 p = 0,0003	256,8: 41,6 n = 33	36,2: 9,3 n = 17	24,2: 15,3 n = 16	4: 1,5 n = 9
LCC	8,7 ± 1,7 n = 20	34 ± 3,3 n = 20	248,5 ± 29,8 n = 20	93,7 ± 8,9 n = 11	11,5 ± 2,3 n = 14	5,5 ± 1,3 n = 9

n. số mẫu bệnh phẩm chứa chỉ thị khối u; p. độ tin cậy (nếu $p \leq 0,05$ - sự khác nhau giữa các mẫu so sánh có ý nghĩa thống kê); KN. Kháng nguyên; UTP. Dạng ung thư phổi.

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy, có 3 chỉ thị có mặt ở hầu hết các mẫu bệnh phẩm (18/18 SCLC, 79/84 NSCLC) là Cyfra 21.1, NSE và TPA nên chúng có ý nghĩa hơn 3 chỉ thị còn lại. Nồng độ Cyfra 21.1 và TPA ở NSCLC cao hơn ở SCLC, trong đó nồng độ Cyfra 21.1 chênh

lệch có ý nghĩa hơn (NSCLC: SCLC = 8,6: 2,5 ng/ml, $p = 0,006$). Ngược lại, nồng độ NSE ở SCLC cao hơn ở NSCLC có ý nghĩa thống kê (NSCLC: SCLC = 52,2:19,7 ng/ml). Như vậy, Cyfra 21.1 có độ nhạy cao với NSCLC, NSE có độ nhạy cao với SCLC và TPA thể hiện độ nhạy

tương đương giữa các loại ung thư phổi.

Cũng trong nghiên cứu này, chúng tôi còn nhận thấy rằng, nồng độ của Cyfra 21.1 liên hệ rất chặt chẽ đến giai đoạn phát triển của bệnh thể hiện (nồng độ càng cao thì khả năng di căn đã lan rộng), phát hiện này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đó. Kết quả nghiên cứu này đã cho thấy Cyfra 21.1 là một chỉ thị hữu ích đối với NSCLC. Nếu được kết hợp với các chỉ thị khác, sẽ đem lại hiệu quả lớn trong chẩn đoán và đánh giá điều trị UTP dạng NSCLC.

KẾT LUẬN

Cyfra 21.1 là một chỉ thị khối u mang những ưu điểm nổi bật cho UTP được đặc trưng bởi sự xuất hiện cao ở bệnh nhân ung thư, còn ở người bình thường tồn tại với nồng độ rất thấp. Độ nhạy cảm đặc hiệu với đa số các loại UTP dạng ((NSCLC:SCLC = 8,6:2,5 ng/ml, $p = 0,006$).

Vì vậy, Cyfra 21.1 xứng đáng được coi là một chỉ thị hữu ích trong chẩn đoán và định hướng điều trị ung thư phổi dạng tế bào không nhỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fujita J., Ohsuki Y., Bandoh S., Takashima H., Ueda Y., Wu F., Tojo Y., Kubo A., Ishida T., 2004. Elevation of cytokeratin 19 fragment (CYFRA21.1) in serum of patients with radiation pneumonitis: possible marker of epithelial cell damage. *Respir Med.*, 98 (4): 294-300.
2. Gianfranco B., 2003. Clinical Equivalence of Two Cytokeratin Markers in Non-small Cell Lung Cancer: A Study of Tissue Polypeptid Antigen and Cytokeratin 19 Fragments. *CHEST*, 124: 622-663.
3. Haszakit K. D., Froudarakis M. E., Bouros D., Tzanakis N., Siafakas N., 2002. Prognostic value of serum tumor marker in patients with lung cancer. *Respiration*, 69: 25-29.
4. Lê Quang Huân, Lã Thị Huyền, 2009. Kháng thể tái tổ hợp và ứng dụng. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
5. Niemeyer C. M., Wacker R., Adler M., 2003. Combination of DNA-directed immobilization and immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of self-assembled DNA-protein conjugates. *Nucleic Acids Res.*, 31-90.
6. Stigbrand T. et al., 1998. Epitope Specificity of 30 Monoclonal Antibodies against Cytokeratin Antigens: The ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumor Biol.*, 19: 132-152.

CYFRA21.1 - SPECIFIC MAKER FOR DINGNOSIS OF LUNG CANCER

Le Dinh Chac¹, Nguyen Tai Luong², Le Quang Huan²

⁽¹⁾Hong Duc University, Thanh Hoa

⁽²⁾Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Today, there are many modern methods used to diagnose cancer. However, the use of indicator of antigens to diagnose cancer is one of the new method and has high reliability. In fact, several antigens have been used for the diagnosis of lung cancer, such as, Carcinoembryonic antigen (CEA), 19cyfra21.1 cytokeratin, neuron specific enolase (NES), and CA125. that showed high efficacy but still face to many restrictions as the sensitivity of these antigens is not specific to non-small cell lung carcinoma. The use of Cyfra21.1 antigen is one of the new methods of diagnosis and orientation of lung cancer treatment in Vietnam that overcomes the limitations mentioned abobe and has high efficiency. Cyfra21.1 structure is a fragment of cytokeratin 19 (one of an intermediate fiber structure of the cell frame) and determine antigen of Cyfra 21.1 in the range from 311 to 368 amino acids of molecular cytokeratin 19. This is a highly specific indicator for lung cancer, that is indicated by the specific sensitivity to majority of lung cancer (NSCLC: SCLC = 8.6: 2.5 ng/ml, $p = 0.006$). Therefore, Cyfra 21.1 is considered as a worthy indicator which is useful in the diagnosis and orientation treatment of non-small cell lung carcinoma.

Key words: Antigens, Cyfra21.1, cytokeratin, indiator, lung cancer.

Ngày nhận bài: 27-6-2011