

KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN KRAS, NRAS, BRAF TRÊN BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG TẠI BỆNH VIỆN BẠCH MAI

Mai Trọng Khoa¹, Trần Đình Hà¹, Phạm Cẩm Phương¹,
Nguyễn Tuấn Anh¹, Nguyễn Tiến Lung¹, Nguyễn Thuận Lợi¹,
Nguyễn Văn Kinh¹, Nguyễn Quốc Tuấn¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định trạng thái đột biến gen KRAS, NRAS, BRAF trên bệnh nhân ung thư đại trực tràng (UTĐTT) tại Bệnh viện Bạch Mai. **Phương pháp nghiên cứu:** 44 mẫu bệnh phẩm cố định formalin – vùi paraffin (sinh thiết hoặc phẫu thuật) của bệnh nhân UTĐTT được xác định đột biến gen KRAS, NRAS, BRAF bằng kit KRAS XL StripAssay®, NRAS XL StripAssay® và BRAF StripAssay® (ViennaLab). **Kết quả:** Có 15 mẫu phát hiện đột biến gen KRAS (34,1%), 5 mẫu phát hiện đột biến gen NRAS (11,4%) và 11 mẫu phát hiện đột biến gen BRAF (25%). Trạng thái đột biến gen KRAS, NRAS, BRAF không phụ thuộc vào các đặc điểm như tuổi, giới tính, phương pháp lấy mẫu, vị trí u nguyên phát, CEA, CA19-9 và giai đoạn TNM. **Kết luận:** Kết quả phân tích đột biến gen KRAS, NRAS, BRAF trên bệnh nhân UTĐTT tại Bệnh viện Bạch Mai tương tự nhiều nghiên cứu khác tại Việt Nam và trên thế giới.

Từ khóa. Ung thư đại trực tràng, đột biến gen KRAS, NRAS, BRAF.

ABSTRACT

RESULTS OF KRAS/NRAS/BRAF MUTATIONS TESTING IN COLORECTAL CANCER AT BACH MAI HOSPITAL

Mai Trong Khoa¹, Tran Dinh Ha¹, Pham Cam Phuong¹,
Nguyen Tuan Anh¹, Nguyen Tien Lung¹, Nguyen Thuan Loi¹,
Nguyen Van Kinh¹, Nguyen Quoc Tuan¹

Objectives: To determine the KRAS mutation status in colorectal cancer in Bach Mai Hospital. **Methods:** 44 formalin-fixed, paraffin-embedded specimens (needle biopsy and surgical specimens) of colorectal cancer patients were tested for KRAS, NRAS, BRAF mutations using KRAS XL StripAssay®, NRAS XL StripAssay® and BRAF StripAssay® (ViennaLab). **Results:** 15 of 44 specimens had KRAS mutations (34.1%), 5 of 44 specimens had NRAS mutations (11.4%) and 11 of 44 specimens had BRAF mutations (25%). The association between these clinicopathological variables and gene mutation status was not statistically significant. **Conclusion:** Results of KRAS, NRAS, BRAF mutations determinacy study in colorectal cancer in Bach Mai Hospital was similar to other studies in Vietnam and worldwide.

Key words. Colorectal cancer, KRAS mutation, NRAS mutation, BRAF mutation

1. Đơn vị gen – Tế bào gốc, TT Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai

- Ngày nhận bài (Received): 04/7/2017; Ngày phản biện (Revised): 20/7/2017;
- Ngày đăng bài (Accepted): 28/8/2017
- Người phản hồi (Corresponding author): Nguyễn Thuận Lợi
- Email: nguyenthuanloi@gmail.com; ĐT: 01678416982

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng (UTĐTT) là một trong những loại ung thư có tỷ lệ mắc và tỷ lệ tử vong cao nhất. Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc chuẩn theo tuổi là 10,1/100.000 dân, đứng thứ sáu trong các bệnh ung thư (theo GLOBOCAN 2012). Phác đồ điều trị chuẩn cho UTĐTT di căn hiện nay thường là kết hợp giữa các hóa chất gây độc tế bào với các thuốc điều trị đích. Trong đó, điều trị đích UTĐTT bằng các kháng thể đơn dòng kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (thuốc ức chế EGFR: cetuximab, panitumumab) hay kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng mạch máu nội mô (thuốc ức chế VEGF: bevacizumab, aflibercept) là những liệu pháp điều trị đích đem lại nhiều kết quả tốt cho bệnh nhân. Tuy nhiên, tính đáp ứng với các thuốc điều trị đích này trên mỗi bệnh nhân lại có sự khác nhau. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cho thấy những bệnh nhân UTĐTT có khối u mang đột biến gen *RAS* (bao gồm *KRAS* và *NRAS*) và *BRAF* đáp ứng kém với các thuốc ức chế EGFR (cetuximab, panitumumab), trong khi những bệnh nhân không mang đột biến có thời gian sống thêm toàn bộ và thời gian sống thêm không bệnh cao hơn rõ rệt. Xét nghiệm đột biến gen *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* có vai trò rất quan trọng trong lựa chọn phác đồ điều trị ban đầu cho bệnh nhân UTĐTT. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu: xác định tỷ lệ đột biến gen *KRAS*,

NRAS, *BRAF* và đánh giá sơ bộ về mối tương quan giữa trạng thái đột biến gen *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* và một số đặc điểm lâm sàng - cận lâm sàng trên bệnh nhân UTĐTT tại Bệnh viện Bạch Mai.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

44 bệnh nhân UTĐTT điều trị tại Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu. Bệnh phẩm sinh thiết/ phẫu thuật của các bệnh nhân này được cố định formalin, vùi paraffin, chẩn đoán xác định mô bệnh học và khoanh vùng vị trí chứa nhiều tế bào u tại Trung tâm Giải phẫu bệnh và Tế bào học. Sau đó, các mẫu này được xét nghiệm đột biến gen *KRAS*, *NRAS* và *BRAF* tại Đơn vị Gen-Tế bào gốc, Trung tâm Y học hạt nhân & Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 4 năm 2016 đến tháng 10 năm 2016.

2.2. Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang. Thu thập các thông tin về đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, giai đoạn bệnh của bệnh nhân theo một mẫu thu thập thông tin thống nhất.

Quy trình xét nghiệm: gồm 4 giai đoạn chính: Tách DNA từ mô cố định formalin- vùi paraffin; Khuếch đại đoạn gen quan tâm bằng phản ứng PCR; Lai sản phẩm khuếch đại với đầu dò đặc hiệu được phân bố trên teststrip; và phân tích kết quả. Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 23.0.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu (N = 44)

Đặc điểm bệnh nhân		n	%
Tuổi	< 60	18	40,9
	≥ 60	26	59,1
	Trung vị	60,1	
	Khoảng tuổi	34 - 89	
Giới tính	Nam	26	59,1
	Nữ	18	40,9
Phương pháp lấy mẫu	Phẫu thuật	35	79,5
	Sinh thiết	9	20,5

Kết quả xác định đột biến gen *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*...

Vị trí u nguyên phát	Đại tràng trái	8	18,2
	Đại tràng phải	18	40,9
	Trực tràng	18	40,9
Mô bệnh học	Ung thư biểu mô tuyến	40	90,9
	Ung thư biểu mô tuyến nhày	3	6,8
	Ung thư biểu mô tế bào nhẵn	1	2,3
Độ biệt hóa (UT BM tuyến)	Cao	1	2,5
	Vừa	38	95
	Thấp	1	2,5
CEA	Bình thường	22	50
	Tăng	22	50
CA 19-9	Bình thường	31	70,5
	Tăng	13	29,5
Giai đoạn TNM	I	0	0
	II	12	27,3
	III	14	31,8
	IV	18	40,9
Tổng số bệnh nhân nghiên cứu		44	100

Trong số 44 bệnh nhân nghiên cứu có 18 nữ, 26 nam, với độ tuổi trung bình 60,1 tuổi, trong đó bệnh nhân ≥ 60 tuổi chiếm tỷ lệ cao hơn (59,1%). Đa số bệnh nhân (35/44) đã phẫu thuật cắt khối u nguyên phát và được làm xét nghiệm mô bệnh học với mẫu mô lấy từ phẫu thuật. Khối u nguyên phát nằm trong đại tràng trái ở 8 bệnh nhân, đại tràng phải ở 18 bệnh nhân và tại trực tràng ở 18 bệnh nhân. Đặc điểm mô bệnh học khối u ở dạng ung thư biểu mô tuyến chiếm đa số với 40/44 bệnh nhân. Bệnh nhân giai đoạn muộn (III và IV) chiếm đa số với 32/44 bệnh nhân.

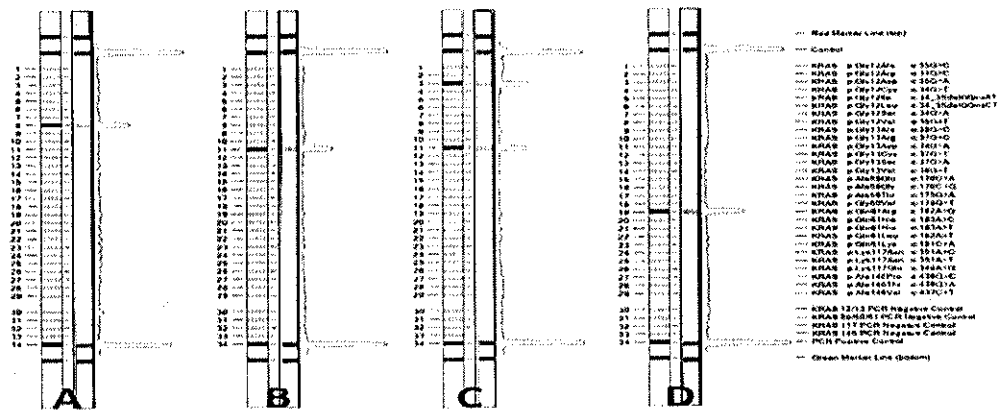
3.2. Tình trạng đột biến gen *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*

Trong số 44 bệnh nhân, đột biến gen *KRAS* được phát hiện thấy ở 15 bệnh nhân (34,1%). Trong đó có 6 bệnh nhân đột biến ở vị trí codon 12, 7 bệnh nhân đột biến ở vị trí codon 13, 1 bệnh nhân mang đột biến ở cả 2 vị trí codon 12-13 và 1 bệnh nhân đột biến ở vị trí codon 61. Đột biến gen *NRAS* được phát hiện thấy ở 5 bệnh nhân (11,4%), 2 bệnh nhân đột biến ở exon 2 (4,6%) và 3 bệnh nhân đột biến ở codon 61 exon 3. Trong số 44 bệnh nhân, đột biến gen *BRAF* được phát hiện thấy ở 11 bệnh nhân (25%). Chỉ xuất hiện duy nhất một loại đột biến trên exon 15 tại V600E (c. 1799T>G).

Bảng 2. Tỷ lệ phát hiện đột biến gen *KRAS*, *NRAS*

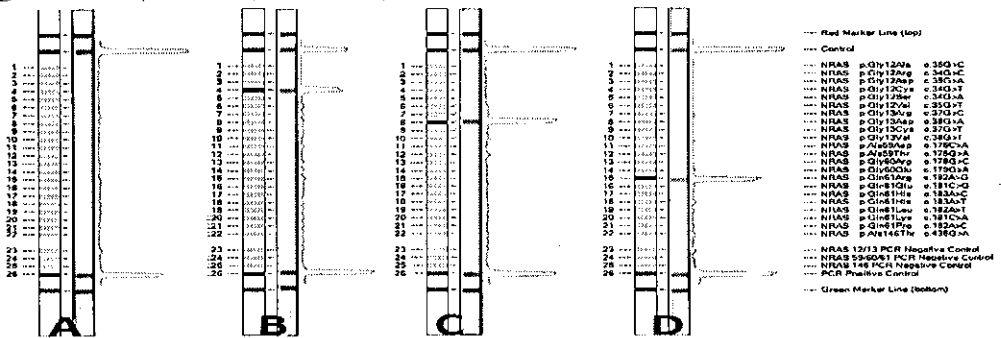
Đặc điểm	<i>KRAS</i>		<i>NRAS</i>		<i>BRAF</i>	
	n	%	n	%	n	%
Phát hiện đột biến	15	34,1	5	11,4	11	25,0
Không phát hiện đột biến	29	65,9	39	88,6	33	75,0
Tổng số	44	100	44	100	44	100

Đột biến gen *KRAS* được phát hiện thấy ở 15 bệnh nhân (34,1%), đột biến gen *NRAS* được phát hiện thấy ở 5 bệnh nhân (11,4%)



Hình 1 – Một số kết quả phát hiện đột biến gen KRAS bằng phương pháp PCR kết hợp lai đầu dò đặc hiệu (KRAS XL StrippAssay®)

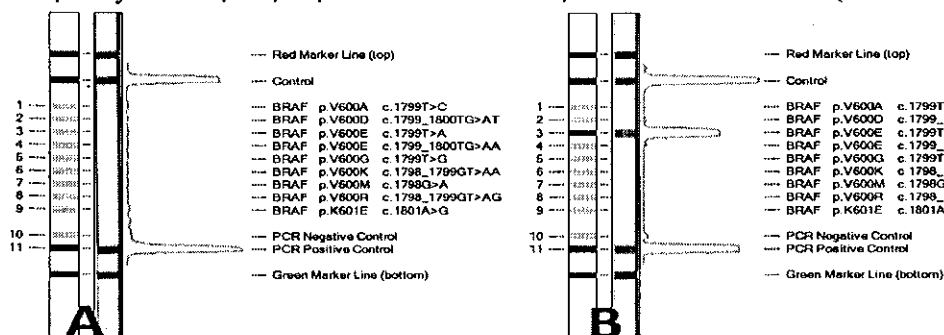
Trên mỗi thanh teststrip có sẵn vạch Control cho phản ứng lại, PCR Negative Control (vạch 30–33) và PCR Positive Control (vạch 34). Các vạch 1–29 tương ứng với 29 đột biến phát hiện được. (A): KRAS đột biến G12V(c.35G>T); (B): KRAS đột biến G12S(c.34G>A); (C): mẫu có KRAS đột biến kép tại hai vị trí trên exon 2 gồm: G12D(c.35G>A) và G13D(c.38G>A); (D): KRAS đột biến Q61R (c.182A>G).



Hình 2 – Một số kết quả phát hiện đột biến gen NRAS bằng phương pháp PCR kết hợp lai đầu dò đặc hiệu (NRAS XL StripAssay®)

Trên mỗi thanh teststrip có sẵn vạch Control cho phản ứng lại, PCR Negative Control (vạch 23–25) và PCR Positive Control (vạch 26). Các vạch 1–22 tương ứng với 22 đột biến phát hiện được. (A): NRAS bình thường; (B): NRAS đột biến G12C(c.34G>T); (C): NRAS đột biến G13D(c.38G>A); (D): NRAS đột biến Q61R(c.182A>G)

Trong số 44 bệnh nhân nghiên cứu, đột biến gen BRAF được phát hiện thấy ở 11 bệnh nhân (25%). Trong đó chỉ xuất hiện duy nhất một loại đột biến trên exon 15 tại codon 600 là V600E (c. 1799T>G) (Hình 3.3).



Hình 3 – Một số kết quả phát hiện đột biến gen BRAF bằng phương pháp PCR kết hợp lai đầu dò đặc hiệu (BRAF StripAssay®)

Trên mỗi thanh teststrip có sẵn vạch Control cho phản ứng lai, PCR Negative Control (vạch 10) và PCR Positive Control (vạch 11). Các vạch 1–9 tương ứng với 22 đột biến phát hiện được. (A): *BRAF* bình thường; (B): *BRAF* đột biến V600E.

3.3. Mối tương quan giữa đột biến gen *KRAS*, *NRAS* và các đặc điểm bệnh nhân

Bảng 3. Tương quan giữa đột biến gen *KRAS*, *NRAS* và đặc điểm của bệnh nhân

Đặc điểm bệnh nhân		N	<i>KRAS</i> ĐB n (%)	p	<i>NRAS</i> ĐB n (%)	p	<i>BRAF</i> ĐB n (%)	p
Tuổi	< 60	18	5 (27,8%)	0,462	4 (22,2%)	0,142	5 (27,8%)	0,738
	≥ 60	26	10 (38,5%)		1 (3,8%)		6 (23,1%)	
Giới tính	Nam	26	8 (30,8%)	0,576	2 (7,7%)	0,386	7 (29,6%)	1,000
	Nữ	18	7 (38,9%)		3 (16,7%)		4 (22,2%)	
Phương pháp lấy mẫu	Phẫu thuật	35	13 (37,1%)	0,400	3 (8,6%)	0,267	10 (28,6%)	0,411
	Sinh thiết	9	2 (22,2%)		2 (22,2%)		1 (11,1%)	
Vị trí u nguyên phát	Đại tràng trái	8	4 (50%)	0,542	4 (15,4%)	0,634	8 (30,8%)	0,480
	Đại tràng phải	18	5 (27,8%)					
	Trực tràng	18	6 (33,3%)		1 (5,6%)		3 (16,7%)	
Mô bệnh học	UT BM tuyến	40	12 (30%)	0,107	5 (12,5%)	1,000	11 (27,5%)	0,226
	Khác	4	3 (75%)		0 (0%)		0 (0%)	
CEA	Bình thường	22	8 (36,4%)	0,750	4 (18,2%)	0,345	3 (13,6%)	0,082
	Tăng	22	7 (31,8%)		1 (4,5%)		8 (36,4%)	
CA 19-9	Bình thường	31	9 (29%)	0,313	5 (16,1%)	0,301	5 (16,1%)	0,057
	Tăng	13	6 (46,2%)		0 (0%)		6 (46,2%)	
Giai đoạn TNM	I - II	12	5 (41,7%)	0,516	2 (16,7%)	0,603	1 (8,3%)	0,240
	III - IV	32	10 (31,3%)		3 (9,4%)		10 (31,3%)	

Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy mối tương quan giữa trạng thái đột biến gen *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* không phụ thuộc vào những đặc điểm như tuổi, giới tính, phương pháp lấy mẫu, vị trí u nguyên phát, CEA, CA19-9 và giai đoạn TNM.

IV. BÀN LUẬN

Trên thế giới, tần suất xuất hiện đột biến gen *KRAS* dao động trong khoảng từ 30% đến 45% [6]. Tại Việt Nam cũng có một số nghiên cứu ban đầu cho thấy tần suất đột biến gen *KRAS* vào khoảng 33% đến 37% và các đột biến chủ yếu xuất hiện ở codon 12 và codon 13 exon 2 [1, 2, 3]. Tần suất đột biến gen *KRAS* trong nghiên cứu này là 34,1%, con số này cũng tương tự như một số nghiên cứu ở các nước châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản và các

nước phương Tây. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tổng cộng 29 loại đột biến của gen *KRAS* nằm trên các codons 12, 13, 59, 60, 61, 117 và 146. Trong số đó, các đột biến ở codon 12 và 13 chiếm đa số (14 bệnh nhân; 93,3%) và chỉ phát hiện một bệnh nhân đột biến ở codon 61 (6,7). Hiện tại chưa có báo cáo nào về tần suất đột biến gen *NRAS* trên quần thể người Việt Nam nên chúng tôi không có số liệu để so sánh. Tần suất xuất hiện đột biến gen *BRAF* có khoảng dao động khá lớn, trong khoảng từ 3% đến

16% [6]. Tần suất xuất hiện đột biến BRAF V600E trong nghiên cứu này khá cao (25%), điều này có thể do cỡ mẫu nghiên cứu nhỏ chưa đủ để đại diện cho quần thể người Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, có 1 bệnh nhân mang đồng thời 2 đột biến trên gen *KRAS* là G12D và G13D, 1 bệnh nhân nữa mang 2 đột biến ở cả 2 gen là *KRAS* G13D và *BRAF* V600E, mặc dù hiếm gặp nhưng cũng có những ca đột biến kép tương tự cũng đã được báo cáo [9]. Việc phát hiện đột biến kép này có thể chứng tỏ khối u đã có quá trình tích lũy khá nhiều biến đổi ở mức phân tử, tương ứng với khả năng bệnh tiến triển nhanh và tiên lượng xấu hơn. Tuy nhiên do hiếm gặp, việc nhận định vai trò của những đột biến này cần phải được nghiên cứu thêm.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng quan sát thấy xu hướng này nhưng sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê. Nghiên cứu của trên thế giới khác cho thấy đột biến gen *KRAS* xảy ra nhiều hơn ở những bệnh nhân có nồng độ CEA tăng và CA19-9 tăng. Một nghiên cứu gần đây trên 174 bệnh nhân lại quan sát thấy xu hướng ngược lại, đột biến gen *KRAS* xuất hiện nhiều hơn ở nồng độ CEA bình thường (< 5 ng/mL) [5]. Trong nghiên cứu này, đột

biến gen *KRAS* xuất hiện nhiều hơn trong các bệnh nhân có nồng độ CA 19-9 tăng so với bình thường (46,2% so với 29%). Một điểm nữa chúng tôi quan sát thấy trong nghiên cứu này là đột biến gen *BRAF* có xu hướng xuất hiện nhiều hơn khá rõ ở những bệnh nhân có CEA tăng (36,4% so với 13,6%, $p=0,082$) và CA 19-9 tăng (46,2% so với 16,1%, $p=0,057$). Điều này đã từng được báo cáo trong một nghiên cứu trên người Trung Quốc. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p>0,05$.

V. KẾT LUẬN

Trong số 44 bệnh nhân UTĐTT đột biến gen *KRAS* phát hiện trên 15/44 bệnh nhân (chiếm 34,1%), trong đó loại đột biến phổ biến là G13D trên exon 2 (8 bệnh nhân).

Đột biến gen *NRAS* được phát hiện thấy ở 5 bệnh nhân (chiếm 11,4%).

Đột biến gen *BRAF* phát hiện thấy ở 11 bệnh nhân (chiếm 25%).

Trạng thái đột biến gen *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* không phụ thuộc vào tuổi, giới tính, phương pháp lấy mẫu, vị trí u nguyên phát, đặc điểm mô bệnh học, nồng độ chất chỉ điểm u (CEA và CA 19-9) và phân loại giai đoạn TNM.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Kiến Dụ, Trần Văn Khánh, và cộng sự (2013), "Phát hiện đột biến gen *KRAS* và bước đầu đánh giá hiệu quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng", *Tạp chí Y học Việt Nam*, 405(2): 37-41.
2. Mai Trọng Khoa, Trần Đình Hà, Phạm Cẩm Phương, Nguyễn Tiến Lung, Nguyễn Tuấn Anh và cộng sự (2016), "Xác định đột biến gen *KRAS* trên bệnh nhân ung thư đại trực tràng tại Bệnh viện Bạch Mai bằng kỹ thuật StripAssay", *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, số 3, trang 402-406.
3. Vương Diệu Linh, Nguyễn Ngọc Quang, Nguyễn Phi Hùng (2014), "Phân tích đột biến gen *KRAS* trên bệnh nhân ung thư đại trực tràng bằng kỹ thuật giải trình tự động", *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, 2014: 138-143.
4. Mai Trọng Khoa (2016). *Kháng thể đơn dòng và phân tử nhỏ trong điều trị bệnh ung thư*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
5. Cho M., Akiba C., et al. (2016), "Impact of RAS and BRAF mutations on carcinoembryonic antigen production and pattern of colorectal metastases", *World J Gastrointest Oncol*, 8 (1), pp. 128-135.
6. De Roock W., Claes B., et al. (2010), "Effects of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis", *Lancet Oncol*, 11 (8), pp. 753-762.