

ĐẶC ĐIỂM ĐỘT BIẾN GEN KRAS VÀ BRAF TRÊN CARCINÔM TUYẾN ĐẠI TRỰC TRÀNG TẠI BỆNH VIỆN UNG BƯỚU CẦN THƠ

Huỳnh Quyết Thắng¹, Hoàng Anh Vũ¹, Ngô Quốc Đạt¹,
Nguyễn Hồng Phong¹, Nguyễn Thanh Tuấn Minh¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định đặc điểm đột biến gen KRAS và BRAF trên carcinôm tuyến đại-trực tràng tại bệnh viện Ung bướu Cần Thơ.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Mô tả cắt ngang 50 trường hợp carcinôm tuyến đại-trực tràng được chẩn đoán và điều trị tại bệnh viện Ung bướu Cần Thơ. Giải trình tự chuỗi DNA gen KRAS (exon 2), gen BRAF (exon 15) để xác định đột biến.

Kết quả: Trong 48 trường hợp khảo sát gen KRAS, chúng tôi ghi nhận 17 trường hợp đột biến (35,42%), tất cả đều là đột biến điểm. Tỷ lệ đột biến gen KRAS tại codon 12 và 13 lần lượt là 25% và 6,25%. Chỉ có 1 trường hợp đột biến ở codon 10. Đột biến gen KRAS thường gặp ở trực tràng (50%) hơn so với đại tràng (18,18%) với $P=0,022$. Các đặc điểm bệnh học khác như giới, loại mô học, độ mô học, giai đoạn TNM không có liên hệ với đột biến gen KRAS. Trong 32 trường hợp giải trình tự chuỗi gen BRAF, không ghi nhận trường hợp đột biến nào.

Kết luận: Tỷ lệ đột biến gen KRAS trên bệnh nhân carcinôm tuyến đại-trực tràng tại bệnh viện Ung bướu Cần Thơ là 35,42%. Đột biến gen KRAS có liên quan với vị trí u. Chúng tôi chưa ghi nhận trường hợp đột biến gen BRAF nào trong 32 bệnh nhân.

Từ khóa: đột biến KRAS, đột biến BRAF, carcinôm tuyến đại-trực tràng.

ABSTRACT

CHARACTERISTICS OF KRAS AND BRAF MUTATIONS IN COLORECTAL ADENOCARCINOMAS IN CAN THO ONCOLOGY HOSPITAL

Huynh Quyet Thang¹, Hoang Anh Vu¹, Ngo Quoc Dat¹,
Nguyen Hong Phong¹, Nguyen Thanh Tuan Minh¹

Objective: To determine the characteristics of KRAS and BRAF gene mutations in colorectal adenocarcinomas in Can Tho Oncology Hospital.

Material and method: A cross-sectional study included 50 cases of colorectal adenocarcinoma were diagnosed and treated at Can Tho Oncology Hospital. KRAS and BRAF mutations were identified by direct DNA sequencing.

Results: Among the 48 colorectal cancer patients, we detected 17 (35.42%) mutations in the KRAS, all of which were point mutations. Mutation frequencies at codon 12 and codon 13 were 25% and 6.25%,

1. Bệnh viện Ung Bướu Cần Thơ

- Ngày nhận bài (received): 15/7/2014; Ngày phản biện (revised): 15/8/2014;
- Ngày đăng bài (Accepted): 26/8/2014
- Người phản biện: PGS.TS Phạm Như Hiệp, TS. Phạm Nguyên Tường
- Người phản hồi (Corresponding author): Huỳnh Quyết Thắng
- Email: nghphong007@yahoo.com ĐT: 0988233540

respectively. Only one patient harbored a point mutation at codon 10. The K-ras mutation frequency was higher in the rectum than in the colon (50% vs 18.18%, $P = 0.022$). Other clinicopathological features, such as gender, histological type and grade, TNM stage, showed no positive relationship with KRAS gene mutations. In 32 cases, none of BRAF mutation was detected.

Conclusion: The KRAS mutation rates of colorectal adenocarcinoma patients in Can Tho Oncology Hospital was 35.42%. KRAS mutation was associated with tumor location. In 32 cases, none of BRAF mutations detected.

Key words: KRAS mutation, BRAF mutation, colorectal adenocarcinoma.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại-trực tràng là một trong những bệnh ác tính phổ biến nhất trên thế giới và Việt Nam. Trong những năm gần đây, tỉ lệ mắc và tử vong do ung thư đại-trực tràng ngày càng tăng [14].

Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) đóng vai trò quan trọng trong tăng sinh và biệt hóa của tế bào bình thường. Tuy nhiên sự hoạt hóa EGFR rất thường gặp trong ung thư đại-trực tràng, và thông qua đường dẫn truyền tín hiệu Ras/Raf/MAP/MEK/ERK dẫn đến tăng sinh tế bào, di căn, thoát khỏi apoptosis, tăng sinh mạch máu [11]. Cetuximab và panitumumab, là các kháng thể đơn dòng ngăn chặn hoạt động của EGFR đã được FDA cho phép sử dụng trong ung thư đại-trực tràng tiến xa và được NCCN đưa vào phác đồ điều trị ung thư đại-trực tràng có di căn [25].

Trong ung thư đại-trực tràng, tỉ lệ đột biến gen KRAS khoảng 35-45% [1], [5], [36], và đột biến gen BRAF khoảng 4-15% [5], [8], [31]. Đột biến KRAS, BRAF gây hoạt hóa đường truyền tín hiệu hạ lưu của EGFR [37], dẫn đến không đáp ứng với liệu pháp kháng EGFR [1], [8], [18]. Do đó khảo sát đột biến gen KRAS, BRAF có vai trò trong tiên lượng và lựa chọn bệnh nhân để sử dụng thuốc kháng EGFR.

Tại Việt Nam, trong những năm gần đây, với sự phát triển của sinh học phân tử, đã có một số công trình nghiên cứu về đột biến gen KRAS trên ung thư đại-trực tràng, với tỉ lệ đột biến khoảng 35-40%. Tạ Thành Văn (2011), trong xây dựng qui trình xác định đột biến gen KRAS, phát hiện 4/10 mẫu có đột biến gen KRAS [33]. Kết quả nghiên cứu 10 mẫu mô ung thư đường tiêu hóa của Hồ Hữu Thọ (2011), phát hiện 4 mẫu có đột biến gen KRAS [17]. Hoàng Anh Vũ (2013), nghiên cứu 173 ca, phát hiện 62 ca đột biến KRAS (35,8%) [16].

Chưa có công trình nghiên cứu nào thực hiện khảo sát đột biến gen BRAF trên ung thư đại-trực tràng. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu: Xác định một số đặc điểm đột biến của gen KRAS và BRAF trên bệnh nhân ung thư đại-trực tràng tại bệnh viện Ung bướu Cần Thơ.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: 50 bệnh nhân carcinôm tuyến đại-trực tràng tại bệnh viện Ung bướu Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu: Mô tả cắt ngang
Các bước tiến hành:

- Ghi nhận thông tin lâm sàng bao gồm vị trí u, số lượng u, kích thước u, tình trạng di căn.
- Bệnh phẩm được cố định bằng formol đậm trung tính, ghi nhận thông tin đại thể (dạng sùi, loét, thâm nhiễm hoặc kết hợp)

- Trên lam HE, ghi nhận loại mô học, độ mô học theo WHO [14] và giai đoạn TNM [1].

- Giải trình tự gen:

- Thu hoạch tế bào từ mô vùi nền

Vùng mô u được đánh dấu trên lam nhuộm HE và đối chiếu với các lam bệnh phẩm chưa nhuộm, sau đó chúng tôi cạo vùng mô u tương ứng trên lam chưa nhuộm.

- Tách chiết genomic DNA bằng bộ kit Promega.

- Khuếch đại các exon bằng PCR

Gen BRAF được khuếch đại exon 15 bằng PCR, gen KRAS được khuếch đại exon 2 bằng COLD-PCR. Trình tự các đoạn mồi được sử dụng trong Bảng 1. Chu kỳ luân nhiệt được thực hiện trên máy GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, Mỹ). Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di, sau đó được tinh sạch bằng QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Mỹ).

Đặc điểm đột biến gen KRAS và BRAF trên carcinôm ...

Bảng 1: Các đoạn mồi của gen KRAS và BRAF

KRAS	Mồi xuôi: 5'-AAGGCCTGCTGAAAATGACTG-3'
	Mồi ngược: 5'-CAAAGAATGGTCCTGCACCAG-3
BRAF	Mồi xuôi: 5'-TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG-3'
	Mồi ngược: 5'-TCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT-3

- Thực hiện giải trình tự chuỗi DNA

Sản phẩm PCR đã được tinh sạch sẽ được thực hiện phản ứng cycle sequencing với BigDye Terminator Version 3.1 từ Applied Biosystems, theo 1 chiều mỗi exon. Trình tự DNA được đọc bằng máy ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ).

Kết quả được phân tích bằng phần mềm SeqScape, so sánh với trình tự tham chiếu của KRAS và BRAF để chẩn đoán tình trạng đột biến của các exon. Quy trình chẩn đoán đột biến gen được thực hiện tại Trung tâm Y Sinh học Phân tử, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh. Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 16.0.

III. KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm bệnh học của lô nghiên cứu

Bảng 2: Đặc điểm bệnh của lô nghiên cứu

Đặc điểm	n (%)
Tổng số bệnh nhân	50
Tuổi trung bình	55
Giới	
Nam	29 (58)
Nữ	21 (42)
Vị trí u	
Đại tràng	23 (46)
Trực tràng	27 (54)
Loại mô học	
Carcinôm tuyến	38 (76)
Carcinôm tuyến chế nhầy hoặc dạng tế bào nhẵn	12 (24)
Độ mô học	
Độ 1	11 (22)
Độ 2	26 (52)
Độ 3	13 (26)
Giai đoạn TNM	
Giai đoạn I	7 (14)
Giai đoạn II	21 (42)
Giai đoạn III	13 (26)
Giai đoạn IV	9 (18)

3.2. Đặc điểm đột biến gen *KRAS*

Trong 50 trường hợp nghiên cứu, chúng tôi khảo sát đột biến gen *KRAS* được 48 trường hợp và phát hiện 17 trường hợp có đột biến (35,42%), tất cả đều là đột biến điểm. Đột biến chủ yếu xảy ra ở codon 12 với 12 trường hợp chiếm 25%, tiếp theo là codon 13 với 3 trường hợp chiếm 6,25%, 1 trường hợp đột biến ở codon 10, và 1 trường hợp đột biến ở 2 codon 12, 13.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ghi nhận 6 loại đột biến điểm bao gồm Gly10Glu, Gly12Asp, Gly12Ser, Gly12Val, Gly13Asp, Gly13Ser.

Các đột biến có tần suất cao nhất là Gly12Asp, Gly12Val và Gly12Ser với số lượng lần lượt là 5, 5, và 4 trường hợp.

Bảng 3: Kết quả các loại đột biến *KRAS*

Loại đột biến	n
Gly10Glu (G10E)	1
Gly12Asp (G12D)	4
Gly12Ser (G12S)	3
Gly12Val (G12V)	4
Gly13Asp (G13D)	2
Gly13Ser (G13S)	1
Gly12Asp, Gly12Val	1
Gly12Ser, Gly13Asp	1

3.3. Mối liên quan giữa đột biến gen *KRAS* và các đặc điểm bệnh học

Bảng 4: Mối liên quan giữa đột biến *KRAS* và một số đặc điểm bệnh học

Đặc điểm	<i>KRAS</i> không đột biến (%)	<i>KRAS</i> đột biến (%)	Tổng (%)	Giá trị P
Giới				
Nam	17 (35,42)	11 (22,91)	28 (58,33)	0,507
Nữ	14 (29,17)	6 (12,5)	20 (41,67)	
Vị trí u				
Đại tràng	18 (37,5)	4 (8,33)	22 (45,83)	0,022
Trực tràng	13 (27,08)	13 (27,08)	26 (54,17)	
Loại mô học				
Carcinôm tuyến	24 (50)	13 (27,08)	37 (77,08)	0,988
Carcinôm tuyến chế nhầy hoặc dạng tế bào nhẵn	7 (14,58)	4 (8,33)	11 (22,92)	
Độ mô học				
Độ 1	7 (14,58)	4 (8,33)	11 (22,92)	0,985
Độ 2	16 (33,33)	9 (18,75)	25 (52,08)	
Độ 3	8 (16,67)	4 (8,33)	12 (25)	
Giai đoạn TNM				
Giai đoạn I	3 (6,25)	4 (8,33)	7 (14,58)	0,243
Giai đoạn II	16 (33,33)	5 (10,42)	21 (43,75)	
Giai đoạn III	6 (12,5)	6 (12,5)	12 (25)	
Giai đoạn IV	6 (12,5)	2 (4,11)	8 (16,67)	

3.4. Đột biến gen *BRAF*: Khảo sát 32 trường hợp đột biến gen *BRAF* trong 50 hiện tại có kết quả được 32 trường hợp và chưa ghi nhận đột biến nào.

IV. BÀN LUẬN

4.1. Đột biến gen *KRAS*

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định được 17 trường hợp đột biến *KRAS* trên tổng số 48 bệnh nhân (35,42%). Đột biến gen *KRAS* xảy ra khá thường xuyên ở ung thư đại-trực tràng khoảng 35-45% [1], [9], [13], [27], [36]. Hoàng Anh Vũ đã báo cáo kết quả đột biến gen *KRAS* trên 173 ca ung thư đại-trực tràng tại TP. Hồ Chí Minh là 35,8% [16]. Tỷ lệ đột biến gen *KRAS* trong nghiên cứu này cũng phù hợp với tần suất đột biến của gen *KRAS* trong ung thư đại-trực tràng.

Có nhiều nghiên cứu khảo sát mối liên quan giữa đột biến gen *KRAS* và một số yếu tố bệnh học nhưng kết quả vẫn còn bàn cãi. Shen (2011) [32], Gil Ferreira [13] đã báo cáo mối liên quan giữa đột biến gen *KRAS* và giới tính với tỷ lệ đột biến ở nữ cao hơn nam, Elkof (2103) [10] đã báo cáo sự liên hệ giữa tỷ lệ đột biến gen *KRAS* cao hơn với vị trí u ở đại tràng phải và giai đoạn bệnh trễ. Watanabe (2013) [38] đã cho thấy mối liên quan giữa tỷ lệ đột biến gen *KRAS* cao hơn ở bệnh nhân nữ, tăng theo tuổi, và vị trí đại tràng phải cao hơn so với đại tràng trái và trực tràng. Qua 48 trường hợp trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ ghi nhận đột biến *KRAS* thường gặp ở trực tràng hơn so với đại tràng. Có lẽ do mẫu nghiên cứu của chúng tôi khá ít nên không thể phát hiện các mối liên quan khác. Tuy nhiên, Phipps [29] nghiên cứu 1989 ca ung thư đại-trực tràng và không ghi nhận mối liên quan nào giữa tuổi, giới, vị trí u, loại mô học, độ mô học, giai đoạn bệnh với đột biến gen *KRAS*. Zlobec [40] nghiên cứu 392 ca cũng ghi nhận kết quả tương tự.

Các đột biến *KRAS* thường gặp nhất là G12D, G12V, G13D, G12C, G12A, G12S, G12R, và G13S, trong đó đột biến G12D là thường gặp nhất với tần suất khoảng 10-15%, tiếp theo là G12V và G13D với tần suất gần 10% [13], [27], [32]. Tại Việt Nam, Hoàng Anh Vũ đã báo cáo 7 dạng đột biến *KRAS*

trên ung thư đại-trực tràng gồm G12D, G12V, G12S, G12A, G12C, G13D, G13S [16]. Trong nghiên cứu này chúng tôi ghi nhận 5 dạng đột biến trên codon 12 và 13 gồm G12D, G12V, G12S, G13D, G13S với tần suất tương đồng so với các nghiên cứu trước tại Việt Nam và trên thế giới. Ngoài ra, trong nghiên cứu này, chúng tôi ghi nhận 1 trường hợp đột biến rất hiếm gặp trên codon 10 là G10E, cơ sở dữ liệu COSMIC chỉ mới ghi nhận 1 trường hợp [5], và chúng tôi chưa thấy có nghiên cứu nào báo cáo về dạng đột biến này. Trường hợp này, chúng tôi đã thực hiện PCR và giải trình tự lần thứ 2 để xác định chẩn đoán.

Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy rằng bệnh nhân có đột biến *KRAS* không đáp ứng với cetuximab hoặc panitumumab [1], [4], [18], [20], [36], nên đột biến *KRAS* là yếu tố dự báo quan trọng của sự không đáp ứng với thuốc kháng EGFR. Do đó, tất cả bệnh nhân ung thư đại-trực tràng có đột biến *KRAS* ở codon 12 hoặc 13 đều không điều trị thuốc kháng EGFR. De Roock (2010) [6] khảo sát 579 bệnh nhân ung thư đại-trực tràng kháng hóa trị và được điều trị với cetuximab, đã nhận thấy bệnh nhân có đột biến *KRAS* G13D (n=22) có thời gian sống còn toàn bộ (7,6 tháng so với 5,7 tháng, P=0,005) và thời gian bệnh không tiến triển (4 tháng so với 1,9 tháng, P=0,004) dài hơn so với bệnh nhân có các đột biến *KRAS* khác, bệnh nhân có đột biến *KRAS* G13D chỉ chăm sóc tích cực có tiên lượng xấu hơn bệnh nhân có các loại đột biến *KRAS* khác. Do đột biến gen *KRAS* G13D khá phổ biến, chỉ sau đột biến G12D và G12V nên kết quả nghiên cứu của De Roock rất đáng lưu ý. Tejpar (2012) [34] cho thấy bệnh nhân có đột biến *KRAS* G13D sử dụng cetuximab kèm hóa trị có thời gian bệnh không tiến triển dài hơn so với nhóm chỉ hóa trị đơn thuần (7,4 so với 6 tháng, P=0,039), tuy nhiên khi so sánh với các bệnh nhân có đột biến *KRAS* khác thì không có khác biệt. Bando (2012) [3] trong một nghiên cứu ở Nhật cũng cho thấy cetuximab có thể kéo dài thời gian bệnh không tiến triển và thời gian sống còn ở nhóm bệnh nhân đột biến *KRAS* G13D (4,1 tháng và 8,5 tháng) so với nhóm bệnh nhân có các đột biến

KRAS khác (2,1 tháng và 6,8 tháng), tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

4.2 Đột biến gen *BRAF*

Theo COSMIC, tỉ lệ đột biến gen *BRAF* trong ung thư đại-trực tràng khoảng 10,7% [5]. Shen [32] báo cáo tỉ lệ đột biến chỉ có 1,7%. Do đó, tỉ lệ đột biến *KRAS* trong ung thư đại-trực tràng là khá thấp nên chúng tôi chưa ghi nhận trường hợp đột biến nào trong 32 trường hợp khảo sát cũng phù hợp với tỉ lệ này.

Đột biến gen *BRAF* hầu hết là đột biến điểm ở codon 600, loại V600E (trên 95%) [5]. Các nghiên cứu hầu hết đều cho thấy đột biến *KRAS* và *BRAF* là loại trừ lẫn nhau [7], [8], [22], [35]. Tuy nhiên Mao [21] và Eklof [10] đã ghi nhận một vài trường hợp *KRAS* và *BRAF* cùng đột biến.

Đột biến *BRAF* có mối tương quan với u ở đại tràng phải, giai đoạn TNM trễ, u biệt hóa kém, loại mô học có tiết nhầy [24], [39], [40]. Ngoài ra, Yokota [39] đã xác định đột biến *BRAF* còn là một yếu tố tiên lượng độc lập đối với sống còn, liên quan với nguy cơ cao tử vong do ung thư. Điều này cũng được Roth [30], Ogino [28], và

Farina [12] khẳng định.

Đột biến *BRAF* cũng dẫn đến không đáp ứng với thuốc kháng EGFR [4], [8], [10], [36], do đó khảo sát đột biến *BRAF* là cần thiết để dự đoán khả năng đáp ứng với thuốc kháng EGFR. Hơn nữa, đột biến *BRAF* V600E là đích nhắm của thuốc ức chế *BRAF* như vemurafenib, dabrafenib trong điều trị melanôm [26]. Do đó đột biến gen *BRAF* hứa hẹn nhiều tiến bộ mới trong điều trị ung thư đại-trực tràng, nên cần phải có những nghiên cứu lớn hơn về đột biến gen *BRAF* trên ung thư đại-trực tràng ở Việt Nam.

V. KẾT LUẬN

Tỷ lệ đột biến gen *KRAS* trên bệnh nhân carcinôm tuyến đại-trực tràng tại bệnh viện Ung bướu Cần Thơ là 35,42%. Các dạng đột biến ở codon 12 và 13 gồm G12D, G12V, G12S, G13D, G13S, với tần suất đột biến G12D và G12V cao nhất, và 1 đột biến rất hiếm ở codon 10 là G10E. Đột biến gen *KRAS* thường gặp ở trực tràng nhiều hơn so với đại tràng. Chúng tôi chưa ghi nhận trường hợp đột biến gen *BRAF* nào trong 32 bệnh nhân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

(Do yêu cầu in ấn, có 40 TLTK nếu có nhu cầu xin liên hệ tác giả)