

PHÁT HIỆN MỘT ĐỘT BIẾN MỚI CỦA GEN *CDH1* TRONG GIA ĐÌNH BỆNH NHÂN UNG THƯ DẠ DÀY LAN TỎA DI TRUYỀN

Nguyễn Thị Thanh Hương¹, Vũ Xuân Vinh² và Đặng Thị Ngọc Dung^{2,✉}

¹Bệnh viện Phụ Sản Trung ương, ²Trường Đại học Y Hà Nội

Ung thư dạ dày lan tỏa di truyền là một dạng ung thư hiếm gặp có tiên lượng xấu. Phần lớn các trường hợp gây ra bởi đột biến trội trên nhiễm sắc thể (NST) thường trên gen *CDH1* và 70 – 80% người mang đột biến có nguy cơ tiến triển thành ung thư dạ dày thực sự. Khi một người được chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa do đột biến gen *CDH1*, ước tính 38% các thành viên khác trong gia đình có nguy cơ mang đột biến gen *CDH1*. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu phát hiện đột biến gen *CDH1* ở bệnh nhân và các thành viên trong gia đình bệnh nhân nữ 35 tuổi được chẩn đoán là ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, phát hiện đột biến gen *CDH1* bằng kỹ thuật giải trình tự. Kết quả có bệnh nhân và 7/10 thành viên trong gia đình đều mang đột biến dị hợp tử c.1990 A>C (p.K664Q) nằm trên exon 13. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có yếu tố di truyền trong bệnh ung thư dạ dày lan tỏa và việc xét nghiệm sàng lọc phát hiện đột biến gen *CDH1* ở các thành viên trong gia đình có ý nghĩa quan trọng, để từ đó đưa ra được những tư vấn hợp lý trong phòng và điều trị bệnh UTDD. Đây cũng là một đột biến mới chưa từng được công bố.

Từ khóa: Ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, *CDH1*, đột biến.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư dạ dày (UTDD) là bệnh ung thư phổ biến thứ 5 trên thế giới và là nguyên nhân thứ 3 gây tử vong do ung thư với số lượng ước tính là 783.000 ca tử vong mỗi năm do UTDD.¹ Về mặt mô bệnh học, UTDD được Lauren chia thành 2 thể là thể ruột và thể lan tỏa với sự khác nhau rõ rệt về dịch tế, bệnh nguyên và tiên lượng.² Thể lan tỏa theo phân loại mô bệnh học của Lauren tương ứng với ung thư biểu mô thể tế bào nhầy hay các ung thư kém kết dính khác theo phân loại mô bệnh học của WHO 2010. Nhóm bệnh UTDD có tính chất gia đình chiếm khoảng 10 – 30% các trường hợp nhưng chỉ khoảng 1 – 3% gây ra bởi hội chứng UTDD lan tỏa di truyền.³

Năm 1998, Guilford và cộng sự đã xác định

đột biến gen *CDH1* là nguyên nhân chủ yếu gây ra UTDD lan tỏa di truyền, thông qua phân tích đột biến trên 3 gia đình người Maori (New Zealand) mắc UTDD lan tỏa khởi phát sớm.⁴ Gen *CDH1* nằm trên nhánh dài NST 16, mã hóa cho E - cadherin một protein có vai trò quan trọng trong việc bám dính và liên kết tế bào phụ thuộc canxi. Khi xảy ra đột biến gen, mức độ biểu hiện của E - cadherin giảm đi từ đó giảm độ kết dính tế bào, dẫn đến di căn của tế bào ung thư.⁵

Đột biến gen *CDH1* gây nên 70 - 80% nguy cơ tiến triển thành ung thư dạ dày trong suốt cuộc đời ở cả hai giới và 40 - 60% tiến triển thành ung thư vú.⁵ Ở Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu về UTDD từ dịch tế học, nguyên nhân, điều trị bệnh đến đặc điểm lâm sàng và mô bệnh học trong UTDD, tuy nhiên, trong các nghiên cứu trên chỉ chẩn đoán được bệnh khi khối u đã hình thành. Mặt khác, các biểu hiện lâm sàng trong UTDD lan tỏa di truyền thường

Tác giả liên hệ: Đặng Thị Ngọc Dung,

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: ngoczung@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 22/11/2019

Ngày được chấp nhận: 14/01/2020

khó phát hiện ở giai đoạn sớm, bệnh nhân đến với các biểu hiện nặng khi ung thư trong giai đoạn tiến triển hoặc giai đoạn cuối, do đó tiên lượng bệnh thường xấu.⁶ Hiệp hội liên kết Ung thư dạ dày thế giới (IGCLC) đã đưa ra khuyến cáo cắt dạ dày dự phòng đối với những cá nhân phát hiện đột biến gây bệnh trên gen *CDH1* ở độ tuổi 20 – 30.⁶ Tất cả các bệnh nhân có tiền sử gia đình mắc ung thư dạ dày cần phải được xem xét một cách toàn diện về phả hệ và cần làm các xét nghiệm xác định đột biến trên *CDH1* nếu phù hợp với các tiêu chí do IGCLC đề xuất.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả một trường hợp được chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền, tiến hành xác định đột biến gen *CDH1* ở bệnh nhân và các thành viên còn lại trong gia đình của bệnh nhân.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân được chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền theo tiêu chuẩn của IGCLC 2015.⁷ Tiến hành lập phả hệ và xác định đột biến gen *CDH1* ở bệnh nhân và các thành viên nằm trong 3 thế hệ gia đình bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền.

Tiêu chuẩn chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền

Bệnh nhân được chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền theo tiêu chuẩn của Hiệp hội liên kết Ung thư dạ dày thế giới (IGCLC) 2015,⁷ bao gồm một trong các tiêu chuẩn:

1) Gia đình có từ 2 người trở lên bị ung thư dạ dày ở thế hệ thứ nhất hoặc thế hệ thứ hai bất kể lứa tuổi, trong đó có ít nhất một trường hợp chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa.

2) Một trường hợp ung thư dạ dày lan tỏa chẩn đoán trước 40 tuổi.

3) Tiền sử cá nhân hoặc gia đình có trường hợp bị ung thư dạ dày lan tỏa và ung thư vú thùy ở thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai, trong đó có

một trường hợp chẩn đoán trước 50 tuổi.

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang và mô tả ca bệnh

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các đối tượng tham gia nghiên cứu được xác định đột biến gen *CDH1* tại Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng xét nghiệm, trường Đại học Y Hà Nội. Thời gian nghiên cứu từ tháng 11/2016 đến tháng 9/2019.

Phương pháp

- Lấy mẫu: bệnh nhân và 10 thành viên trong gia đình sẽ được lấy 2ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA.

- Kỹ thuật tách chiết DNA từ máu ngoại vi: Các mẫu DNA được tách chiết theo quy trình của Exgene Blood SV mini (GeneAll, Hàn Quốc). Nồng độ DNA và độ tinh sạch được kiểm tra bằng phương pháp đo quang, dựa vào tỷ lệ A260nm/A280nm = 1,8 – 2,0.

- Kỹ thuật PCR: PCR được sử dụng để khuếch đại 16 exon của gen *CDH1* với cặp mồi đặc hiệu. Thiết kế mồi sử dụng phần mềm Primer - Blast NCBI, phần mềm CLC Workbenches 8.0 và phần mềm check mồi Olygo Analyzer tool của IDT. Trình tự mồi của exon 13:

Mồi xuôi: TACCGAACCCAGCGACATC

Mồi ngược: GGCTGGCATAACTTGGGAGT

- Thành phần phản ứng PCR có thể tích là 25µl gồm các thành phần sau: 12,5 µl Taq Master 2X (hãng New England BioLabs), 0,5 µl mồi xuôi, 0,5 µl mồi ngược, 1 µl DNA, 10,5 µl nước cất PCR.

- Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: Đầu tiên là giai đoạn biến tính ở 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ bao gồm: biến tính 94°C/30 giây, gắn mồi tùy thuộc vào Tm của từng mồi/30 giây, bước kéo dài 72°C/30 giây, cuối cùng là giai đoạn hoàn chỉnh 72°C/5 phút. Bảo quản mẫu ở 10°C.

- Sản phẩm PCR thu được sẽ được

tiến hành tinh sạch với hóa chất BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Sản phẩm sau khi được tinh sạch sẽ tiến hành giải trình tự trực tiếp trên hệ thống máy ABI 3730 XL (Thermo Fisher). Kết quả được thu thập và xử lý bằng phần mềm BioEdit 7.2.6 và ApE - A plasmid Editor 2.0.3. Trình tự được so sánh trên GeneBank để phát hiện đột biến.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được thông qua Hội đồng Đạo đức số 198/HĐĐĐĐHYHN ngày 21 tháng 9 năm 2016 trong Nghiên cứu Y sinh học của Trường Đại học Y Hà Nội. Bệnh nhân và người nhà tham gia nghiên cứu là hoàn toàn tự nguyện và có quyền rút khỏi nghiên cứu. Các thông tin cá nhân được đảm bảo bí mật.

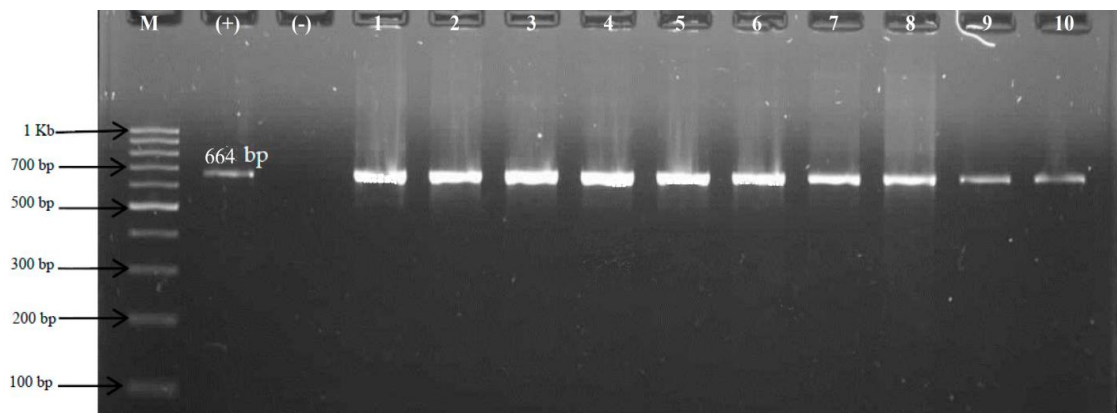
III. KẾT QUẢ

1. Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu

Bệnh nhân nữ 35 tuổi vào viện vì ngất xỉu do tình trạng thiếu máu, bệnh nhân được khám và nội soi thực quản dạ dày. Kết quả nội soi cho thấy có ổ loét vùng thân vị kích thước khoảng 1,2cm với test HP (*H.Pylori*) âm tính. Kết quả

mô bệnh học vết loét dạ dày phát hiện mắc ung thư biểu mô tế bào nhẵn xâm nhập thanh mạc, thần kinh và di căn hạch (pT3N1). Bệnh nhân được mổ cắt 4/5 dạ dày và mạc nối lớn, nạo vét hạch đến D4. Bỏ đẻ của bệnh nhân chết vì UTDD ở tuổi 64. Bệnh nhân được chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền theo tiêu chuẩn: gia đình có từ 2 người trở lên bị ung thư dạ dày ở thể hệ thứ nhất hoặc thể hệ thứ hai bất kể lứa tuổi, trong đó có ít nhất một trường hợp chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa.

Giải trình tự toàn bộ 16 exon gen *CDH1* của bệnh nhân và phát hiện một biến đổi c.1990 A > C (p.K664Q) trên exon 13 ở trạng thái dị hợp tử, làm thay đổi acid amin từ lysine thành glutamin. Sử dụng chương trình dự đoán khả năng gây bệnh MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) cho thấy sự biến đổi từ lysine (acid amin tích điện dương) thành glutamin (acid amin phân cực ưa nước) có thể ảnh hưởng tới cấu trúc protein và có nguy cơ gây bệnh. Tiến hành phân tích tìm biến đổi c.1990 A > C (p.K664Q) trên gen *CDH1* ở các thành viên còn lại trong gia đình.

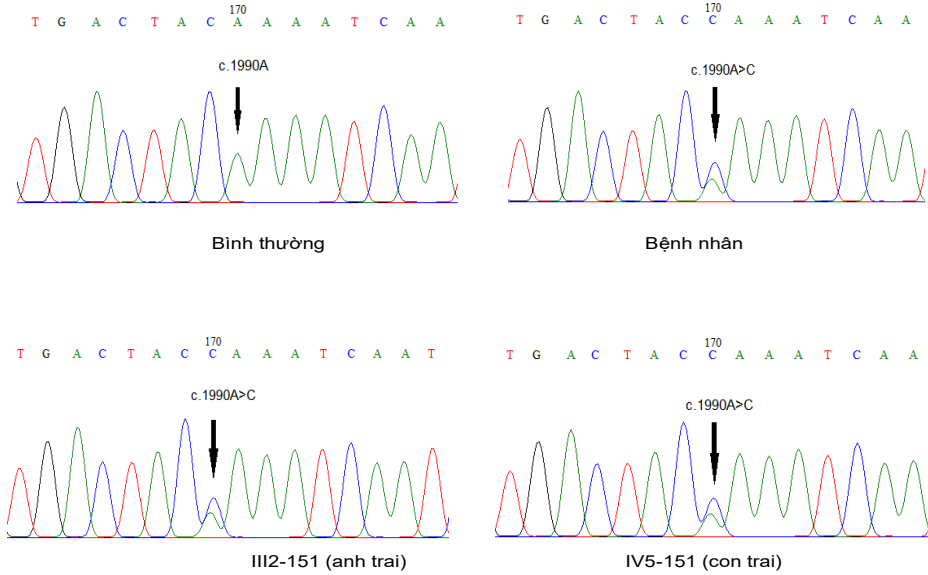


Hình 1. Kết quả PCR khuếch đại exon 13 gen *CDH1* của 10 thành viên (1 – 10), (-): chứng âm, (+): chứng dương, M: marker 100bp.

Kết quả hình 1 cho thấy, sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu, rõ nét và đảm bảo cho phản ứng giải trình tự tiếp theo để phát hiện đột biến điểm.

Sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự gen để xác định đột biến. Kết quả cho thấy 7/10

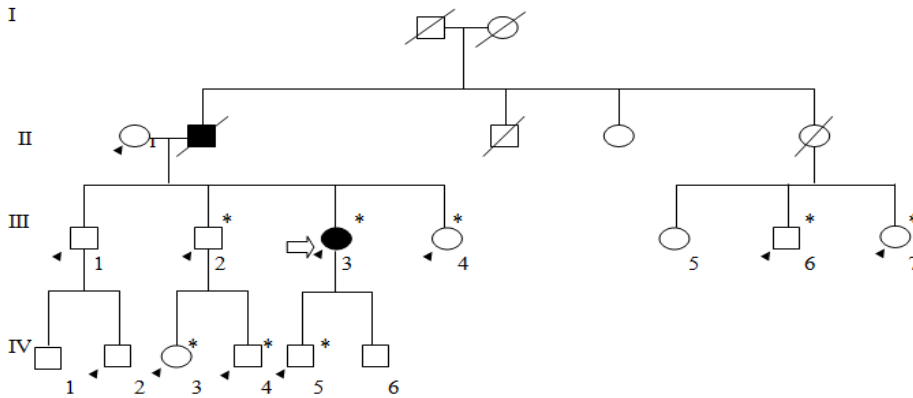
thành viên trong gia đình bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền, cũng có biến đổi tại vị trí c.1990A > C (p.K664Q) nằm trên exon 13.



Hình 2. Hình ảnh giải trình tự gen CDH1 của bệnh nhân và thành viên trong gia đình mang biến đổi c.1990A > C (K664Q) tại exon 13

Chú ý: Các mũi tên thẳng đứng là chỉ vị trí biến đổi, các chữ và số trên mũi tên là chỉ vị trí và sự thay đổi Nucleotid.

PHẢ HỆ GIA ĐÌNH BỆNH NHÂN B151



Chú thích: □ Nam bình thường ○ Nữ bình thường ■ Nam bị bệnh ● Nữ bị bệnh
 / Tử vong ◀ Thành viên tham gia vào nghiên cứu * Thành viên mang đột biến gen CDH1

Hình 3. Phả hệ của gia đình bệnh nhân bị ung thư dạ dày lan tỏa di truyền

Phả hệ gia đình bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền gồm 4 thế hệ, một biến đổi gen mới tại exon

13 của gen *CDH1* (c.1990A > C, p.K664Q) đã được tìm thấy ở bệnh nhân và các thành viên khác trong gia đình. Trong 10 thành viên tham gia nghiên cứu thì biến đổi này xuất hiện ở 7/10 người gồm: người anh trai thứ 2 (III-2), em gái (III-4), 2 người em họ con của cô ruột (III-6, III-7), 2 cháu trai (IV-3, IV-4) và con trai của bệnh nhân (VI-5). Các thành viên mang biến đổi đều ở thể dị hợp làm thay đổi trình tự acid amin ở vị trí 664 từ lysine thành glutamin.

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu của tác giả Oliveria, có khoảng 10% các trường hợp UTDD có tính chất gia đình, nhưng chỉ có 1 – 3% gây ra bởi hội chứng UTDD lan tỏa di truyền.³ Guilford và cộng sự (1998) là người đầu tiên xác định đột biến gen *CDH1* là nguyên nhân chủ yếu gây ra UTDD lan tỏa di truyền.⁴ Chức năng của gen *CDH1* là mã hóa E – cadherin, một protein đóng vai trò quan trọng trong sự kết dính tế bào, duy trì sự toàn vẹn của biểu mô. Trong cấu trúc của protein E – cadherin miền ngoại bào gồm 5 tiểu phần đi đôi cùng nhau (EC1 – EC5) được mã hóa bởi exon 4 đến 13. Miền ngoại bào lớn này chịu trách nhiệm cho việc liên kết Ca²⁺ là yếu tố quan trọng đối với sự kết dính tế bào.⁸

Biến đổi dị hợp tử c.1990 A > C (p.K664Q) nằm trên exon 13 của gen *CDH1*, làm thay đổi acid amin ở vị trí 664 từ lysine thành glutamin, xuất hiện ở bệnh nhân và một số thành viên khác trong gia đình. Đây là một biến đổi mới chưa được công bố trước đây, nằm trên exon 13 mã hóa cho miền ngoại bào tại tiểu phần EC5, nơi tiếp giáp với miền xuyên màng đơn, khu vực quan trọng cho đặc tính kết dính tế bào.⁸ Sử dụng chương trình dự đoán khả năng gây bệnh MutationTaster cho thấy sự biến đổi từ lysine (acid amin tích điện dương) thành glutamin (acid amin phân cực ưa nước) có nguy cơ gây bệnh. Tuy nhiên để khẳng định mức độ gây bệnh của biến đổi này, cần phải có

thêm những nghiên cứu sâu hơn trên cả invitro và invivo. Hiện nay trên thế giới cũng chưa có đột biến nào được công bố tại vị trí c.1990A trên exon 13 của gen *CDH1*.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 10 thành viên trong gia đình bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền đồng ý tham gia vào nghiên cứu, có 7/10 thành viên mang biến đổi dị hợp tử gen *CDH1* giống bệnh nhân, trong đó thành viên trẻ nhất 16 tuổi mang biến đổi là con trai cả của bệnh nhân. Tất cả 10 thành viên tham gia nghiên cứu đều chưa được chẩn đoán UTDD tại thời điểm nghiên cứu. Bố của bệnh nhân đã từng được chẩn đoán và tử vong do UTDD tại thời điểm trước nghiên cứu, tuy chưa phân tích được đột biến gen nhưng liên quan tới tiền sử gia đình là yếu tố nguy cơ rõ rệt. Do đó một số thách thức được đặt ra trong việc tư vấn di truyền và quản lý lâm sàng ở các thành viên gia đình mang đột biến gen *CDH1*, như tuổi khởi phát hay thời gian cắt dạ dày dự phòng ở những người mang đột biến.

UTDD lan tỏa di truyền là bệnh di truyền hiếm gặp, di truyền trội nằm trên NST thường, do đó nguy cơ ung thư có thể được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác trong gia đình, nhưng không phải tất cả những người thừa kế đột biến gen *CDH1* sẽ phát triển thành ung thư. Nghiên cứu của Pharoah và cộng sự cho thấy nguy cơ tích lũy UTDD lan tỏa do đột biến gen *CDH1* đến 80 tuổi là 67% ở nam và 83% ở nữ, ngoài ra nguy cơ tích lũy của ung thư vú thùy ở phụ nữ đến 80 tuổi là 39%. Nghiên cứu cũng cho thấy ước tính nguy cơ mắc bệnh < 1% trước tuổi 20, tăng lên 4% ở tuổi 30 và tỷ lệ tăng lên 21% đối với nam và 46% đối với nữ ở tuổi 50.⁹ Bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền do đột biến gen *CDH1* có tỷ lệ sống thấp hơn ở 1 và 5 năm (tương ứng 36% và 4%) so với bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền mà không có đột biến (tương ứng 48% và 13%), qua đó nhấn

mạnh mẽ quan trọng của việc sàng lọc đột biến gen *CDH1* ở những gia đình bị bệnh.⁶

Nghiên cứu của chúng tôi bước đầu xác định được một biến đổi gen *CDH1* trên phả hệ gia đình bệnh nhân nữ 35 tuổi bị UTDD lan tỏa di truyền. Mặc dù cho tới thời điểm hiện tại 7/10 thành viên phát hiện biến đổi chưa phát hiện ung thư dạ dày, nhưng việc khuyến cáo giám sát chặt chẽ bằng nội soi thực quản - dạ dày - tá tràng theo IGCLC là vô cùng quan trọng trong thời điểm hiện tại.¹⁰ Tuy nhiên, sự hiện diện của tổn thương rất khó phát hiện trong giai đoạn đầu trên hình ảnh nội soi và gần như không thể phát hiện được bằng cách lấy mẫu bằng sinh thiết ngẫu nhiên, vì UTDD lan tỏa di truyền khởi phát tại các điểm rời rạc trong lớp dưới niêm mạc dạ dày, nó không tạo ra những thay đổi cấu trúc đại thể rõ ràng. Do đó, một giao thức Cambridge trong nội soi được khuyến nghị với ung thư dạ dày lan tỏa.¹⁰

Hạn chế trong nghiên cứu chúng tôi vẫn chưa lấy được hết các mẫu người thân trong 3 thế hệ và rất cần những nghiên cứu sâu hơn nữa để khẳng định khả năng gây bệnh của biến đổi này, từ đó đưa ra được các khuyến cáo đúng đắn cho những người mang gen bệnh.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện một biến đổi c.1990 A > C (p.K664Q) trên exon 13 của gen *CDH1* ở bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền và 7 thành viên trong gia đình.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mang mã số 106-YS.02-2015.37. Nhóm nghiên cứu cũng xin chân thành cảm ơn bệnh nhân và người nhà đã đồng ý tham gia nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*.2018;68(6):394 - 424.
2. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So - Called Intestinal - Type Carcinoma. An Attempt at a Histo - Clinical Classification. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 1965;64:31 - 49.
3. Oliveira C, Suriano G, Ferreira P, et al. Genetic screening for familial gastric cancer. *Hereditary cancer in clinical practice*.2004;2(2):51 - 64.
4. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, al. e. E - cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*.1998;392(6674):402 - 405.
5. Lynch HT, Kaurah P, Wirtzfeld D, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis, genetic counseling, and prophylactic total gastrectomy. *Cancer*. 2008;112(12):2655 - 2663.
6. van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline *CDH1* mutation carriers. *Journal of medical genetics*.2015;52(6):361 - 374.
7. Hansford S, Kaurah P, Li - Chang H, al. e. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: *CDH1* Mutations and Beyond. *JAMA oncology*. 2015;1(1):23 - 32.
8. Parisini E, Higgins JM, Liu JH, Brenner MB, Wang JH. The crystal structure of human E - cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *Journal of molecular biology*. 2007;373(2):401 - 411.
9. Pharoah PD, Guilford P, Caldas

C, International Gastric Cancer Linkage C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E - cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*. 2001;121(6):1348 - 1353.

10. Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *Journal of medical genetics*. 2010;47(7):436 - 444.

Summary

A NEW MUTATION OF THE *CDH1* GENE IN A FAMILY WITH HEREDITARY DIFFUSE GASTRIC CANCER

Hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) is a rare form of gastric cancer with poor prognosis. Most cases of HDGC are caused by a chromosomal dominant mutation in the *CDH1* gene and 70 - 80% of *CDH1* mutation carriers are at risk for developing gastric cancer. When a patient is diagnosed with HDGC, an estimated 38% of other family members carry the *CDH1* gene mutation. The study was conducted to detect mutations in the *CDH1* gene in patient and family members who were diagnosed with HDGC; direct sequencing is performed to detect the gene mutation. Result, shows that the patient and 7/10 members have the same mutation c.1990 A > C (p.K664Q) on exon 13. Our research shows that there is a genetic element in diffuse gastric cancer and screening tests to detect mutations of the *CDH1* gene in family members. This novel gene mutation has not been reported to date and its discovery is important to provide reasonable advice in the prevention and treatment of HDGC.

Keywords: Hereditary diffuse gastric cancer, *CDH1*, mutation