

Đột biến gen *BRAF V600E* và mối liên quan với đặc điểm mô bệnh học trong ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá tái phát, di căn

BRAF V600E mutation and relationship with histopathologic characteristics of metastatic, recurrent differentiated thyroid carcinoma

Ngô Thị Minh Hạnh, Trịnh Tuấn Dũng,
Hoàng Quốc Trường

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ đột biến gen *BRAF V600E* và tìm hiểu mối liên quan giữa đột biến *BRAF V600E* với một số đặc điểm mô bệnh học trong ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá tái phát, di căn. **Đối tượng và phương pháp:** 104 bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá tái phát, di căn được phẫu thuật tổn thương tái phát, di căn tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 3/2012 đến tháng 7/2018. Bệnh phẩm tái phát, di căn được xét nghiệm giải phẫu bệnh đánh giá đặc điểm mô bệnh học và xét nghiệm đột biến gen *BRAF V600E* bằng kỹ thuật realtime PCR. **Kết quả:** Trong 104 mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá tái phát, di căn có 14 (13,5%) mẫu tái phát tại giường tuyến giáp, 94 (90,4%) mẫu di căn hạch và 7 (6,7%) trường hợp di căn từ vị trí khác như da, khí quản và tuyến ức. Ung thư biểu mô tuyến giáp thể nhú chiếm chủ yếu (96,1%), thể nang chiếm 3,9%. Tỷ lệ đột biến gen *BRAF V600E* là 70,2%. Tỷ lệ đột biến *BRAF V600E* trong nhóm xâm nhập xơ mỡ ngoài hạch cao hơn 2,5 lần so với trường hợp không xâm nhập (95% CI: 1,02 - 6,55). Không có mối liên quan giữa đột biến *BRAF V600E* và tình trạng xâm nhập mạch, hoại tử và đặc điểm canxi hóa. **Kết luận:** Tỷ lệ đột biến gen *BRAF V600E* trong ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá tái phát, di căn khá cao và có liên quan đến tình trạng xâm nhập xơ mỡ ngoài hạch.

Từ khoá: Đột biến *BRAF V600E*, ung thư tuyến giáp thể biệt hoá, tái phát, di căn.

Summary

Objective: To investigate the prevalence of *BRAF V600E* mutation and relationship between *BRAF V600E* and histopathological characteristics of metastatic, recurrent differentiated thyroid carcinoma. **Subject and method:** Histological samples were collected from 104 patients who underwent surgical operation for lesions of recurrent, metastatic differentiated thyroid carcinoma at 108 Military Central Hospital from March 2012 to July 2018. Histopathological assessment was undertaken for all collected samples. *BRAF V600E* mutation was determined by realtime PCR using the CE-IVD, thyroid cancer mutation analysis kit. **Result:** Of the 104 patients, 14 (13.5%) had recurrence at thyroid bed, 94 had (90.4%) lymph node metastasis, and 7 (6.7%) had

Ngày nhận bài: 31/7/2019, ngày chấp nhận đăng: 18/8/2019

Người phản hồi: Ngô Thị Minh Hạnh, Email: ngominhhanh108@gmail.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

other metastasis. *BRAF V600E* mutation was found in 70.2% examined samples. Papillary thyroid carcinoma was the most common (96.1%), follicular thyroid carcinoma takes into account 3.9%. The prevalence of *BRAF V600E* mutation among extra-lymph node invasion samples was 2.5 times higher than that among non-invasion ones (95% CI: 1.02 - 6.55), there was no significant relationship between *BRAF V600E* mutation and vascular invasion, necrosis and calcification lesions. *Conclusion:* The prevalence of *BRAF V600E* mutation in recurrent, metastatic differentiated thyroid carcinoma was high (70.2%), and was associated with extra-lymph node invasion.

Keywords: *BRAF V600E*, differentiated thyroid carcinoma, metastasis, recurrence.

1. Đặt vấn đề

Ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá (UTBMTGBH) là loại ung thư phổ biến nhất của ung thư tuyến giáp và tỷ lệ mắc mới của loại ung thư này vẫn đang tiếp tục tăng. Bệnh có tiên lượng tốt, tỷ lệ sống thêm trên 10 năm trên 90% [1]. Tuy nhiên, bệnh có tỷ lệ tái phát và di căn khá cao, từ 5% - 30%. Những trường hợp này thường tiến triển nhanh, và có tiên lượng xấu, đặc biệt là những trường hợp không đáp ứng với điều trị I¹³¹.

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu cho thấy đột biến gen *BRAF V600E* không chỉ tham gia vào sự hình thành của UTBMTGBH, làm tăng nguy cơ tái phát, di căn hay tiến triển mà còn liên quan đến quá trình hấp thu i-ốt. Các tiến bộ trong nghiên cứu đột biến gen *BRAF V600E* trong ung thư tuyến giáp đã mở ra một hướng nghiên cứu về liệu pháp điều trị đích phân tử, và cá thể hóa quá trình điều trị bệnh. Tuy nhiên, việc cá thể hóa điều trị vẫn cần thêm nhiều thông tin về đột biến gen. Cho tới nay, tại Việt Nam, có rất ít nghiên cứu về đột biến *BRAF V600E*, cũng như mối liên quan của nó các đến đặc điểm giải phẫu bệnh. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm: *Xác định tỷ lệ đột biến gen BRAF V600E và đánh giá mối liên quan của đột biến này với một số đặc điểm mô bệnh học trong ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá tái phát, di căn.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu lựa chọn 104 bệnh nhân (BN) UTBMTGBH được phẫu thuật tổn thương tái

phát, di căn tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 3/2012 đến tháng 7/2018.

Tiêu chuẩn lựa chọn: BN có chẩn đoán mô bệnh học (MBH) là UTBMTG thể biệt hóa, không có di căn xa tại thời điểm chẩn đoán ban đầu, được phẫu thuật toàn bộ tuyến giáp, điều trị I¹³¹, không có bằng chứng khối u trên lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh trong vòng 6 tháng sau lần điều trị i-ốt đầu tiên; được khẳng định ung thư bằng mô bệnh học sau mổ tổn thương tái phát/di căn, có đầy đủ hồ sơ bệnh án, tiêu bản và khối nén lưu trữ.

2.2. Phương pháp

Thiết kế mô tả cắt ngang đã được áp dụng trong nghiên cứu này.

Khai thác hồ sơ bệnh án.

Đọc lại toàn bộ tiêu bản và xác định MBH theo phân loại của WHO 2017.

Xét nghiệm đột biến gen *BRAF V600E* bằng kỹ thuật RealTime PCR:

Tách chiết ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm cắt từ khối nén: Các mẫu bệnh phẩm cắt từ khối nén của mẫu UTBMTG thể biệt hóa tái phát, di căn và nhóm chứng được tiến hành tách chiết ADN tổng số sử dụng bộ sinh phẩm CE-IVD, Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Invisorb) của hãng Stratec, Đức.

Phát hiện đột biến gen *BRAF V600E* bằng kỹ thuật khuếch đại gen theo thời gian thực (RealTime PCR) sử dụng bộ sinh phẩm CE-IVD, Thyroid Cancer Mutation Analysis Kit của hãng EntroGen, Mỹ. Chất lượng tách chiết ADN từ mẫu bệnh phẩm được đánh giá bởi kết quả

khuếch đại của gen nội chuẩn được đánh dấu với Cal Fluor Orange 560 (VIC/HEX)-BHQ. Chu trình nhiệt phát hiện đột biến các gen được thực hiện như sau: [1 chu kỳ x 95°C/10 phút; 40 chu kỳ x 95°C/15 giây, 60°C/60 giây]. Tín hiệu FAM phát hiện các đột biến và VIC cho gen nội chuẩn được thu thập tại bước thứ 3 của chu trình nhiệt.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm chung

Bảng 1. Vị trí tái phát, di căn được phẫu thuật

Vị trí sinh thiết	Số lượng	Tỷ lệ %
Giường tuyến giáp và vị trí phối hợp	14	13,5
Giường tuyến giáp	3	2,9
Giường tuyến giáp + hạch	9	8,7
Giường tuyến giáp + da	1	1,0
Giường tuyến giáp + tuyến ức	1	1,0
Hạch và vị trí phối hợp	94	90,4
Hạch	85	81,7
Hạch và giường tuyến giáp	9	8,7
Da	3	2,9
Khí quản	2	1,9

Nhận xét: Tồn thương tái phát, di căn của UTBMTGBH được phẫu thuật nhiều nhất ở hạch (90,4%), giường tuyến giáp chiếm 13,5%, tái phát tại giường tuyến giáp và di căn hạch chiếm 8,7%. Vị trí di căn khác được phẫu thuật gặp ở khí quản, da và tuyến ức.

Bảng 2. Các thể mô bệnh học của ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá tái phát, di căn

Thể mô bệnh học	Số lượng (%)
Thể nhú	100 (96,1)
Các biến thể nhú trung gian	66 (63,5)
Thể nhú thông thường	56 (53,8)
Thể nhú biến thể nang	2 (1,9)
Thể nhú biến thể tế bào sáng	2 (1,9)
Các biến thể nhú tiến triển	40 (38,5)
Thể nhú biến thể tế bào cao	21 (20,2)
Thể nhú biến thể tế bào trụ	4 (3,8)
Thể nhú biến thể tế bào ưa axit	4 (3,8)
Thể nhú với tế bào hình thoi	1 (1,0)

Thẻ nhú biến thể Hobnail	10 (9,6)
Thẻ nang	4 (3,9)

Nhận xét: 96,1% là UTBMTG thẻ nhú, thẻ nhú thông thường chiếm tỷ lệ cao nhất (53,8%), tiếp đến là biến thể tế bào cao (20,2%), biến thể Hobnail chiếm 9,4%. Tỷ lệ UTBMTG thẻ nang chỉ chiếm 3,9%.

3.2. Tỷ lệ đột biến gen *BRAF V600E* và mối liên quan *BRAF V600E* với một số đặc điểm mô bệnh học trong ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá tái phát, di căn

Bảng 4. Tỷ lệ đột biến gen *BRAF V600E*

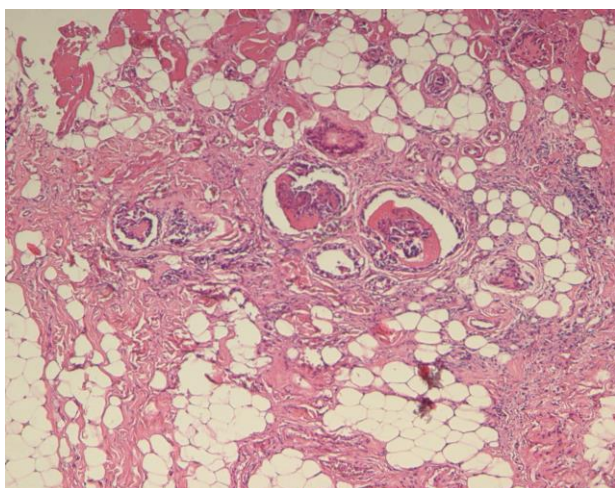
Phương pháp sinh học phân tử	Số lượng (n)	Tỷ lệ %
Dương tính	73	70,2
Âm tính	31	29,8
Tổng	104	100

Nhận xét: Tỷ lệ đột biến gen *BRAF V600E* được xác định bằng phương pháp sinh học phân tử Real-time PCR là 70,2%.

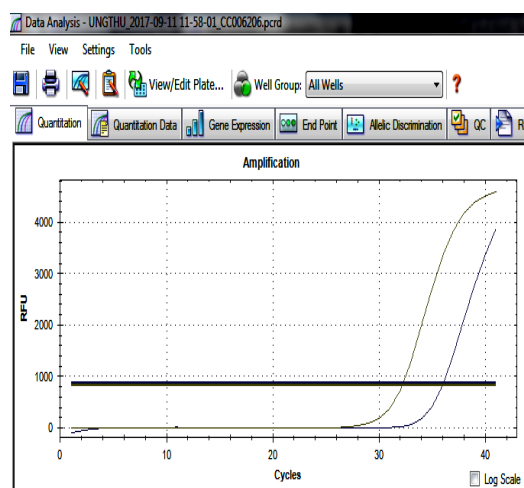
Bảng 5. Mối liên quan giữa đột biến *BRAF V600E* với đặc điểm mô bệnh học vi thể

Đặc điểm		Đột biến gen <i>BRAF V600E</i>		OR (95% CI)
		Dương tính n, (%)	Âm tính n, (%)	
Xâm nhập mạch (n = 104)	Không xâm nhập	59 (70,2)	25 (29,8)	1
	Có xâm nhập	14 (70,0)	6 (30,0)	0,99 (0,34 - 2,87)
Xâm nhập xơ mỡ ngoài hạch (n = 94)	Không xâm nhập	26 (61,9)	16 (38,1)	1
	Có xâm nhập	42 (80,8)	10 (19,2)	2,59 (1,02 - 6,55)
Hoại tử (n = 104)	Không có hoại tử	62 (69,7)	27 (30,3)	1
	Có hoại tử	11 (73,3)	4 (26,7)	1,2 (0,35 - 4,10)
Canxi (n = 104)	Không có canxi	52 (70,3)	22 (29,7)	1
	Có canxi	21 (70,0)	9 (30,0)	0,99 (0,40 - 2,50)

Nhận xét: Tỷ lệ đột biến *BRAF V600E* trong nhóm xâm nhập xơ mỡ ngoài hạch cao hơn 2,5 lần so với trường hợp không xâm nhập với 95% CI: 1,02 - 6,55. Không tìm thấy mối liên quan đột biến *BRAF V600E* với tình trạng xâm nhập mạch, hoại tử và đặc điểm canxi trong UTBMTGBH tái phát, di căn.



Tế bào u tạo nang xâm nhập xơ mỡ



Đột biến BRAF V600E

Hình 1. Hình ảnh mô bệnh học và đột biến gen *BRAF V600E* (Mã số B1946)

4. Bàn luận

4.1. Đặc điểm chung

Vị trí tái phát, di căn:

UTBMTGBH tái phát, di căn gặp nhiều nhất ở hạch, chiếm 90,4% (Bảng 1). Vị trí tái phát hay được phẫu thuật tại giường tuyến giáp (13,5%), ngoài ra gặp ở các vị trí khác như khí quản, da, tuyến ức. Tái phát tại giường tuyến giáp và di căn hạch chiếm 8,7% (Bảng 1). Tỷ lệ tái phát hay gặp nhất ở hạch, tiếp đến vị trí giường tuyến giáp và di căn xa [1], [5], [8].

Các thể mô bệnh học của UTBMTGBH tái phát, di căn.

UTBMTGBH bắt nguồn từ tế bào biểu mô nang tuyến giáp gồm hai thể chính là UTBMTG thể nhú và UTBMTG thể nang. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ UTBMTG thể nhú tái phát, di căn chiếm cao nhất 96,1%, thể nang chiếm 3,9% (Bảng 2). Tỷ lệ này cũng tương tự trong nghiên cứu chủ yếu là UTBMTG thể nhú (trên 90%), tỷ lệ thể nang thấp hơn [1], [8]. UTBMTG thể nhú thường di căn hạch và UTBMTG thể nang thường di căn theo đường máu, thậm chí ngay tại thời điểm phát hiện khối u nguyên phát đã có di căn phổi, xương, não... và thông thường những vị trí đó dường như không thể phẫu thuật. Do đó, mẫu nghiên cứu của chúng tôi tập trung chủ yếu vào nhóm tái phát, di căn có thể phẫu thuật được.

Chính vì vậy, số liệu chúng tôi thu nhận được ở thể nang thấp hơn nhiều so với thể nhú.

4.2. Tỷ lệ đột biến gen *BRAF V600E* và mối liên quan đột biến gen *BRAF V600E* với một số đặc điểm mô bệnh học trong UTBMTGBH tái phát, di căn

Tỷ lệ đột biến gen *BRAF V600E* trong UTBMTGBH tái phát, di căn

Trong nghiên cứu của chúng tôi, đột biến *BRAF V600E* xuất hiện ở 70,2% các trường hợp UTBMTGBH tái phát, di căn (Bảng 3). Tỷ lệ này dường như cao hơn tỷ lệ đột biến gen ở mẫu nguyên phát, có thể lên tới hơn 85% [2], và có sự phối hợp với đột biến chuyển đoạn gen *RET* trong UTBMTG, đặc biệt trong mẫu tái phát, di căn [3]. Những nghiên cứu này cho thấy tình trạng đột biến *BRAF V600E* liên quan đến tái phát UTBMTGBH có tỷ xuất chênh dao động 3 - 5 lần so với những trường hợp không đột biến *BRAF V600E* với giá trị dự báo dương tính và giá trị dự báo âm tính tương ứng là 30% và 90% [4]. Nghiên cứu của Xing và cộng sự năm 2015 tổng hợp từ nhiều nghiên cứu cho thấy BN tái phát có tỷ lệ đột biến *BRAF V600E* cao hơn có ý nghĩa thống kê với nhóm tái phát không có đột biến. Cụ thể, tỷ lệ tái phát UTBMTG thể nhú là 47,71% ở nhóm có đột biến *BRAF V600E* so với tỷ lệ tái phát 26,03% ở nhóm không đột biến *BRAF* ước tính trên 1000 dân/năm [5]. Nhưng

phần lớn các báo cáo nói đến tình trạng đột biến gen *BRAF V600E* ở các khối u nguyên phát, ít nghiên cứu xác định tình trạng đột biến *BRAF V600E* trong mẫu tái phát. Nghiên cứu của chúng tôi không xác định tình trạng đột biến ở mẫu nguyên phát như trong nghiên cứu của Barollo. Trong nghiên cứu này, tác giả so sánh tình trạng đột biến *BRAF V600E* ở mẫu nguyên phát và tái phát của UTBMTGBH thì cũng cho kết quả khá tương đồng, ngay cả đột biến ở những lần tái phát khác nhau [6]. Nhìn chung trong UTBMTGBH, tình trạng đột biến gen *BRAF V600E* được khảo sát ở cả mẫu nguyên phát và tái phát đều cho kết quả tương đồng ngay cả ở các thời điểm các lần tái phát khác nhau. Trong điều kiện Việt Nam, việc xác định tình trạng đột biến gen linh hoạt. Những trường hợp mẫu bệnh phẩm u nguyên phát của UTBMTGBH được lưu trữ một thời gian khá lâu trong điều kiện bảo quản không tốt (tính kháng nguyên cũng như chất lượng AND không được đảm bảo) nên khi bệnh tái phát, di căn có chỉ định phẫu thuật sẽ được phẫu thuật tổn thương tái phát di căn và được làm xét nghiệm đột biến gen trên chính mẫu tái phát, di căn. Còn trong những trường hợp BN sau một thời gian điều trị, bệnh tiến triển mà không có khả năng phẫu thuật thì có thể thực hiện xét nghiệm đột biến gen *BRAF V600E* trên mẫu u nguyên phát được bảo quản trong khối nền paraffin trong nhiều năm, cho phép xác định tình trạng đột biến gen để các nhà lâm sàng lựa chọn liệu pháp điều trị thích hợp tiếp theo.

Mối liên quan đột biến gen BRAF V600E với đặc điểm mô bệnh học trong UTBMTGBH tái phát, di căn

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ đột biến *BRAF V600E* trong nhóm xâm nhập xơ mỡ ngoài hạch cao hơn 2,5 lần so với trường hợp không xâm nhập với 95% CI: 1,02 - 6,55 (Bảng 4). Xâm nhập được xem như là yếu tố u tiến triển và được các nhà giải phẫu bệnh xác định khi các tế bào u vượt qua vỏ hạch vào mô xơ mỡ quanh hạch. Xâm nhập ngoài hạch làm tăng giai đoạn bệnh [7] và xâm nhập ngoài hạch trong UTBMTG thể nhú tăng nguy cơ tái phát, di căn xa và tỷ lệ tử vong [8], [9]. Trong nghiên cứu của Ricate-

Fihlo cho thấy đột biến *BRAF V600E* không liên quan đến tuổi, giới, kích thước u, xâm nhập ngoài tuyến giáp, xâm nhập mạch cũng như xâm nhập xơ mỡ ngoài hạch nhưng giá trị tiên lượng thời gian sống bệnh tăng lên đáng kể khi kết hợp đột biến *BRAF V600E* với sự hiện diện của xâm nhập ngoài hạch. Giá trị dự báo thời gian sống bệnh tăng thêm lên khi liên quan cả đột biến *BRAF V600E* và xâm nhập xơ mỡ ngoài hạch với $p=0,004$ so với một yếu tố tiên lượng là *BRAF* ($p=0,02$) hoặc xâm nhập xơ mỡ ngoài hạch ($p=0,12$) [9]. Điều này có thể được giải thích là *BRAF V600E* là nguyên phân phát sinh ung thư như là điều kiện bắt buộc nhưng không đủ để gây ra tiến triển bệnh trong UTBMTG thể nhú mà có sự phối hợp với các yếu tố tiên lượng khác. Ngược lại với giá trị đột biến gen *BRAF V600E* được xem như là dấu ấn tiềm năng thúc đẩy phát triển khối u thì sự phát triển xâm nhập xơ mỡ ngoài hạch được coi như là bằng chứng muộn của con đường tiến triển của UTBMTG thể nhú. Thực tế, Knauf và cộng sự đã chỉ ra trên mô hình tiền lâm sàng về sự tiến triển của UTBMTG có đột biến gen *BRAF* sang thể tiến triển hơn liên quan đến sự chuyển dạng thể bào trung biểu mô đòi hỏi chuyển dạng tín hiệu TGF β và con đường MAP kinase [10]. Ngoài ra, sự biểu hiện xâm nhập ngoài hạch có thể là dấu hiệu lan tràn tế bào u. BN có khối u mang đột biến *BRAF V600E* không xâm nhập ngoài hạch có thể bệnh khu trú tại chỗ và phẫu thuật khối trong khi có xâm nhập ngoài hạch thì khó có thể điều trị trong tình trạng đột biến *BRAF V600E* lại có khuynh hướng kháng liệu pháp điều trị i-ốt [4]. Do đó, thêm nhiều yếu tố bất lợi làm cho tình trạng bệnh UTBMTGBH tiến triển thêm.

5. Kết luận

Tỷ lệ đột biến gen *BRAF V600E* trong ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá tái phát, di căn là 70,2%, và có liên quan đến tình trạng xâm nhập xơ mỡ ngoài hạch.

Không thấy có mối liên quan đột biến *BRAF V600E* với tình trạng xâm nhập mạch, hoại tử và đặc điểm canxi trong ung thư biểu mô tuyến giáp thể biệt hoá, tái phát và di căn.

Tài liệu tham khảo

1. Mazzaferri EL, Kloos RT (2001) *Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer*. J Clin Endocrinol Metab 86(4): 1447-1463.
2. Nakayama H, Nakamura Y, Hayashi H et al (2007) *Clinical significance of BRAF (V600E) mutation and Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinomas*. Anticancer Res 27(25B): 3645-3649.
3. Xu X QR, Gattuso P et al (2003) *High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines*. Cancer 63(15): 4561-4567.
4. Xing M (2010) *Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer*. Mol Cell Endocrinol 321(1): 86-93.
5. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D et al (2015) *Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer*. J Clin Oncol 33(1): 42-50.
6. Barollo S, Pennelli G, Vianello F, Watutantrige Fernando S, Negro I, Merante Boschini I et al (2010) *BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancers: The relationship with (131)I and 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability*. Eur J Endocrinol 163(4): 659-663.
7. Al SBe (2010) *AJCC cancer staging manual 7th edition*. Springer: 87-96.
8. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE et al (2016) *2015 American thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: The american thyroid association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer*. Thyroid 26(1): 1-133.
9. Ricarte-Filho J, Ganly I, Rivera M, Katabi N, Fu W, Shaha A et al (2012) *Papillary thyroid carcinomas with cervical lymph node metastases can be stratified into clinically relevant prognostic categories using oncogenic BRAF, the number of nodal metastases, and extra-nodal extension*. Thyroid 22(6): 575-584.
10. Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, Lundsmith E, Ryder M, Salzano M et al (2011) *Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGFbeta signaling*. Oncogene 30(28): 3153-3162.