

MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA CÁC BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN VÀ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG TẠI BỆNH VIỆN K

Vương Diệu Linh¹, Chu Hoàng Hà², Nguyễn Ngọc Quang¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ đột biến KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA; đánh giá tương quan giữa các đột biến gen này với một số đặc điểm bệnh học lâm sàng của bệnh nhân ung thư đại trực tràng.

Đối tượng, phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang 251 mô ung thư đại trực tràng được thu thập tại Bệnh viện K. Xác định đột biến KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA bằng phương pháp realtime-PCR, pyrosequencing và giải trình tự Sanger; tương quan giữa đột biến và một số đặc điểm bệnh nhân bằng kiểm định Chi-square và Fisher.

Kết quả: Tần số đột biến KRAS, BRAF, NRAS, và PIK3CA lần lượt là 34.3%, 6.4%, 7.2% và 17.5%. Đột biến KRAS loại trừ đột biến NRAS và BRAF. Đột biến BRAF thường xảy ra ở bệnh nhân lớn tuổi. Có khác biệt đáng kể giữa đột biến PIK3CA với độ tuổi và mức độ biệt hóa. Ngoài ra, đột biến PIK3CA có xu hướng xảy ra đồng thời với đột biến KRAS nhưng không tồn tại cùng đột biến NRAS và BRAF.

Kết luận: Kết quả của chúng tôi cung cấp thêm thông tin về các dấu ấn phân tử tham gia vào cơ chế phát sinh ung thư đại trực tràng.

Từ khóa: biến đổi di truyền, đặc điểm bệnh học lâm sàng, ung thư đại trực tràng

SUMMARY

STUDY ON RELATIONSHIP BETWEEN GENETIC ABNORMALITIES AND CLINICOPATHOLOGICAL FEATURES IN K HOSPITAL'S PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

Objectives: The main aims of the study were not only to identify the prevalence of KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA molecular modifications but also to evaluate the relationship between gene changes and clinicopathological characteristics of colorectal cancer (CRC).

Materials and methods: A total of 251 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumors from patients who were diagnosed with CRC at National Cancer Hospital K. KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutation were detected by real-time PCR, Pyrosequencing, and Direct sequencing methods, respectively. Chi-square and Fisher's tests were used to determine relation between the mutation of each gene and clinicopathological features.

Results: The frequency of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations were 34.3%, 6.4%, 7.2%, and 17.5%, in turn. KRAS mutation was mutually exclusive against that of NRAS

¹Trung tâm Giải phẫu bệnh và Sinh học Phân tử, Bệnh viện K

²Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam

Chịu trách nhiệm chính: Vương Diệu Linh

SĐT: 0915927988

Email: linhvuong88@gmail.com

Ngày nhận bài: 25/11/2022

Ngày phản biện khoa học: 11/03/2023

Ngày duyệt bài: 31/03/2023

and BRAF mutations in CRC. BRAF mutation, were more usual in older age. A significant association between PIK3CA mutations and age together with differentiation of CRC was determined. In addition, PIK3CA mutation tended to coexist with KRAS but not with NRAS and BRAF mutation.

Conclusion: Our results indicate the information of molecular markers that contribute to self-sufficient oncogenic mechanisms in the carcinogenesis of CRC.

Keywords: Genetic abnormalities, clinicopathological parameters, colorectal cancer.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng (UTĐTT) là ung thư phổ biến, có tỷ lệ tử vong đứng thứ 4 trong các bệnh ung thư. Tỷ lệ UTĐTT ở người da trắng cao hơn đáng kể so với các chủng tộc ở Châu Á. Tuy nhiên, UTĐTT có xu hướng tăng nhanh ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Việt Nam, có thể liên quan đến các yếu tố nguy cơ bao gồm chế độ ăn, thói quen vận động, sử dụng các chất kích thích và ô nhiễm môi trường [4]. Đột biến hoạt hóa KRAS, BRAF và NRAS được xem là yếu tố tiên lượng kháng với kháng thể kháng EGFR. Do đó, cần thiết xác định đột biến RAS/RAF trước khi sử dụng cetuximab và panitumumab, cho phép dự đoán chính xác hiệu quả của kháng thể đơn dòng cũng như đặc điểm phân tử của bệnh nhân UTĐTT [8], [9].

Ngoài ra, Phosphoinositide-3-kinase (PI3K) là họ lipid kinase trong con đường PI3K/AKT/mTOR, đảm nhận nhiều chức năng và thường bị rối loạn điều hòa ở các khối u thể rắn. Nhiều nghiên cứu khẳng định đột biến PIK3CA được quan sát ở nhiều loại ung thư, trong đó có UTĐTT [1], [3], [10]. Đột biến PIK3CA xấp xỉ 10-20% trong

UTĐTT, khoảng 80% các biến đổi tập trung ở exon 9 và exon 20 [10]. Đột biến PIK3CA thường liên quan với đột biến KRAS và methyl hóa quá mức một số gen (the CpG island methylator phenotype, or CIMP) [1], [2]. Kháng thể đơn dòng kháng EGFR là liệu pháp nhắm đích chính đối với UTĐTT di căn, tuy vậy bệnh nhân mang biến đổi PIK3CA ít nhạy cảm hơn với liệu pháp này [10]. Điều này cho thấy các bất thường thuộc con đường RAS/RAF và PI3K nên được đánh giá trước khi điều trị kháng EGFR. Hơn nữa, xác định mối tương tác giữa những thay đổi di truyền bao gồm KRAS, BRAF, NRAS và PIK3CA có thể giúp hiểu chi tiết cơ chế sinh UTĐTT, cũng như giải thích sự đáp ứng khác biệt giữa từng bệnh nhân. Thay đổi RAS/RAF và PIK3CA có thể độc lập hoặc tác động cộng gộp ảnh hưởng tới thời gian và chất lượng sống của bệnh nhân UTĐTT [1], [5]. Mặc dù những hiểu biết mới về cơ chế đã xuất hiện, thông tin về thay đổi phân tử ở bệnh nhân UTĐTT Việt Nam còn chưa rõ ràng. Do đó, nghiên cứu được tiến hành nhằm mục tiêu:

1. Xác định tần suất đột biến KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA.
2. Đánh giá mối liên quan giữa các biến đổi này với một số đặc điểm của bệnh nhân UTĐTT Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

251 mẫu mô UTĐTT được chẩn đoán và thu thập tại Trung tâm GPB - SHPT, Bệnh viện K. Bệnh phẩm đủ chất lượng (chứa ít nhất 30% tế bào ung thư, còn đủ khối nền và tiêu bản H&E) đảm bảo cho xét nghiệm sinh học phân tử.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Nghiên cứu được thực hiện theo phương pháp mô tả cắt ngang với cỡ mẫu tiện lợi sử dụng một số phương pháp trong nghiên cứu sinh học phân tử như:

- Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách chiết từ mẫu đút FFPE sử dụng Bộ mô QIAamp DNA FFPE (Qiagen, Valencia, CA, USA). Nồng độ DNA được xác định bằng máy đo quang phổ Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA).

- Phân tích đột biến: Cobas® KRAS Mutation Test, Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (Roche) và Therascreen NRAS Pyro Kit (Qiagen) lần lượt được sử dụng để xác định đột biến trên exon 2, 3 gen KRAS; V600 exon 15 gen BRAF và exon 2, 3 gen NRAS. Đột biến ở exon 9, 20 gen PIK3CA được phân tích bằng hệ thống ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

- Xử lý số liệu: Phần mềm SPSS 22.0 cho phép phân tích tỷ lệ đột biến KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA; đồng thời đánh giá tương quan giữa đột biến các gen này với một số đặc điểm bệnh học lâm sàng của bệnh nhân thông qua kiểm định Chi-square và Fisher.

- Đạo đức nghiên cứu: Đề tài tuân theo Hội đồng y đức Bệnh viện K.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu

Đặc điểm bệnh nhân UTĐTT được tóm

tắt trong Bảng 1. Độ tuổi trung bình khi chẩn đoán là 59.3 (27 đến 90 tuổi), tỷ lệ bệnh nhân nam/nữ là 1.28. Theo vị trí u, 54.2% ở đại tràng và 45.8% thu thập ở trực tràng; phần lớn khối u là dạng ung thư biểu mô tuyến (74.5%), tiếp đến là dạng ung thư biểu mô tuyến nhày (21.5%), ung thư biểu mô tế bào nhân (2.8%) và ung thư biểu mô tế bào vảy (1.2%). Bệnh phẩm chủ yếu có độ biệt hóa vừa với 63.7%; 53.8% trường hợp di căn hạch Lymph; đa số khối u có đường kính <5 cm (71.7%). Ngoài ra, giai đoạn bệnh của bệnh nhân được phân bố như sau: giai đoạn I (1.6%), giai đoạn II (44.6%), giai đoạn III (45.8%) và giai đoạn IV (8.0%).

3.2. Tần suất đột biến KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA trên bệnh nhân UTĐTT

Tỷ lệ đột biến KRAS, NRAS, BRAF và PIK3CA trên 251 mẫu UTĐTT lần lượt là 34.3%, 6.4%, 7.2% và 17.5% (Bảng 1). Tất cả các biến đổi đều là đột biến thay thế nucleotide dẫn đến thay đổi trình tự axit amin trong trình tự protein. Cụ thể, 77/86 trường hợp (89.5%) đột biến KRAS xảy ra ở codon 12/13 exon 2, 16/16 (100%) đột biến BRAF V600, 14/18 (77.8%) mang đột biến codon 12/13 exon 2 gen NRAS, 33/44 (75.0%) và 11/44 (25%) bệnh nhân mang đột biến PIK3CA lần lượt trên exon 9 và exon 20.

Bảng 1. Đặc điểm bệnh nhân và tỷ lệ đột biến KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA

Đặc điểm	N (%)	Đột biến KRAS	Giá trị p	Đột biến NRAS	Giá trị p	Đột biến BRAF	Giá trị p	Đột biến PIK3CA	Giá trị p
		Có (%)		Có (%)		Có (%)		Có (%)	
	251 (100)	86 (34.3)		18 (7.2)		16 (6.4)		44 (17.5)	
Tuổi									
> 59.3	135 (53.8)	49 (36.3)	0.464	11 (8.1)	0.518	13 (9.6)	0.023	23 (17.0)	0.825
< 59.3	116	37 (31.2)		7 (6.0)		3 (2.6)		21 (18.1)	

	(46.2)								
Giới tính									
Nam	141 (56.2)	44 (31.2)	0.248	10 (7.1)	0.956	10 (7.1)	0.598	34 (24.1)	0.002
Nữ	110 (43.8)	42 (38.2)		8 (7.3)		6 (5.5)		10 (9.1)	
Vị trí khối u									
Đại tràng	136 (54.2)	51 (37.5)	0.240	9 (6.6)	0.712	9 (6.6)	0.864	23 (16.9)	0.779
Trực tràng	115 (45.8)	35 (30.4)		9 (7.8)		7 (6.1)		21 (18.3)	
Phân típ									
UTBM tuyến	187 (74.5)	65 (34.8)		17 (9.1)		13 (7.0)		39 (20.9)	
UTBM tuyến nhày	54(21.5)	17 (31.5)	0.334	0 (0)	0.113	3 (5.6)	0.838	4 (7.4)	0.114
UTBM tế bào vảy	7 (2.8)	4 (57.1)		1 (14.3)		0 (0)		1 (14.3)	
UTBM tế bào nhân	3 (1.2)	0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
Độ biệt hóa									
Cao	12 (4.8)	5 (41.7)		1 (8.3)		2 (16.7)		2 (16.7)	
Vừa	160 (63.7)	58 (36.3)	0.314	15 (9.4)	0.239	10 (6.3)	0.486	36 (22.5)	0.043
Kém	15 (6.0)	2 (13.3)		1 (6.7)		1 (6.7)		1 (6.7)	
Không xác định	64 (25.5)	21 (32.8)		1 (1.6)		3 (4.7)		5(7.8)	
Di căn hạch Lymph									
Có	135 (53.8)	49 (36.3)	0.464	13 (9.6)	0.103	10 (7.4)	0.470	26 (19.3)	0.437
Không	116 (46.2)	37 (31.9)		5 (4.3)		6 (5.2)		18 (15.5)	
Kích thước u									
≥ 5 cm	71 (28.3)	30 (42.3)	0.094	6 (8.5)	0.622	3 (4.2)	0.381	12 (16.9)	0.869
< 5 cm	180 (71.7)	56 (31.1)		12 (6.7)		13 (7.2)		32 (17.8)	
Giai đoạn									
I	4 (1.6)	0 (0)		1 (25.0)		0 (0)		1 (25.0)	
II	112 (44.6)	37 (33.0)	0.362	4 (3.6)	0.150	6 (5.4)	0.817	17 (15.2)	0.832
III	115 (45.8)	40 (34.8)		11 (9.6)		9 (7.8)		22 (19.1)	
IV	20 (8.0)	9 (45.0)		2 (10.0)		1 (5.0)		4 (20.0)	

3.3. Tương quan giữa đột biến KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA với một số đặc điểm bệnh học lâm sàng của bệnh nhân UTĐTT

Sự liên quan giữa đột biến KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA với các đặc điểm bệnh nhân UTĐTT được trình bày trong Bảng 1. Không có sự khác biệt giữa biến đổi KRAS và NRAS với độ tuổi, giới tính, vị trí u, phân típ mô học, độ biệt hóa, sự di căn hạch Lymph, kích thước u và giai đoạn bệnh. Đột biến BRAF phổ biến hơn ở bệnh nhân

trẻ tuổi; biến đổi PIK3CA có tỷ lệ cao hơn ở nam giới và khối u có độ biệt hóa vừa ($p < 0.05$).

Bảng 2 minh họa mối quan hệ giữa các thay đổi của KRAS, BRAF, NRAS và PIK3CA. Kết quả cho thấy trong UTĐTT đột biến KRAS loại trừ đột biến BRAF và NRAS, và liên quan chặt chẽ với đột biến PIK3CA ($p < 0.05$). Trong khi đó, không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa đột biến BRAF và/hoặc NRAS và PIK3CA ($p > 0.05$).

Bảng 2. Tương quan giữa đột biến KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA trong UTĐTT

		Đột biến NRAS		Giá trị p	Đột biến BRAF		Giá trị P	Đột biến PIK3CA		Giá trị P
		Có	Không		Có	Không		Có	Không	
N	251	18	233		16	235		44	207	
Đột biến KRAS				0.001			0.003			0.002
Có	86	0	86		0	86		24	62	
Không	165	18	147		16	149		20	145	
Đột biến NRAS							0.251			0.457
Có	18				0	18		2	16	
Không	233				16	217		42	191	
Đột biến PIK3CA							0.894			
Có	44				3	41				
Không	207				13	194				

IV. BÀN LUẬN

Đường truyền tín hiệu EGFR tham gia vào nhiều chức năng quan trọng của tế bào, rối loạn điều hòa dẫn đến sự phát triển không kiểm soát, xuất hiện ở các khối u thể rắn, bao gồm UTĐTT [1], [3], [5]. Dựa trên các biến đổi của con đường này, liệu pháp kháng thể đơn dòng kháng EGFR được sử dụng giúp cải thiện và điều trị hiệu quả cho bệnh nhân UTĐTT di căn. De Roock W và cs. (2010) khẳng định đột biến KRAS, BRAF, NRAS và PIK3CA liên quan đến tỷ lệ đáp ứng thấp hơn đối với liệu pháp anti-EGFR [3].

Tần suất đột biến KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA được phát hiện lần lượt ở 86/251 (34.3%), 16/251 (6.4%), 18/251 (7.2%), 44/251 (17.5%). Trên thế giới, tỷ lệ đột biến KRAS khác biệt giữa các quần thể khác nhau, dao động 13-66% [1], [2], [6], [7]. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện 34.3% đột biến KRAS, phù hợp với các nước Châu Á (20-66%), và thấp hơn báo cáo của dữ liệu TCGA (42%) [1], [2]. Trước đây, rất ít công bố về thay đổi NRAS, tần suất dao động 2-10%, tương đồng với kết quả của nghiên cứu

là 7.2% [1], [7]. Tương tự đột biến KRAS, không có mối liên hệ có ý nghĩa giữa đột biến NRAS với một số đặc điểm bệnh học lâm sàng của bệnh nhân UTĐTT. Sự sai khác giữa các nghiên cứu có thể do yếu tố địa lý, chủng tộc, cỡ mẫu, phương pháp phân tích đột biến. Trên thế giới, tỷ lệ đột biến BRAF thay đổi từ 1.1-25% [1], [2], [6], [7]. Kết quả cho thấy 6.4% bệnh nhân mang biến đổi BRAF, cao hơn các dân tộc Châu Á (1.1-5.8%). Tần suất đột biến BRAF có sự khác biệt theo nhóm tuổi, cao hơn đáng kể ở bệnh nhân lớn tuổi ($p=0.023$), tương tự với công bố Tie J và cs. (2015) chỉ ra thay đổi BRAF V600E tăng từ 10% ở nhóm bệnh nhân ngẫu nhiên lên 37% ở nhóm trên 70 tuổi [8]. PIK3CA thuộc họ PI3K thường xuyên bị đột biến trong ung thư. Đột biến PIK3CA trong nghiên cứu đạt 17.5%, phù hợp với báo cáo trên UTĐTT là 2-18% [1], [2], [6]. Đặc biệt, đột biến PIK3CA có khác biệt có ý nghĩa với giới tính và độ biệt hóa khối u ($p<0.05$). Ziv E và cs. (2017) chỉ ra rằng sau khi xạ trị, các trường hợp mang biến đổi PIK3CA hoặc AKT tiến triển bệnh kém hơn so với kiểu dại (55% so với 92%) [10]. Điều này gợi ý rằng đột biến kích hoạt con đường tín hiệu PI3K, chẳng hạn như PIK3CA là nhân tố tiềm năng ảnh hưởng tới hiệu quả xạ trị ở bệnh nhân UTĐTT.

Nghiên cứu của chúng tôi khẳng định đột biến KRAS loại trừ BRAF và NRAS, cho thấy mỗi biến đổi di truyền có vai trò khác nhau trong phát sinh UTĐTT. Kết quả này có thể được giải thích do sự không đồng nhất hệ gen khối u, chỉ cần 1 loại đột biến thuộc con đường MAPK đều có thể làm dừng chu kỳ tế bào [3]. Một số thay đổi di truyền có thể

cùng tồn tại hoặc độc lập, chẳng hạn như sự cùng tồn tại của đột biến KRAS và APC trong UTĐTT [1], [2], [6], [7]. Trong khi đó, đột biến BRAF và APC hiếm khi xuất hiện đồng thời. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy mối tương thuận giữa đột biến PIK3CA và KRAS, tương tự như các báo trước đây. Chẳng hạn, Li HT và cs. (2011) chỉ ra rằng đồng đột biến KRAS/PIK3CA phổ biến ở bệnh nhân UTĐTT giai đoạn IV hơn giai đoạn sớm. Điều này có thể là do tác động cộng gộp của các đột biến dẫn đến kích hoạt đường truyền tín hiệu PI3K-AKT, dẫn đến di căn [5]. Một khi biến đổi PIK3CA/KRAS cùng xảy ra ở giai đoạn sớm, bệnh nhân sẽ có tiên lượng xấu như di căn xa, đáp ứng điều trị kém [9]. Bệnh nhân mang đột biến PIK3CA thường ít nhạy cảm với liệu pháp kháng EGFR. Do đó, ngoài đột biến RAS/RAF, biến đổi các gen tham gia vào con đường PI3K, nổi bật là PIK3CA cũng được coi là dấu ấn tiên lượng âm tính đối với UTĐTT tiến triển khi sử dụng liệu pháp kháng thể đơn dòng.

V. KẾT LUẬN

Tần suất đột biến KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA ở bệnh nhân UTĐTT Việt Nam lần lượt là 34.3%, 6.4%, 7.2% và 17.5%. Đột biến KRAS loại trừ với đột biến NRAS và BRAF. Đột biến BRAF thường xảy ra ở bệnh nhân lớn tuổi. Có khác biệt đáng kể giữa đột biến PIK3CA với độ tuổi và mức độ biệt hóa. Ngoài ra, đột biến PIK3CA có xu hướng xảy ra đồng thời với đột biến KRAS nhưng không tồn tại cùng đột biến NRAS và BRAF. Nghiên cứu này cung cấp đặc điểm phân tử khối u giúp điều trị theo hướng cá thể hóa,

đồng thời là dấu hiệu tiên lượng và dự báo trong quá trình quản lý UTĐTT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bando H, Yoshino T, Shinozaki E, et al. (2013)**, Simultaneous identification of 36 mutations in KRAS codons 61 and 146, BRAF, NRAS, and PIK3CA in a single reaction by multiplex assay kit, *BMC Cancer*, 13, 405.
2. **Bisht S, Ahmad F, Sawaimoon S, et al. (2014)**, Molecular spectrum of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutation: determination of frequency, distribution pattern in Indian colorectal carcinoma, *Med Oncol*, 31, 124.
3. **De Roock W, Claes B, Bernasconi D, 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, 753–62.
4. **Deng Y (2017)**, Rectal Cancer in Asian vs. Western Countries: Why the Variation in Incidence? Current treatment options in oncology, 18, e64.
5. **Li H-T, Lu Y-Y, An Y-X, et al. (2011)**, KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in human colorectal cancer: relationship with metastatic colorectal cancer, *Oncol Rep*, 25, 1691–7.
6. **Mao C, Zhou J, Yang Z, et al. (2012)**, KRAS, BRAF and PIK3CA mutations and the loss of PTEN expression in Chinese patients with colorectal cancer, *PLoS One*, 7, e36653.
7. **Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, et al. (2014)**, The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis, *Acta Oncol*, 53, 852–64.
8. **Tie J, Desai J (2015)**, Targeting BRAF mutant metastatic colorectal cancer: clinical implications and emerging therapeutic strategies, *Target Oncol*, 10, 179–88.
9. **Velho S, Moutinho C, Cirnes L, et al. (2008)**, BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer*, 8, 255.
10. **Ziv E, Bergen M, Yarmohammadi H, et al. (2017)**, PI3K pathway mutations are associated with longer time to local progression after radioembolization of colorectal liver metastases, *Oncotarget*, 8, 23529–38.