

# XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN TRÊN EXON 8, 10 CỦA GEN CDH1 Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ DẠ DÀY LAN TỎA DI TRUYỀN

Hán Minh Thủy<sup>1</sup>, Phạm Thiện Ngọc<sup>1</sup>, Đặng Thị Ngọc Dung<sup>1</sup>

## TÓM TẮT:

**Đặt vấn đề:** Ung thư dạ dày (UTDD) là căn bệnh ác tính đứng hàng thứ năm và là nguyên nhân thứ ba gây tử vong do ung thư trên toàn thế giới. Ung thư dạ dày thể lan tỏa theo Lauren được đặc trưng bởi tuổi khởi phát sớm, sự biệt hóa kém, tiến triển bệnh nhanh, tỉ lệ di căn cao. Gen *CDH1* mã hóa protein E-cadherin, được coi là một gen ức chế khối u liên quan đến sự khởi đầu và tiến triển của UTDD thể lan tỏa và UTDD lan tỏa di truyền (HDGC). Đột biến soma gen *CDH1* cũng là 1 trong các cơ chế phân tử thứ 2 làm bất hoạt alen của của gen *CDH1*. Vùng hay gặp đột biến nằm từ exon 7 đến exon 10. **Mục tiêu:** Xác định đột biến trên exon 8, 10 của gen *CDH1* ở bệnh nhân ung thư dạ dày lan tỏa di truyền. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 42 bệnh nhân đáp ứng tiêu chuẩn của Hiệp hội Liên kết ung thư dạ dày về UTDD lan tỏa di truyền tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, Viện K-cơ sở Tân Triều, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, từ tháng 8/2018 đến tháng 8/2020 được lấy mẫu mô ung thư và giải trình tự tìm đột biến gen. **Kết quả:** Phát hiện được 2 đột biến sai nghĩa chiếm 4,76% trong tổng số 42 bệnh nhân nghiên cứu bao gồm 1 đột biến mới 1039G > A, thay thế acid amin Alanin thành Threonin và 1 đột biến đã công bố 1018A > G biến đổi Threonin thành Alanin. Không phát hiện đột biến nào trên exon 10. **Kết luận:** Cần tiến hành nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn kết hợp phân tích invitro và nhuộm hóa mô miễn dịch gen *CDH1*.

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

## SUMMARY:

### DETERMINATION OF GENETIC MUTATION EXON 8, 10 OF CDH1 GENE IN PATIENS WITH HEREDIATARY DIFFUSE GASTRIC CANCER

**Background:** Gastric cancer (GC) as the fifth leading cancer and third most common cause of cancer-

related deaths worldwide. Lauren's diffuse gastric cancer is characterized by early onset, poor differentiation, rapid disease progression, and high metastasis rate. The *CDH1* gene encodes the E-cadherin protein, which is considered a tumor suppressor gene involved in the initiation and progression of diffuse gastric cancer and hereditary diffuse gastric cancer (HDGC). Somatic mutations of *CDH1* gene is also one of the second molecular mechanisms inactivating alleles of the *CDH1* gene. Common mutation area is from exon 7 to exon 10. **Objective:** Identify mutations on exon 8, 10 of *CDH1* gene in hereditary diffuse gastric cancer patients. **Subjects and methods:** Cross-sectional descriptive study on 42 patients that met the standards of The International Gastric Linkage Consortium for hereditary diffuse gastric cancer at K hospital, Hanoi Medical University hospital and Viet Duc hospital, from August 2018 to August 2020 was allowed to take cancer tissue samples and sequence to find genetic mutations. **Results:** Detected 2 missense mutations accounting for 4.76% of 42 patients studied, including 1 new mutation 1039G > A, replacing amino acid Alanin to Threonin and 1 published mutation 1018A > G transforms Threonin into Alanin. No mutation were detected on exon 10. **Conclusion:** It is necessary to conduct research with larger sample size combining in vitro analysis and *CDH1* gene immunohistochemical staining

**Keywords:** Hereditary diffuse gastric cancer, mutation, *CDH1*, E-cadherin.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư dạ dày (UTDD) là căn bệnh ác tính đứng hàng thứ năm và là nguyên nhân thứ ba gây tử vong do ung thư trên toàn thế giới<sup>1</sup>. UTDD không đồng nhất về hình thái trong đó ung thư biểu mô tuyến chiếm gần 90% các trường hợp. Dựa trên phân loại của Lauren, ung thư biểu mô tuyến gồm 2 phân nhóm chính là UTDD thể ruột

1. Bộ môn Hóa Sinh - Trường Đại học Y Hà Nội

Tác giả chính Hán Minh Thủy, Email: hanminhthuy@gmail.com

» Ngày nhận bài: 24/09/2020 | » Ngày phản biện: 01/10/2020 | » Ngày duyệt đăng: 10/10/2020

(IGC) chiếm 60% các trường hợp và UTDD thể lan tảo (DGC) chiếm khoảng 30%. Trong đó, DGC được đặc trưng bởi tuổi khởi phát sớm, sự biệt hóa kém, tiến triển bệnh nhanh, tỉ lệ di căn cao do mất khả năng kết dính giữa các tế bào<sup>2</sup>. Vì vậy, tiên lượng UTDD thể lan tảo hiện nay vẫn còn xấu, đặc biệt ở những bệnh nhân UTDD lan tảo tiến triển. Các nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng đột biến gen *CDHI* là một yếu tố tiên lượng xấu trong UTDD thể lan tảo<sup>3</sup>.

Gen *CDHI* nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 16 mã hóa protein E-cadherin, được coi là một gen ức chế khối u liên quan đến sự khởi đầu và tiến triển của UTDD thể lan tảo và UTDD lan tảo di truyền (HDGC)<sup>4</sup>. UTDD lan tảo di truyền là hội chứng gây nên bởi đột biến gen trội, tuy nhiên không phải cá nhân nào mang gen bệnh cũng tiến triển thành ung thư, điều này còn phụ thuộc vào tính thấm của gen và tương tác của kiểu gen với môi trường. Dựa trên mô hình của Knudson, ung thư sẽ phát triển khi có thêm 1 cơ chế thứ 2 làm bất hoạt cả 2 alen của gen *CDHI*. Đột biến soma gen *CDHI* cũng là 1 trong các cơ chế phân tử thứ 2 như vậy<sup>5</sup>. Một số tác giả thấy rằng vùng đột biến thường xuất hiện nằm từ exon 7 đến exon 10<sup>6</sup>. Hiện tại, nghiên cứu về đột biến gen *CDHI* ở trong nước còn hạn chế. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu nhằm: “**Xác định đột biến trên exon 8, 10 của gen *CDHI* ở bệnh nhân ung thư dạ dày lan tảo di truyền**”.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng

- **Tiêu chuẩn lựa chọn:** Chọn 42 bệnh nhân nghiên cứu có các đặc điểm sau:

+ Bệnh nhân ung thư dạ dày lan tảo di truyền thỏa mãn ít nhất 1 trong số các tiêu chuẩn của Hiệp hội Liên kết ung thư dạ dày quốc tế (IGCLC - 2015)<sup>7</sup>.

+ Bệnh nhân được chẩn đoán xác định ung thư dạ dày nguyên phát có kết quả mô bệnh học là thể lan tảo theo phân loại của Lauren (1965) tương ứng với phân loại của WHO (2010) đến khám và điều trị tại Bệnh viện K Trung ương – Cơ sở Tân Triều, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, Bệnh viện Hữu Nghị Việt Đức được đưa vào nghiên cứu từ tháng 8/2018 đến tháng 8/2020.

- **Tiêu chuẩn loại trừ:** Các bệnh nhân ung thư dạ dày không lan tảo, kèm theo ung thư khác và người không tình nguyện tham gia nghiên cứu.

## 2. Phương pháp

### 2.1. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: Theo phương pháp mô tả cắt ngang.

- Chọn mẫu nghiên cứu theo phương pháp chọn mẫu thuận tiện.

- Địa điểm nghiên cứu: Phòng sinh học phân tử, Trung tâm Kiểm chuẩn chất lượng xét nghiệm – Trường Đại học Y Hà Nội.

- Quy trình tiến hành nghiên cứu:

+ Lựa chọn bệnh nhân phù hợp.

+ Lấy mẫu mô ung thư dạ dày đúc trong khối paraffin của bệnh nhân, xác định vùng tập trung tế bào ung thư (tại khoa Giải phẫu bệnh).

+ Tách chiết DNA từ mẫu mô ung thư, tiến hành giải trình tự gen tìm đột biến.

+ Tính toán tỉ lệ đột biến gen.

### 2.2. Phương pháp phân tích

\* Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số: Các mẫu DNA được tách chiết từ mô đúc paraffin theo phương pháp tách cột GeneAll® Exgene™ FFPE Tissue DNA kit theo quy trình của nhà sản xuất. Nồng độ và độ tinh sạch DNA được kiểm tra nhờ phương pháp quang phổ (OD 260/280).

\* Kỹ thuật PCR: - Phản ứng PCR được sử dụng để khuếch đại exon 8 và exon 10 của gen *CDHI* với 2 cặp mồi tự thiết kế.

**Bảng 1. Trình tự mồi khuếch đại exon 8, 10 của gen *CDHI***

Exon	Mồi	Trình tự	Kích thước (bp)
8	Mồi xuôi	5'- GTGGCTAGTGTTCCTGGTCC -3'	264
	Mồi ngược	5'- GACTTCGCCCATGAGCAGTG -3'	
10	Mồi xuôi	5'- TCTGCTCTCTAGGGCTTGGA -3'	290
	Mồi ngược	5'- GCTGCAAGTCAGTTGAAAAATCCT -3'	

- Thành phần phản ứng PCR (thể tích 25 µl) gồm: Gotaq G2 Hotstar Master mix 12,5 µl; mỗi xuôi 0,5 µl; mỗi ngược 0,5 µl; DNA 1,0 µl; nước không có nuclease 10,5 µl.

- Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với exon 8 và 10: 95°C/5 phút, 35 chu kỳ [95°C/30 giây, 57°C/1 phút, 72°C/30 giây], 72°C/5 phút. Bảo quản mẫu ở 4°C.

- Điện di sản phẩm PCR trên máy điện di Consort EV243 trong gel 1.5% đánh giá đoạn gen được khuếch đại có đúng kích thước.

\* Kỹ thuật phân tích kết quả: Giải trình tự gen trực tiếp: Sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự trên máy ABI sequencer 3500. Kết quả thu được sau giải trình tự được thu thập và xử lý bằng phần mềm Sequence Scanner 2 và ApE-A plasmid Editor 2.0.3. Trình tự được so sánh với gen gốc trên GeneBank để phát hiện đột biến DNA

(NG\_008021).

**3. Đạo đức nghiên cứu:** Các đối tượng tham gia hoàn toàn tự nguyện và có quyền rút khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia nghiên cứu. Các thông tin liên quan đến bệnh nhân được đảm bảo bí mật. Nghiên cứu này đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y Sinh học cấp cơ sở của Trường Đại học Y Hà Nội thông qua, Giấy chứng nhận số 198/HĐĐĐDHYN cấp ngày 21 tháng 09 năm 2016.

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Nghiên cứu của chúng tôi tiến hành trên 42 bệnh nhân thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn có tuổi trung bình là 35,14 ± 5,14, số lượng bệnh nhân nữ nhiều hơn nam.

**Bảng 2. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu**

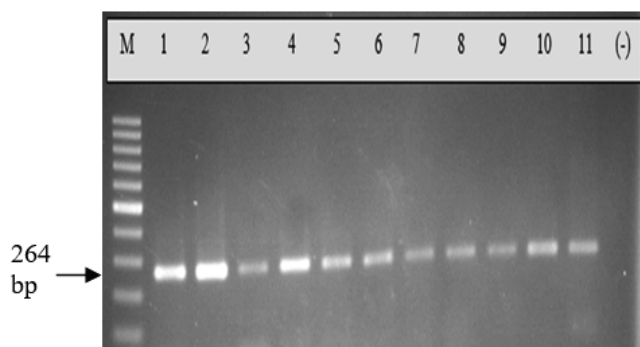
Đặc điểm		N	%
Giới	Nam	20	47,62
	Nữ	22	52,38
Tuổi trung bình			35,14 ± 5,14

#### 2. Kết quả khuếch đại exon 8 và 10 gen CDH1

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho exon 8 và exon 10 gen CDH1 để khuếch đại DNA sau tách chiết từ mẫu mô của

bệnh nhân. Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR thu được chỉ có 1 băng đặc hiệu, kích thước đúng, không có sản phẩm phụ, đủ điều kiện để tiến hành giải trình tự.

**Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi exon 8 (264 bp)**

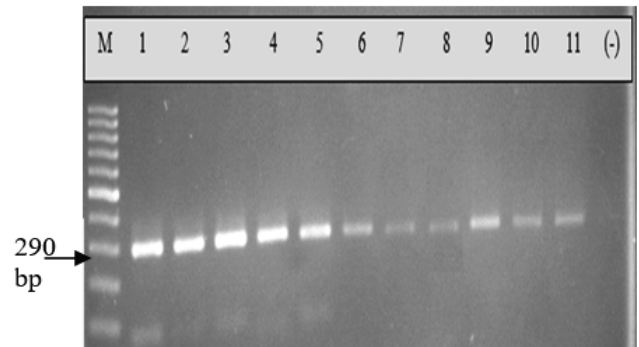


M: marker; (-) chứng âm; (+): chứng dương, 1 - 11: mẫu bệnh nhân.

#### 3. Kết quả xác định đột biến gen

Sản phẩm PCR được giải trình tự gen để phát

**Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi exon 10 (290 bp)**



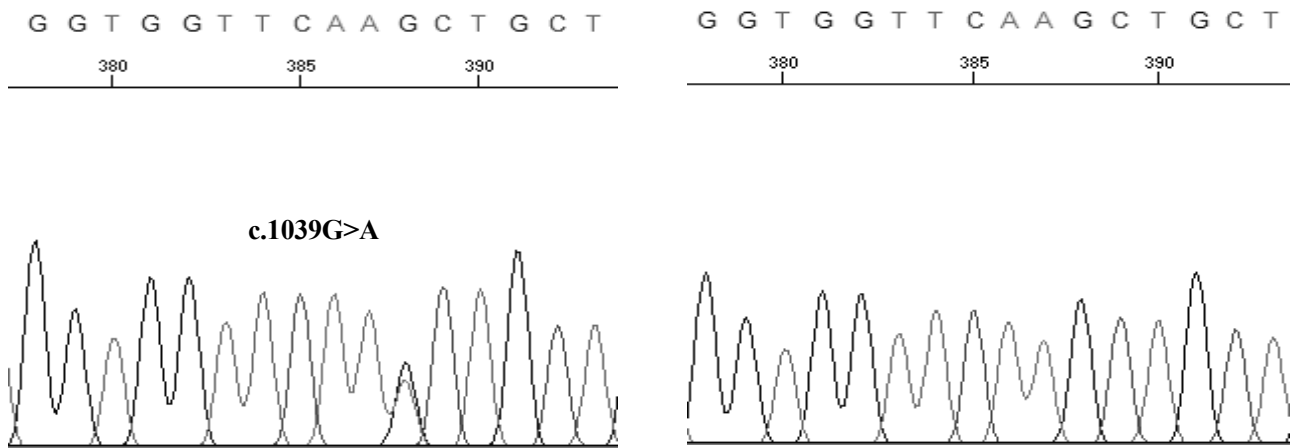
hiện đột biến. Kết quả cho thấy đã phát hiện được 2/42 bệnh nhân có đột biến điểm (4,76%). Cả 2 đột biến đều nằm trên exon 8, không phát hiện đột biến nào trên exon 10.

**Bảng 3. Kết quả đột biến exon 8 của bệnh nhân**

Mã BN	Giới	Nucleotide thay đổi	Thay đổi Acid amin	Tài liệu công bố
7102	Nữ	1039G > A	Alanin → Threonin (A347T)	Chưa được công bố
62630	Nam	1018A > G	Threonin → Alanin (T340A)	Oliveira (2002) <sup>8</sup>

Cả hai đột biến đều là đột biến sai nghĩa (missense mutation) gây ra thay thế acid amin trên phân tử protein.

**Hình 3. Hình ảnh giải trình tự exon 8 bệnh nhân 7102**



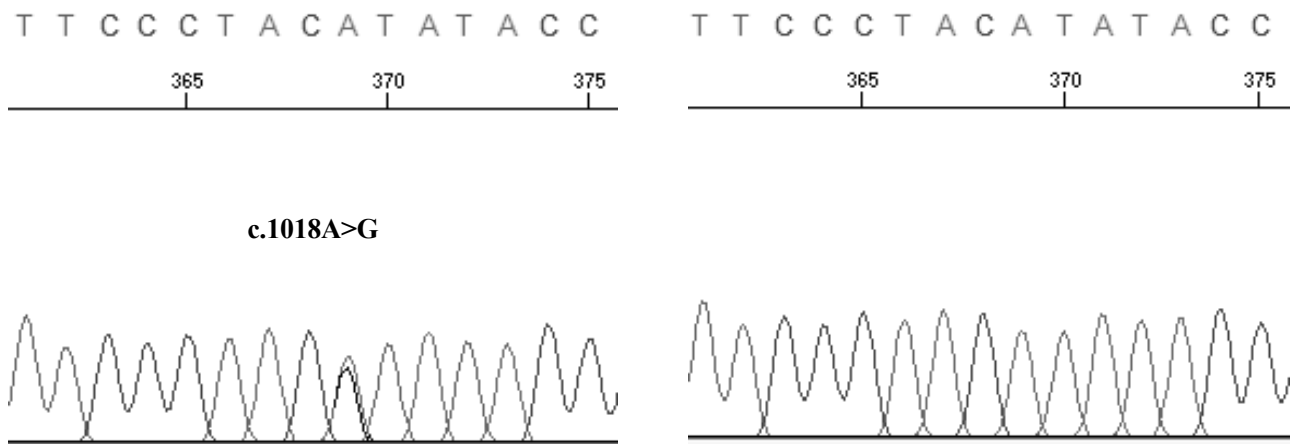
Kết quả giải trình tự bệnh nhân mang đột biến

Trình tự gen của người không đột biến

Kết quả giải trình tự cho thấy bệnh nhân 7102 tại vị trí 1039 trên phân tử mRNA của gen *CDHI* tương ứng với nucleotid G ở người bình thường đã được thay thế

bằng nucleotid A dẫn đến bộ ba thứ 347 mã hóa acid amin Alanin thành Threonin. Đây là đột biến mới chưa được tài liệu nào công bố trước đây.

**Hình 4. Hình ảnh giải trình tự exon 8 bệnh nhân 62630**



Kết quả giải trình tự bệnh nhân mang đột biến

Trình tự gen của người không đột biến

Kết quả giải trình tự phát hiện bệnh nhân mã số 62630 có đột biến nucleotide A ở vị trí 1018 thành G thay

đổi acid amin thứ 340 Threonin thành Alanin và là đột biến đã biết.



#### IV. BÀN LUẬN:

UTDD lan tỏa di truyền (HDGC) là hội chứng di truyền hiếm gặp, gây nên bởi đột biến gen trội trên NST thường, tồn tại ở dạng dị hợp tử. Tuổi khởi phát bệnh dao động trong phạm vi từ 14 đến 69 tuổi, trung bình là 38 tuổi<sup>9</sup>. Nghiên cứu 42 bệnh nhân của chúng tôi có tuổi trung bình khởi phát bệnh là 35,14. Kết quả này thấp hơn độ tuổi 39 trong nghiên cứu của tác giả Guindalini trên quần thể người Brazil<sup>10</sup>. Tỷ lệ bệnh nhân nữ là 52,38% cao hơn nghiên cứu của tác giả Lee JY (2017)<sup>11</sup>. Mặt khác, tỷ lệ nam: nữ theo nghiên cứu của chúng tôi xấp xỉ 1:1 tương tự với nghiên cứu của tác giả này.

Các nghiên cứu về đột biến gen *CDHI* đều cho thấy UTDD thể lan tỏa có tỉ lệ xuất hiện các đột biến trên thường xuyên hơn các thể UTDD còn lại theo phân loại của Lauren. Tần số đột biến soma gen *CDHI* có thể thay đổi từ 3 đến 50% ở những người mắc UTDD thể lan tỏa. Cho tới nay có hơn 160 đột biến gen *CDHI* đã được công bố, trong số đó, cũng ghi nhận loại đột biến hay gặp nhất là đột biến điểm bao gồm thêm hoặc xóa nucleotide (38%), đột biến vô nghĩa (17%), đột biến sai nghĩa (16%), ngoài ra là các đột biến tại vị trí ghép nối (21%), còn đột biến xóa exon lớn chỉ chiếm 9%<sup>12</sup>. Một số tác giả thấy rằng vùng mã hóa cho miền ngoại bào, nơi đảm nhận chức năng liên kết canxi là vùng đột biến thường xuất hiện trên gen, nằm từ exon 7 đến exon 10<sup>6</sup>. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn xác định đột biến trên exon 8 và exon 10 của gen *CDHI*. Kết quả ở 42 bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi có 2 bệnh nhân có đột biến ở exon 8, thuộc loại đột biến sai nghĩa không làm thay đổi kích thước phân tử protein. Mặc dù vậy, đã có nhiều bằng chứng cho rằng đột biến sai nghĩa liên quan đến hình thái và sự vận động của tế bào, góp phần tạo thuận lợi cho sự phát triển và di căn của tế bào ung thư<sup>13</sup>. Trong 2 đột biến phát hiện được, có một đột biến mới chưa được công bố trước đây và một đột biến đã được xác nhận ở người mắc ung thư dạ dày lan tỏa di truyền.

Đột biến thay thế nucleotid G ở vị trí 1039 trên phân tử mRNA bằng nucleotid A dẫn đến bộ ba thứ 347 mã hóa acid amin Alanin biến đổi thành Threonin trong nghiên cứu của chúng tôi chưa được công bố và sự liên quan đến ung thư dạ dày lan tỏa còn chưa rõ. Tuy nhiên, các đột biến ở điểm nối EC1-2 và EC2-3 được biết đến như là nguyên nhân gây ra hiện tượng mã hóa cadherin không đúng cách và làm giảm độ kết dính của tế bào, exon 7 đến 9 là các exon chính cấu trúc nên miền ngoại bào EC1-2 của phân tử protein. Do đó, đột biến xảy ra ở vùng này có

thể dẫn đến tương tác bất thường giữa các miền cadherin<sup>14</sup>. Hơn nữa, việc thay thế acid amin kỵ nước không phân cực Alanin thành Threonin là acid amin có chuỗi bên phân cực có thể làm thay đổi bề mặt tiếp xúc của phân tử protein dẫn tới ảnh hưởng đến cấu trúc cuộn xoắn bậc cao cũng như tính toàn vẹn trong chức năng của E-cadherin. Đột biến thứ hai trong nghiên cứu chúng tôi xác định được là một đột biến đã công bố trên tạp chí Human Mutation năm 2002 của Oliveira khi nghiên cứu 11 gia đình phù hợp tiêu chuẩn của Hiệp hội Liên kết ung thư dạ dày quốc tế về UTDD lan tỏa di truyền ở châu Âu. Tác giả đã phát hiện 4/11 gia đình mang đột biến gen *CDHI*, trong các đột biến tìm thấy ở những người mắc ung thư dạ dày này, có đột biến di hợp tử thay thế nucleotide A thành G ở vị trí 1018 biến đổi acid amin ở thứ 340 Threonin thành Alanin<sup>8</sup>. Bên cạnh đó, tác giả cũng phân tích mô hình tương tác giữa các acid amin lân cận vùng thay đổi, nhận thấy sự biến đổi acid amin sẽ làm giảm số lượng liên kết hydro trong cấu tạo phân tử của protein, điều này có thể đóng vai trò trong việc giảm tính ổn định hoạt động của E-cadherin.

Tỷ lệ đột biến chung trong nghiên cứu của chúng tôi là 4,76% tương tự tác giả Corso (2013) xác định đột biến từ exon 7 đến exon 10 là 4,5%<sup>15</sup>. Tỷ lệ đột biến trong nghiên cứu này thấp hơn so với báo cáo của các tác giả khác trên thế giới như Chen (2015) là 7,1%, Lee (2014) là 35,7%; Choi (2018) là 23%<sup>3,6,16</sup>. Có sự khác biệt như trên là do cỡ mẫu nghiên cứu của chúng tôi chỉ bao gồm 42 bệnh nhân và xác định đột biến xảy ra trên 2 trong số 16 exon của gen, sử dụng phương pháp nghiên cứu khác nhau và có thể là do nghiên cứu được tiến hành trên nhiều quốc gia khác nhau có tỉ lệ mắc ung thư dạ dày thay đổi giữa các quần thể người. Vì vậy, chúng tôi cần có những nghiên cứu sâu hơn, cỡ mẫu lớn hơn, chứng minh ý nghĩa của đột biến sai nghĩa này trên invitro và có thể kết hợp với nhuộm hóa mô miễn dịch nhằm biết được mức độ biểu hiện của protein E-cadherin.

#### V. KẾT LUẬN:

Nghiên cứu đã phát hiện được 2/42 (4,76%) bệnh nhân ung thư dạ dày lan tỏa di truyền có đột biến gen *CDHI* trên exon 8, cả 2 đều là đột biến sai nghĩa. Trong đó có đột biến mới thay thế 1039G > A làm biến đổi acid amin Alanin thành Threonin chưa được công bố trước đây và một đột biến đã được xác nhận ở người mắc ung thư dạ dày lan tỏa di truyền là đột biến thay thế 1018A > G làm Threonin bị biến đổi thành Alanin. Không phát hiện được đột biến nào trên exon 10 của gen *CDHI*.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Balakrishnan M, George R, Sharma A, Graham DY. Changing trends in stomach cancer throughout the World. *Curr Gastroenterol Rep*. 2017;19(8):36.
2. Ansari S, Gantuya B, Tuan VP, Yamaoka Y. Diffuse Gastric Cancer: A Summary of analogous contributing factors for its molecular pathogenicity. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8).
3. Chen K, Yang D, Li X, et al. Mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Chinese: Implications for prognosis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(4):1107-1112.
4. Li B, He Z. Recent progress in genetic and epigenetic profile of diffuse gastric cancer. *Cancer transl med*. 2015;1(3):80.
5. Kagohara LT, Stein-O'Brien GL, Kelley D, et al. Epigenetic regulation of gene expression in cancer: techniques, resources and analysis. *Brief Funct Genomics*. 2018;17(1):49-63.
6. Lee Y-S, Cho YS, Lee GK, et al. Genomic profile analysis of diffuse-type gastric cancers. *Genome Biol*. 2014;15(4):R55.
7. Post RS van der, Vogelaar IP, Carneiro F, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet*. 2015;52(6):361-374.
8. Oliveira C, Bordin MC, Grehan N, et al. Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary diffuse gastric cancer kindred. *Hum Mutat*. 2002;19(5):510-517.
9. Kaurah P, Huntsman DG. Hereditary diffuse gastric cancer. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle; 1993.
10. Guindalini RSC, Cormedi MCV, Maistro S, et al. Frequency of CDH1 germline variants and contribution of dietary habits in early age onset gastric cancer patients in Brazil. *Gastric Cancer*. 2019;22(5):920-931.
11. Lee JY, Gong EJ, Chung EJ, et al. The Characteristics and prognosis of diffuse-type early gastric cancer diagnosed during Health Check-Ups. *Gut Liver*. 2017;11(6):807-812.
12. Figueiredo J, Melo S, Carneiro P, et al. Clinical spectrum and pleiotropic nature of CDH1 germline mutations. *J Med Genet*. 2019;56(4):199-208.
13. Suriano G, Oliveira MJ, Huntsman D, et al. E-cadherin germline missense mutations and cell phenotype: evidence for the independence of cell invasion on the motile capabilities of the cells. *Hum Mol Genet*. 2003;12(22):3007-3016.
14. Lee Y-S, Cho YS, Lee GK, et al. Genomic profile analysis of diffuse-type gastric cancers. *Genome Biol*. 2014;15(4):R55.
15. Corso G, Carvalho J, Marrelli D, et al. Somatic mutations and deletions of the E-cadherin gene predict poor survival of patients with gastric cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013;31(7):868-875.
16. Choi J-H, Kim Y-B, Ahn JM, et al. Identification of genomic aberrations associated with lymph node metastasis in diffuse-type gastric cancer. *Exp Mol Med*. 2018;50(4):1-11.

