

# TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH GIẢI TRÌNH TỰ VÙNG PROMOTOR GEN *MMP-9 (rs3918242)* TRÊN MẪU MÔ VÙNG NÉN CỦA BỆNH NHÂN CARCINÔM DẠ DÀY LOẠI TẾ BÀO KÉM KẾT DÍNH

Lưu Thị Thu Thảo<sup>1</sup>, Võ Thị Ngọc Diễm<sup>1</sup>, Hoàng Hạnh Dung<sup>1</sup>,  
Trương Đình Kiều Diễm<sup>2</sup>, Nguyễn Huỳnh Minh Quân<sup>2</sup>, Trịnh Hoàng Kim Tú<sup>2,✉</sup>

## TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính có tiên lượng xấu và liên quan đến biểu hiện của matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), trong đó đa hình đơn nucleotide (single nucleotide polymorphism, SNP) rs3918242 trên vùng promoter của gen *MMP-9* đã được ghi nhận liên quan đến nguy cơ tiến triển bệnh. Tuy nhiên, việc phân tích SNP này trên mẫu mô vùng nén (formalin-fixed paraffin-embedded block, FFPE) còn gặp nhiều khó khăn do chất lượng DNA bị ảnh hưởng bởi quá trình cố định và lưu trữ. Nghiên cứu này nhằm tối ưu hóa quy trình giải trình tự Sanger vùng promoter của gen *MMP-9* trên mẫu FFPE của bệnh nhân carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính bằng kỹ thuật touchdown PCR (TD-PCR). **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu thực nghiệm mô tả so sánh hiệu quả giữa kỹ thuật PCR và TD-PCR trên 21 mẫu FFPE được chẩn đoán carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính tại Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM từ 01/2022 đến 06/2023. Vùng promoter của gen *MMP-9* rs3918242 của tất cả các mẫu được khuếch đại bằng 2 phương pháp: PCR và TD-PCR; các mẫu khuếch đại thành công được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. **Kết quả:** Nghiên cứu gồm 21 mẫu mô FFPE của bệnh nhân được chẩn đoán carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính, với đa số bệnh nhân  $\geq 50$  tuổi (76%), tỷ lệ nam và nữ tương đương (52% và 48%), khối u thường khu trú ở hang vị (38%), bờ cong nhỏ và thân vị (33% và 24%). Các mẫu FFPE được thu nhận chủ yếu từ các tổn thương có đại thể dạng loét (67%) và u ở giai đoạn xâm nhập sâu (pT4 chiếm 52%). Kỹ thuật TD-PCR có hiệu quả khuếch đại tốt hơn so với PCR thông thường. Ở tất cả các mức nhiệt độ bắt cặp khảo sát (56°C, 58°C, 60°C và 62°C), TD-PCR khuếch đại thành công 100% số mẫu (21/21), trong khi PCR chỉ đạt từ 4/21 đến 12/21 mẫu (19,05-57,14%). Giải trình tự Sanger các sản phẩm từ TD-PCR cho tín hiệu sóng rõ, và kết quả kiểu gen tương đương khi thực hiện khuếch đại bằng PCR thông thường. **Kết luận:** TD-PCR là kỹ thuật hiệu quả để khuếch đại trình tự promoter trên vùng gen *MMP-9* rs3918242 từ mẫu mô FFPE ở bệnh nhân carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính. **Từ khóa:** carcinôm dạ dày kém kết dính, *MMP-9*, promoter, touchdown PCR.

## SUMMARY

### OPTIMIZATION OF A SEQUENCING PROTOCOL FOR THE *MMP-9* PROMOTER POLYMORPHISM rs3918242 IN FFPE TISSUE SAMPLES OF POORLY COHESIVE GASTRIC CARCINOMA PATIENTS

**Introduction:** Poorly cohesive carcinoma (PCC) of the stomach carries a poor prognosis and is associated with the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), in which single-nucleotide polymorphism (SNP) rs3918242 located in the promoter region of the *MMP-9* gene has been reported to correlate with the risk of disease progression. However, analyzing this SNP in formalin-fixed paraffin-embedded block (FFPE) samples remains challenging due to DNA degradation caused by fixation and long-term storage. This study aims to optimize the Sanger sequencing workflow for the *MMP-9* promoter region derived from FFPE specimens of patients with poorly cohesive gastric carcinoma by touchdown PCR (TD-PCR). **Subject and Method:** An experimental descriptive study was conducted to compare the performance of conventional PCR and touchdown PCR on 21 FFPE specimens diagnosed as poorly cohesive gastric carcinoma at the Department of Pathology, University Medical Center Ho Chi Minh City, from January 2022 to September 2023. **Results:** The study included 21 FFPE tissue samples from patients diagnosed with poorly cohesive gastric carcinoma, with the majority of patients aged  $\geq 50$  years (76%), with an equal male-to-female ratio (52% and 48%), and tumors typically localized in the antrum (38%), lesser curvature, and body of the stomach (33% and 24%). FFPE samples were primarily obtained from lesions with macroscopic ulceration (67%) and tumors at the deeply invasive stage (pT4, accounting for 52%). The TD-PCR technique has superior amplification efficiency compared to conventional PCR. At all the investigated pairing temperatures (56°C, 58°C, 60°C, and 62°C), TD-PCR successfully amplified 100% of the samples (21/21), whereas conventional PCR only amplified 4 to 12 samples (33.33%). Sanger sequencing of TD-PCR products yielded clear signals and well-defined electropherogram peaks, with genotyping results comparable to those obtained using conventional PCR amplification. **Conclusion:** TD-PCR is an effective technique to amplify promoter sequences in the *MMP-9* rs3918242 gene region from FFPE tissue samples of patients with poorly cohesive gastric carcinoma. **Keywords:** poorly cohesive carcinoma (PCC), *MMP-9*, promoter, touchdown PCR.

<sup>1</sup>Bộ môn Mô Phôi - Giải Phẫu Bệnh, Trường Y, Đại học Y Dược TP.HCM

<sup>2</sup>Trung tâm Y sinh học phân tử, Đại học Y Dược TP.HCM

Chịu trách nhiệm chính: Trịnh Hoàng Kim Tú

Email: kim.tu.vn@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 16.1.2026

Ngày phản biện khoa học: 6.2.2026

Ngày duyệt bài: 13.3.2026

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư dạ dày (UTDD) là một trong những bệnh ác tính phổ biến nhất trên toàn thế giới. Theo bảng phân loại của Tổ chức Y Tế Thế giới năm 2019, trong UTDD, carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính là phân nhóm có tiên lượng xấu nhất chiếm 30-35% tổng số ca UTDD.<sup>1</sup> Quá trình tiến triển của các khối u tân sinh là một quá trình phức tạp, theo nhiều cơ chế khác nhau, trong đó sự tương tác lẫn nhau giữa tế bào u và môi trường quanh u là rất quan trọng. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy các protease ngoại bào, đặc biệt là nhóm metalloprotenase (MMP), không chỉ đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của khối u mà còn tham gia tái cấu trúc chất nền ngoại bào trong vi môi trường quanh u. Trong đó, MMP-9 hiện diện nhiều nhất ở các khối u ác tính, có mối tương quan giữa MMP-9 với tiên lượng xấu ở bệnh nhân ung thư thực quản, dạ dày.<sup>2</sup> Đa hình đơn nucleotide (SNP) *rs3918242* trên vùng promoter của gen MMP-9 đã được ghi nhận có liên quan đến nguy cơ tiến triển của UTDD trên mẫu máu ngoại vi.<sup>3</sup>

Tuy nhiên, dữ liệu về SNP *rs3918242* trên mô bệnh học vẫn còn hạn chế, đặc biệt là từ các mẫu mô vùi nẫn. Việc sử dụng mẫu FFPE trong giải trình tự vùng promoter gặp một số khó khăn, nhất là thu thập đủ lượng DNA tinh sạch và nguyên vẹn.<sup>4</sup> Một trong những nguyên nhân chính là dung dịch formalin đệm trung tính giúp ngăn ngừa sự phân hủy mô nhưng lại tạo ra các liên kết chéo và phân mảnh DNA, đồng thời cũng làm giảm khả năng phục hồi axit nucleic trong thời gian lưu trữ mẫu FFPE.<sup>5</sup> Những yếu tố này làm cho việc khuếch đại các đoạn DNA lớn trở nên khó khăn do giảm tính toàn vẹn của DNA. Vì vậy, các đoạn DNA ngắn thường được sử dụng trong các phân tích phân tử.<sup>6</sup> Điều này khiến mẫu FFPE khó đáp ứng yêu cầu của giải trình tự Sanger, đặc biệt khi khuếch đại vùng promoter giàu các vùng trình tự lặp lại. Để khắc phục vấn đề này, phương pháp TD-PCR được áp dụng để đảm bảo độ đặc hiệu của quá trình khuếch đại, đồng thời tạo ra đủ sản phẩm để giải trình tự về sau.

Hiện nay, Việt Nam vẫn chưa có công bố nào về thiết lập quy trình giải trình tự Sanger vùng promoter của gen *MMP-9* trên mẫu FFPE của bệnh nhân UTDD. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện tối ưu hóa quy trình giải trình tự vùng promoter của gen *MMP-9* nhằm cung cấp thêm dữ liệu về kỹ thuật chẩn đoán đối với carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Đối tượng nghiên cứu:** 21 mẫu FFPE của bệnh nhân đã được phẫu thuật và có chẩn đoán mô bệnh học là carcinôm dạ dày kém kết dính tại Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM từ 12/2024 - 12/2025.

**Thiết kế nghiên cứu:** thực nghiệm mô tả.

**Tiêu chuẩn chọn lựa:** Các trường hợp đưa vào nghiên cứu được hồi cứu từ dữ liệu điện tử lưu tại Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM, và thỏa các tiêu chí sau: chẩn đoán carcinôm dạ dày loại kém kết dính bởi bác sĩ Giải phẫu bệnh; mẫu mô được lưu trữ đúng ở nhiệt độ phòng ổn định (18-25°C) và còn đủ lượng mô u trong mẫu (diện tích mô u  $\geq 25-50$  mm<sup>2</sup> và tỷ lệ tế bào u  $\geq 20-30\%$ ) để thực hiện PCR và TD-PCR đồng thời.

**Tiêu chuẩn loại trừ:** Mẫu mô u không phải u nguyên phát tại dạ dày, hoặc bệnh nhân được điều trị tân bổ trợ trước phẫu thuật.

**Tách chiết DNA tổng số (hay toàn phần):** Chọn vùng mô u và cắt lát cho vào effendorf (diện tích mô u  $\geq 25-50$  mm<sup>2</sup> và tỷ lệ tế bào u  $\geq 20-30\%$ ). Sau đó chúng tôi tách chiết DNA tổng số từ mẫu FFPE bằng kit tách chiết ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega, Mỹ) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. DNA tổng số được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng hệ thống Nanodrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) và bảo quản ở nhiệt độ -30°C.

**Thiết kế môi:** Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã thiết kế và đánh giá bốn cặp môi (Bảng 1). Tuy nhiên, chỉ cặp môi F4R4 cho kết quả khuếch đại đặc hiệu.<sup>7</sup> Vì vậy, tất cả các thí nghiệm và phân tích kết quả trình bày trong các phần tiếp theo đều được thực hiện bằng cặp môi F4R4, với kích thước sản phẩm khuếch đại là 436 bp.

**Bảng 3. Trình tự môi và kích thước sản phẩm PCR được sử dụng trong nghiên cứu**

STT	Môi	Trình tự môi (5' - 3')	Kích thước sản phẩm (bp)
1	F1 R1	AGCCTGGTCAACGTAGTGAA GGTTCAAGCAATTCTCCTG	123
2	F2 R2	AATCCTAGCACTTTGGGAGG GGTTCAAGCAATTCTCCTG	181
3	F3 R3	<b>CTAGCACTTTGGGAGGCCAG ATCTCGGCTCACTGCAACAT</b>	<b>206</b>
4	F4 R4	<b>GCCTGGCACATAGTAGGCC CTTCTAGCCAGCCGGCATC</b>	<b>436</b>

**Phương pháp PCR:** Điều kiện phản ứng PCR được tối ưu hóa bằng cách sử dụng bộ kit TaKaRa Taq™ HotStart Polymerase (TaKaRa, Nhật Bản). Các phản ứng PCR được tiến hành trên hệ thống SimplyAMP™ Thermal Cyclor (Eppendorf, Đức), với nhiệt độ bắt cặp được khảo sát tại 56°C, 58°C, 60°C và 62°C nhằm xác định điều kiện tối ưu. Chu trình nhiệt của PCR bao gồm giai đoạn biến tính ban đầu ở 98°C trong 3 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ gồm biến tính ở 98°C trong 15 giây, bắt cặp ở nhiệt độ khảo sát trong 20 giây và kéo dài ở 72°C trong 30 giây, sau cùng là bước kéo dài cuối ở 72°C trong 2 phút.

**Phương pháp TD-PCR:** Điều kiện phản ứng TD-PCR được thiết lập với giai đoạn biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút. Mỗi chu kỳ TD-PCR bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, bắt cặp trong 30 giây với nhiệt độ giảm dần từ 63°C xuống 58°C trong 11 chu kỳ đầu (giảm 0,5°C mỗi chu kỳ), và kéo dài ở 72°C trong 40 giây; tổng cộng 37 chu kỳ khuếch đại được thực hiện.

**Kiểm tra kết quả khuếch đại gen mục tiêu:** Các điều kiện PCR và TD-PCR nêu trên được áp dụng thống nhất cho tất cả các cặp mẫu trong nghiên cứu. Mỗi phản ứng đều được thực hiện kèm theo mẫu chứng âm không chứa DNA để kiểm soát nguy cơ ngoại nhiễm. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2% có bổ sung ethidium bromide và quan sát dưới hệ thống GelDoc-IT™ (UVP, Hoa Kỳ). Các sản phẩm đạt yêu cầu khi xuất hiện một băng DNA duy nhất với kích thước phù hợp với cặp mẫu tương ứng.

**Giải trình tự Sanger:** Các sản phẩm PCR đạt yêu cầu được tinh sạch bằng bộ kit ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup theo chương trình luân nhiệt 37°C trong 15 phút và 80°C trong 15 phút. Sản phẩm tinh sạch sau đó được sử dụng cho phản ứng giải trình tự chu kỳ bằng BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Hoa Kỳ) theo cả hai chiều xuôi và ngược. Sản phẩm giải trình tự được kết tủa bằng ethanol tuyệt đối lạnh với sự hỗ trợ của muối NH<sub>4</sub>OAc, hòa tan trong dung dịch Hi-Di™ formamide, biến tính ở 96°C và làm lạnh nhanh. Trình tự DNA được phân tích trên hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer sử dụng polymer POP-7 và mao quản dài 50 cm (Applied Biosystems, Hoa Kỳ).

**Đạo đức trong nghiên cứu:** Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo đức trong Nghiên cứu y sinh học Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, số 4288/HĐĐĐ-ĐHYD ngày 27 tháng 12 năm 2024.

**Xử lý số liệu:** Số liệu được nhập vào phần mềm Excel và xử lý bằng phần mềm RStudio, với mức ý nghĩa thống kê được xác định khi giá trị  $p < 0,05$ .

### III. KẾT QUẢ

Trong tổng số 21 bệnh nhân được chẩn đoán carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính được đưa vào nghiên cứu, các đặc điểm lâm sàng - bệnh học được trình bày chi tiết ở Bảng 2. Tỷ lệ nam và nữ của nhóm bệnh nhân tương đương nhau, lần lượt là 52% và 48%. Độ tuổi mắc bệnh chủ yếu tập trung ở nhóm trên 50 tuổi, chiếm khoảng 76%, trong khi các nhóm tuổi ≤40 và từ 40-50 chiếm tỷ lệ thấp hơn. Về vị trí khối u, phân bố nhiều nhất là ở hang vị (38%), tiếp theo là bờ cong nhỏ (33%) và thân vị (24%), trong khi khối u toàn bộ dạ dày chỉ ghi nhận ở 4,8% trường hợp. Về đặc điểm đại thể, tổn thương dạng loét chiếm tỷ lệ cao nhất (67%), tiếp theo là u (19%) và tổn thương mất nếp niêm mạc dạ dày (9,5%), thấp nhất là thâm nhiễm cứng với 4,8%. Đánh giá về mức độ xâm nhập của u theo giai đoạn pT, giai đoạn pT4 chiếm tỷ lệ cao nhất (52%), trong khi các giai đoạn còn lại chiếm tỷ lệ thấp hơn dao động từ 9,5% đến 24%. Khi phân tích mối liên quan giữa các đặc điểm lâm sàng - bệnh học với **kiểu gen CC và CT**, không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 4. Đặc điểm lâm sàng - bệnh học của bệnh nhân theo kiểu gen CC và CT**

Đặc điểm	Tổng N = 21 <sup>1</sup> (%)	Kiểu gen CC N = 15 <sup>1</sup> (%)	Kiểu gen CT N = 6 <sup>1</sup> (%)	Giá trị p <sup>2</sup>
<b>Giới tính</b>				0,6
Nam	11 (52)	7 (47)	4 (67)	
Nữ	10 (48)	8 (53)	2 (33)	
<b>Độ tuổi</b>				0,7
≤40	1 (4,8)	1 (6,7)	-	
(40;50]	4 (19)	2 (13)	2 (33)	
>50	16 (76)	12 (80)	4 (67)	
<b>Vị trí khối u</b>				0,3
Bờ cong nhỏ	7 (33)	5 (33)	2 (33)	
Hang môn vị	8 (38)	4 (27)	4 (67)	
Thân vị	5 (24)	5 (33)	-	
Toàn bộ dạ dày	1 (4,8)	1 (6,7)	-	
<b>Dạng đại thể</b>				0,4
Loét	14 (67)	8 (53)	6 (100)	
Thâm nhiễm cứng	1 (4,8)	1 (6,7)	-	

Đặc điểm	Tổng N = 21 <sup>1</sup> (%)	Kiểu gen CC N = 15 <sup>1</sup> (%)	Kiểu gen CT N = 6 <sup>1</sup> (%)	Giá trị p <sup>2</sup>
U	4 (19)	4 (27)	-	
Tổn thương mất nếp niêm mạc dạ dày	2 (9.5)	2 (13)	-	
<b>Giai đoạn pT</b>				0,14
pT1	3 (14)	2 (13)	1 (17)	
pT2	2 (9,5)	-	2 (33)	
pT3	5 (24)	4 (27)	1 (17)	
pT4	11 (52)	9 (60)	2 (33)	

<sup>1</sup> n (%)

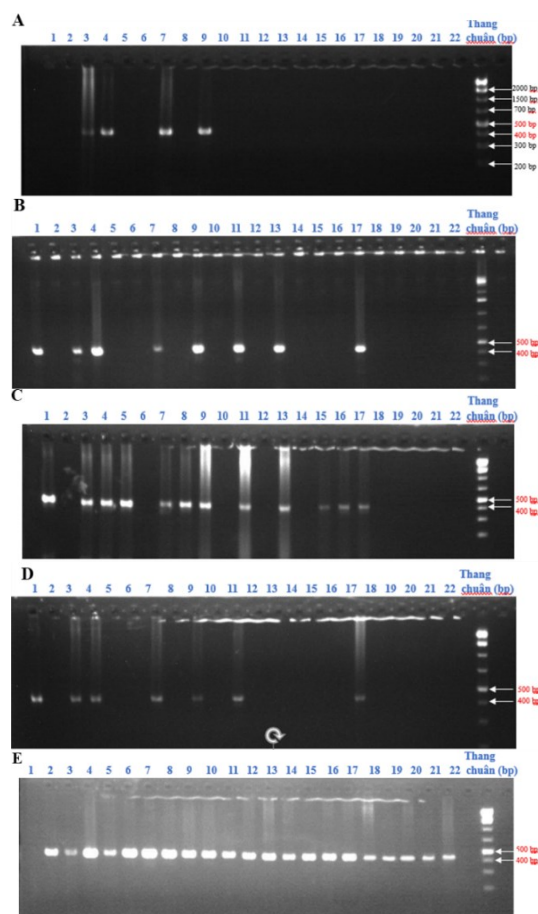
<sup>2</sup> Fisher's exact test

**Kết quả khuếch đại bằng phương pháp PCR và TD-PCR**

Trong nghiên cứu này, nhiệt độ bắt cặp được khảo sát tại bốn mức khác nhau gồm 56°C, 58°C, 60°C và 62°C. Tỷ lệ khuếch đại thành công của phương pháp PCR tương ứng với từng mức nhiệt độ bắt cặp được trình bày trong Bảng 3. Kết quả cho thấy phương pháp TD-PCR cho hiệu quả khuếch đại ổn định và vượt trội so với PCR thông thường ở tất cả các điều kiện nhiệt độ được khảo sát. Cụ thể, cả 21/21 mẫu đều được khuếch đại thành công khi áp dụng TD-PCR, và hiệu quả khuếch đại không bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi nhiệt độ bắt cặp trong khoảng từ 56°C đến 62°C. Ngược lại, PCR thông thường cho kết quả khuếch đại không ổn định, với số mẫu khuếch đại thành công lần lượt là 4/21, 8/21, 12/21 và 7/21 tại các mức nhiệt độ bắt cặp 56°C, 58°C, 60°C và 62°C (Hình 1.A - 1.D). Trong số các điều kiện được khảo sát, nhiệt độ bắt cặp 60°C được xác định là điều kiện tối ưu nhất đối với PCR thông thường, với 12/21 mẫu (57,14%) khuếch đại thành công, trong khi tại nhiệt độ 56°C chỉ ghi nhận 4/21 mẫu (19%).

**Bảng 5. Tỷ lệ khuếch đại thành công của phương pháp PCR ở các mức nhiệt độ bắt cặp**

STT	Nhiệt độ bắt cặp	Tỷ lệ khuếch đại thành công
1	56°C	19,00%
2	58°C	38,09%
3	60°C	57,14%
4	62°C	33,33%

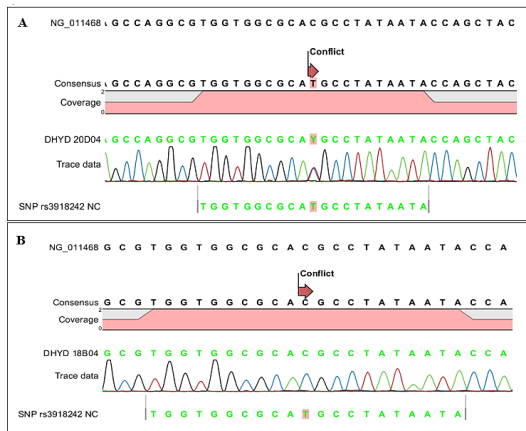


**Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm bằng phương pháp PCR và TD-PCR. A, B, C và D: Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại bằng phương pháp PCR với nhiệt độ bắt cặp lần lượt là 56°C, 58°C, 60°C và 62°C. E: Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại bằng phương pháp TD-PCR. Giếng 1-21: 21 mẫu bệnh nhân, giếng 22: mẫu chứng âm**

**Kết quả giải trình tự Sanger**

Như đã trình bày ở trên, tỷ lệ khuếch đại thành công của TD-PCR là 100%, cao hơn rõ rệt so với PCR thông thường, với tỷ lệ cao nhất được ghi nhận là 57,14%. Các sản phẩm PCR sau khuếch đại được tinh sạch và tiến hành giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự cho thấy tín hiệu điện di rõ ràng, các đỉnh sóng tách biệt tốt và không xuất hiện sóng nền, đảm bảo chất lượng dữ liệu phân tích (Hình 2). Nghiên cứu ghi nhận kết quả giải trình của các mẫu khuếch đại bằng PCR thông thường tương đương với TD-PCR; trong đó, có 15 mẫu mang kiểu gen đồng hợp tử CC (chiếm 80%), 6 mẫu mang kiểu gen dị hợp tử CT (20%) và không ghi nhận mẫu nào mang kiểu gen đồng hợp tử TT

(0%) ở cả hai phương pháp: PCR thông thường và TD-PCR.



**Hình 2. Kết quả giải trình tự Sanger xác định đa hình đơn nucleotide rs3918242 trên gen MMP-9. Hình ảnh sắc ký đồ (chromatogram) thể hiện tín hiệu đỉnh nucleotide rõ ràng, không có sóng nền. A: kiểu gen dị hợp tử CT; B: kiểu gen đồng hợp tử CC. Trình tự tham chiếu được đối chiếu với trình tự thu được từ mẫu nghiên cứu; DHYD 20D04, DHYD 18B04: Mã số nghiên cứu.**

#### IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu này so sánh hai kỹ thuật TD-PCR và PCR thông thường trong việc phát hiện SNP rs3918242 trên vùng promoter của gen *MMP-9* trên mẫu FFPE ở bệnh nhân carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính. Hiện nay chưa có nghiên cứu nào tại Việt Nam báo cáo về quy trình giải trình tự Sanger SNP này. Chúng tôi ghi nhận hiệu quả khuếch đại của TD-PCR là 100% và kiểu gen thu được tương đương với PCR thông thường.

Trong 21 trường hợp carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính được đưa vào nghiên cứu có phân bố giới tính khá đồng đều (nam: 52%, nữ: 48%). Độ tuổi chiếm ưu thế là từ 50 tuổi trở lên (76%), kết quả này tương tự nghiên cứu trước đây cũng cho thấy UTDD thường gặp ở nhóm tuổi trung niên và cao tuổi.<sup>8</sup> Điều này có thể ở độ tuổi từ 50 được xem là một yếu tố nguy cơ quan trọng, cần được chú ý trong sàng lọc và tầm soát UTDD. Về vị trí khối u, kết quả ghi nhận các vị trí thường gặp là hang vị (38%), bờ cong nhỏ và thân vị (cùng 33% và 24%), cho thấy carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính không tập trung ở một vị trí duy nhất mà có thể xuất hiện ở nhiều vùng khác nhau của dạ dày. Về mặt đại thể, tổn thương dạng loét chiếm tỷ lệ cao nhất (67%), phù hợp với tính chất xâm nhập mạnh của loại carcinôm dạ dày loại tế bào kém kết dính. Đặc

biệt, có đến 52% bệnh nhân được chẩn đoán ở giai đoạn pT4 là giai đoạn u xâm lấn thanh mạc (phúc mạc tạng) hoặc xâm lấn các cấu trúc lân cận và phần lớn bệnh nhân được chẩn đoán ở giai đoạn muộn. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của tác giả Phạm Văn Bình và cs ghi nhận tại Bệnh viện K (2024) ở bệnh nhân có chẩn đoán UTDD tế bào nhẵn (dưới nhóm của UTDD loại tế bào kém kết dính) thường gặp khối u ở hang vị và bờ cong nhỏ, và phần lớn bệnh nhân ở giai đoạn xâm lấn đã xâm lấn lớp cơ dạ dày.<sup>9</sup>

Trong nghiên cứu này, phương pháp khuếch đại PCR thông thường và TD-PCR đã được thực hiện để khuếch đại vùng promoter của gen *MMP-9* rs3918242 trên cùng một mẫu FFPE. Kết quả cho thấy phương pháp PCR thông thường chỉ khuếch đại thành công ở tối đa 12/21 mẫu (chiếm 57,1%), trong khi phương pháp TD-PCR cho kết quả khuếch đại thành công ở tất cả 21 mẫu (100%), kết quả này cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về hiệu quả giữa hai phương pháp. Kết quả giải trình tự tương đồng nhau ở hai nhóm bằng PCR và TD-PCR. Phương pháp PCR thông thường có ưu điểm là quy trình đơn giản, dễ thực hiện, tiết kiệm thời gian và chi phí; tuy nhiên, mẫu FFPE thường có DNA bị phân mảnh, biến tính và khó khuếch đại nên phương pháp này dễ dẫn đến khuếch đại không đặc hiệu hoặc không tạo sản phẩm. Trong khi đó, TD-PCR phức tạp hơn với sự thay đổi nhiệt độ bắt cặp theo chu kỳ, nhưng có ưu điểm vượt trội trong việc tăng tính đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng nhờ sử dụng nhiệt độ bắt cặp cao ở những chu kỳ đầu và giảm dần về sau. Điều này giúp giảm hiện tượng primer bắt cặp không đặc hiệu, đồng thời tối ưu hóa điều kiện khuếch đại ở các chu kỳ sau.

Bên cạnh đó, gen *MMP-9* nằm trên cánh dài NST số 20 (20q13.12), vị trí rs3918242 nằm trên vùng promotor của gen *MMP-9*, vùng này giàu các trình tự lặp lại (CpG islands, TATA box, GC-rich regions), dễ hình thành các cấu trúc bậc hai, dimer nên yêu cầu điều kiện bắt cặp chặt chẽ hơn. Phương pháp TD-PCR đã khắc phục được các yếu tố cản trở trên nhờ nhiệt độ bắt đầu cao và giảm 0,5°C sau mỗi chu kỳ, điều này làm giảm bắt cặp sai và tăng độ đặc hiệu. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với các báo cáo trước đó, Korbie DJ và Mattick JS (2008), TD-PCR cải thiện đáng kể độ đặc hiệu khi khuếch đại vùng trình tự khó khuếch đại.<sup>10</sup> Từ các kết quả và dẫn chứng nêu trên, việc lựa chọn TD-PCR cho thấy ưu thế và hiệu quả hơn trong nghiên cứu khuếch đại vùng promoter của gen *MMP-9* rs3918242 trên mẫu FFPE.

Tuy nhiên, nghiên cứu còn một số hạn chế, trong đó đáng chú ý là cỡ mẫu nhỏ; do đó, cần tiến hành các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn nhằm củng cố và khẳng định thêm giá trị của các kết quả thu được. Bên cạnh đó, về kích thước mỗi, mặc dù nhiều khuyến cáo cho rằng trên mẫu FFPE nên sử dụng primer có kích thước nhỏ hơn 200 bp, nhưng trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy các primer có kích thước < 200 bp không cho kết quả giải trình tự đặc hiệu. Vì vậy, chúng tôi chọn primer kích thước 436 bp như đã trình bày.

## V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy TD-PCR là phương pháp khuếch đại hiệu quả và phù hợp hơn so với PCR thông thường trên mẫu FFPE. Phương pháp này giúp tăng hiệu quả khuếch đại PCR, đặc biệt ở các vùng trình tự promoter của gen *MMP-9* rs3918242 (giàu vùng lặp lại). Kết quả nghiên cứu giúp cung cấp thêm phương pháp hiệu quả để đánh giá các marker carcinôm dạ dày loại kém kết dính.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **De Vita F, Giuliani F, Galizia G, et al.** Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy of gastric cancer. *Annals of oncology*. 2007;18:vi120-vi123.
2. **Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, et al.** Upregulated expression and activation of membrane-associated proteases in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 2014;31(6):2820-2826.
3. **Verma S, Kesh K, Gupta A, Swarnakar S.** An overview of matrix metalloproteinase 9 polymorphism and gastric cancer risk. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2015;16(17):7393-7400.
4. **Farrugia A, Keyser C, Ludes B.** Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Science International*. 2010;194(1-3):e25-e28.
5. **Klopfleisch R, Weiss A, Gruber A.** Excavation of a buried treasure-DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histology and histopathology, Vol 26, n°6 (2011)*. 2011;
6. **Impraim CC, Saiki RK, Erlich HA, Teplitz RL.** Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1987;142(3):710-716.
7. **Wang Y, Zhang L, Huang H, et al.** Relationship between the matrix metalloproteinase-9 gene polymorphisms and ischemic stroke. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2019;12(3):949.
8. **Fu C-K, Chang W-S, Tsai C-W, et al.** The association of MMP9 promoter Rs3918242 genotype with gastric cancer. *Anticancer Research*. 2021;41(7):3309-3315.
9. **Phạm Văn Bình, Trịnh Quốc Đạt, Lưu Đình Cường.** Một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ung thư dạ dày tế bào nhân. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 2024;537(2)
10. **Korbie DJ, Mattick JS.** Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*. 2008;3(9):1452-1456.

## HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ ĐAU THẦN KINH SAU ZONA BẰNG LIỆU PHÁP PROLOThERAPY

Lê Viết Thăng<sup>1,2,\*</sup>, Đỗ Trọng Phước<sup>1,2</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Đánh giá hiệu quả và độ an toàn của liệu pháp Prolotherapy trong điều trị đau thần kinh sau Zona (Postherpetic Neuralgia – PHN). **Phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang, thực hiện tại Đơn nguyên Điều trị Đau, Bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM từ 06/2024 đến 06/2025. Ba mươi bệnh nhân

được chẩn đoán PHN ≥ 3 tháng được điều trị bằng tiêm dung dịch Dextrose 10% quanh vùng tổn thương thần kinh, các chỉ số đánh giá gồm: thang điểm đau Numeric Rating Scale (NRS), thang điểm đau thần kinh Douleur Neuropathique en 4 questions (DN4), chất lượng giấc ngủ (PSQI) và mức độ hài lòng (Likert scale) tại các thời điểm 0 – 4 – 8 – 12 tuần. **Kết quả:** Nhóm Prolotherapy cho thấy mức giảm NRS trung bình từ 7,2 ± 1,1 xuống 2,8 ± 1,3 sau 12 tuần (p < 0,001), DN4 giảm trung bình 3,6 điểm (p < 0,05). Tỷ lệ hài lòng cao (>80%) và không ghi nhận biến chứng nghiêm trọng. **Kết luận:** Liệu pháp Prolotherapy là phương pháp an toàn, hiệu quả và có thể xem là lựa chọn điều trị hỗ trợ hoặc thay thế cho các trường hợp đau thần kinh sau Zona kháng thuốc. **Từ khóa:** đau thần kinh sau Zona, Prolotherapy, đau mạn tính, thần kinh ngoại biên.

<sup>1</sup>Bộ môn Ngoại Thần Kinh, Trường Y, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Đơn nguyên Điều trị Đau, Bệnh viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Lê Viết Thăng

Email: thang.lv@umc.edu.vn

Ngày nhận bài: 19.1.2026

Ngày phản biện khoa học: 9.2.2026

Ngày duyệt bài: 16.3.2026