

ứng dụng kỹ thuật NGS trong sàng lọc trước sinh không xâm lấn cho hội chứng mất đoạn 22q11.2. Xét nghiệm này có thể phát hiện chính xác vi mất đoạn gây hội chứng Di George từ DNA ngoại bào của nhau thai trong huyết tương của mẹ với độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Dunqan, Jeffrey S., et al.** "Noninvasive prenatal screening (NIPS) for fetal chromosome abnormalities in a general-risk population: An evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)." *Genetics in Medicine* 25.2 (2023): 100336.
2. **Jacobsson, Bo, et al.** "Cell-free DNA screening for prenatal detection of 22q11.2 deletion syndrome." *American journal of obstetrics and gynecology* 227.1 (2022): 79-e1.
3. **McDonald-McGinn DM, Hain HS, Emanuel BS, et al.** 22q11.2 Deletion Syndrome. 1999 Sep 23 [Updated 2020 Feb 27]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1523/>
4. **Tăng Hùng Sang, Đào Thị Hồng Thuý, Phan Ngọc Minh và cộng sự** (2023). Chẩn Đoán Trước Sinh Các Bất Thường Nhiễm Sắc Thể Bằng Kỹ Thuật Cnvseq Cho Đoàn Hệ 5.008 Thai Kỳ Việt Nam Trong Giai Đoạn 2018 – 2021. *Tạp chí y học dự phòng*, 33, 83-91. DOI: <https://doi.org/10.51403/0868-2836/2023/1230>
5. **Cortes C, Vapnik V.** Support-vector networks. *Mach Learn.* 1995;20(3):273-297.
6. **Morrow, Bernice E., et al.** "Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome". *American Journal of Medical Genetics – Part A* 176.10 (2018): 2070-2081.

NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN TẠI VÙNG KHỞI ĐỘNG GEN TERT Ở BỆNH NHÂN U THẦN KINH ĐỆM BẰNG GIẢI TRÌNH TỰ SANGER

Lương Bắc An¹, Hồ Quốc Chương¹, Dương Bích Trâm¹,
Trần Kim Tuyên², Hoàng Anh Vũ¹

TÓM TẮT

Mở đầu: U thần kinh đệm là một trong các ung thư có tỉ lệ tử vong cao, chiếm tới hơn 40% các trường hợp u não nguyên phát. Đột biến vùng khởi động phiên mã ngược gen telomerase (pTERT), C228T và C250T, thường gặp ở nhiều loại ung thư khác, trong đó có u thần kinh đệm. Các đột biến này tạo vị trí gắn kết ETS1 mới, làm tăng biểu hiện của enzyme telomerase trực tiếp dẫn đến quá trình sinh ung. Hiện diện đột biến gen pTERT kết hợp với các dấu ấn sinh học khác như đột biến gen IDH1, 1p19q, TP53, EGFR giúp phân loại nhóm bệnh u thần kinh đệm. Sàng lọc đột biến gen pTERT giúp đưa ra phác đồ điều trị phù hợp với tiên lượng điều trị tốt hơn. **Mục tiêu:** Xác định đột biến trên vùng khởi động gen TERT ở bệnh nhân u thần kinh đệm bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger. **Phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang với 83 mẫu mô vùi nền của bệnh nhân được chẩn đoán mắc u thần kinh đệm. Sử dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger phát hiện đột biến C228T và C250T thuộc vùng khởi động gen TERT. **Kết quả:** Phát hiện 27/83 (32,53%) bệnh nhân mang đột biến tại vùng gen pTERT. Trong đó, 17/83 (20,48%) trường hợp mang đột biến C228T và 10/83 (12,05%) trường hợp mang đột biến C250T. **Kết luận:** Nghiên cứu bước đầu mô tả được tỉ lệ mang đột biến tại vùng gen pTERT ở

bệnh nhân u thần kinh đệm tại Việt Nam. **Từ khóa:** U thần kinh đệm, TERT, C228T, C250T, pTERT.

SUMMARY

STUDYING OF THE DETECTION OF TERT PROMOTER MUTATIONS IN GLIOMAS PATIENTS BY USING SANGER SEQUENCING

Introduction: Glioma is one of the most lethal cancers, accounting for more than 40% of primary malignant brain tumors. Telomerase reverse transcriptase promoter (pTERT) mutations, especially C228T and C250T, frequently occur in many cancers, including gliomas. These mutations create a novel ETS1 binding site, leading to increased telomerase expression, directly contributing to tumorigenesis. The presence of pTERT mutations correlates with the presence of other biomarkers, such as IDH1, 1p19q, TP53, EGFR provide valuable insights into the disease. Screening for the presence of variants in pTERT may enhance prognosticate patients which may, in turn, improve clinical outcome. **Objective:** To study the proportion of C228T and C250T mutations in TERT promoter in DNA obtained from patients with gliomas. **Methods:** A cross-sectional descriptive study was conducted using 83 FFPE tissue samples from gliomas diagnosed patients. Sanger sequencing was used to identify C228T and C250T mutation in TERT promoter. **Results:** 27/83 (32.53%) patients had mutations in the TERT promoter. Among the mutated cases, 17/83 (20.48%) patients had the C228T mutation, and 10/83 (12.05%) cases had the C250T mutation. **Conclusion:** Initial research described the rate of mutations in TERT promoter in gliomas patients in Viet Nam. **Keywords:** Gliomas, TERT, C228T, C250T, pTERT.

¹Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

²Bệnh viện Chợ Rẫy

Chịu trách nhiệm chính: Lương Bắc An

Email: luongbacan1991@gmail.com

Ngày nhận bài: 23.11.2023

Ngày phản biện khoa học: 22.12.2023

Ngày duyệt bài: 24.01.2024

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

U thần kinh đệm là một trong những ung thư có tỉ lệ tử vong hàng đầu, chiếm đến hơn 40% các trường hợp u não nguyên phát. Mặc dù trải qua các phác đồ điều trị tiêu chuẩn, như phẫu thuật cắt lọc triệt để, xạ trị hoặc hoá trị với temozolomide, thì bệnh nhân u thần kinh đệm cũng chỉ có thời gian sống còn trung bình là 14,6 tháng, còn với bệnh nhân mắc u thần kinh đệm độ biệt hoá kém thì tiên lượng là rất xấu [1]. Sự khác biệt này không thể giải thích đơn giản bằng sự hiện diện của các dấu ấn sinh học đặc trưng, như đột biến isocitrate dehydrogenase 1/2 (IDH1/IDH2), O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) và Ki-67 [1] [2]. Các nghiên cứu hệ gen gần đây đưa ra các luận điểm liên quan đến di truyền phân tử của ung thư liên quan tới bất thường bộ gen, về bản chất các tế bào có mang những đột biến gen nhất định sẽ có biểu hiện tăng trưởng không hạn chế. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cho rằng gần 85% khối u có tăng biểu hiện hoạt tính của phức hợp enzyme ribonucleoprotein telomerase, dẫn tới các tế bào khối u trở nên bất tử [3].

Enzyme telomerase reverse transcriptase (TERT) đóng vai trò quan trọng trong duy trì chiều dài của đầu mút nhiễm sắc thể (telomere) và duy trì sự bất tử của nhiều loại ung thư ở người. Hai đột biến quan trọng trên vùng gen pTERT, C228T và C250T, đóng vai trò chủ chốt khi thúc đẩy hình thành vị trí bắt dính mới của các yếu tố tăng cường phiên mã. Điều này làm tăng biểu hiện và hoạt tính của enzyme telomerase, dẫn đến sự bất tử của tế bào và là cột mốc của quá trình sinh ung [4].

Đột biến C228T và C250T được ghi nhận ở nhiều loại ung thư, trong đó có u não nguyên phát và có liên quan tới giảm tỉ lệ sống còn của bệnh nhân. Do đó các đột biến này được sử dụng như là dấu ấn sinh học di truyền trong ung thư. Những dấu ấn này được sử dụng trong chẩn đoán, theo dõi điều trị và đóng góp vào phác đồ điều trị hiệu quả nhất cho bệnh nhân. Rất nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng sự hiện diện của đột biến C228T và C250T có liên kết chặt chẽ với các dấu ấn phân tử khác như đột biến khuếch đại gen EGFR, đồng mất đoạn 1p19q, mất đoạn CDKN2A, mất đoạn nhiễm sắc thể 10q và SEL1L [2]. Ngược lại, không ghi nhận mối liên quan giữa đột biến vùng gen pTERT với các đột biến gen khác như IDH và TP53 [3]. Do đó, nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu phát hiện đột biến trên vùng pTERT và mô tả tỉ lệ của đột biến ở bệnh nhân u thần kinh đệm tại Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang.

2.2. Đối tượng nghiên cứu. Nghiên cứu này được thực hiện trên 83 mẫu mô vùi nền (FFPE) của bệnh nhân được chẩn đoán u thần kinh đệm. Vùng khởi động gen TERT được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu, đột biến vùng khởi động gen TERT sẽ được phát hiện bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA từ mẫu mô vùi nền: Mẫu mô vùi nền được tách chiết DNA bằng bộ kit thương mại Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mỹ). Mẫu mô vùi nền được khử sáp trong dầu khoáng tại 80°C trong 2 phút, tiếp theo sau là li giải trong đệm li giải có bổ sung Proteinase K tại 56°C trong 1 giờ và ủ tiếp tại 80°C trong 1 giờ để bất hoạt enzyme Protease K. Hỗn hợp sau li giải được nạp lên cột lọc có màng silica và rửa với dung dịch đệm phù hợp. Phân tử DNA trên màng lọc được dung giải khỏi màng silica bằng 20-50ul dung dịch đệm 1X TE hoặc nước. Mẫu DNA sau tách chiết được kiểm tra bằng máy Nanodrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) để đánh giá nồng độ và độ tinh sạch. Các mẫu DNA có nồng độ thu được đạt tối thiểu 10ng/μl và độ tinh sạch (A260/A280) nằm trong khoảng 1.7-2.0 sẽ được khuếch đại vùng gen pTERT.

Khuếch đại vùng khởi động gen TERT và giải trình tự Sanger: Vùng gen pTERT được

khuếch đại bằng cặp mồi TERT-F (5'-GTCCTGCCCTTACCTT -3') và TERT-R (5'-AGCACCTCGCGGTAGTGG -3'). Nghiên cứu sử dụng bộ kit Takara Taq™ HotStart Polymerase (TakaraBio, Nhật Bản). Cụ thể, phản ứng được thiết lập trong đệm PCR (10mM Tris-HCl pH8.9, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂), 250nM dNTPs, 500nM mỗi mồi, 0.5 IU Taq polymerase và 40-100ng DNA khuôn. Phản ứng được khuếch đại thông qua chu trình nhiệt gồm biến tính ở 98°C trong 3 phút, 40 chu kì khuếch đại gồm: 98°C trong 10 giây, 62°C trong 30 giây và 72°C trong 40 giây, cuối cùng là 1 chu kì kéo dài tại 72°C trong 2 phút. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên thạch agarose 2% có thuốc nhuộm GelRed 2X. Gel được điện di trong 30 phút tại 100V. Kết quả sản phẩm điện di được quan sát trên hệ thống chụp ảnh điện di GelDoc-It™ (UVP, Mỹ).

Giải trình tự Sanger: Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Scientific, Mỹ) tại 37°C trong 15 phút và 80°C trong 15 phút, nhằm loại bỏ các đoạn mồi còn dư sau phản ứng PCR. Sản

phẩm sau tinh sạch sẽ được tiến hành giải trình tự 1 chiều bằng môi TERT-R sử dụng bộ kit BigDye Terminator V3.1 và điện di mao quản trên hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer (ABI, Mỹ).

Phân tích dữ liệu: Kết quả dữ liệu giải trình tự được phân tích bằng phần mềm CLC Mainwork Bench (QIA, Đức). Chất lượng giải trình tự phải đảm bảo không có sóng nhiễu, đỉnh sóng giải trình tự phân tách rõ ràng. Kết quả đột biến được phát hiện khi so sánh với trình tự gen tham chiếu TERT (NG_009265). Các dữ liệu về độ tuổi, giới tính, kết quả đột biến tại vị trí C228T và C250T được nhập liệu với Microsoft Excel.

2.4. Ý đức của nghiên cứu. Nghiên cứu được chấp thuận của hội đồng y đức Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh (316/HĐĐĐ-ĐHYD Ngày 14 tháng 3 năm 2022).

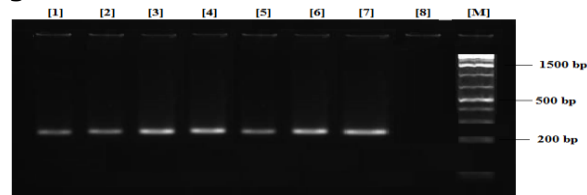
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm lâm sàng mẫu nghiên cứu. Trong thời gian nghiên cứu, có 83 bệnh nhân u thần kinh đệm tham gia vào nghiên cứu. Trong đó, tỉ lệ mắc u thần kinh đệm ở hai giới tương đối bằng nhau với lần lượt 43/83 (51,81%) nữ và 40/83 (48,19%) nam. Độ tuổi trung bình của dân số nghiên cứu là 48,39 tuổi với bệnh nhân nhỏ tuổi nhất là 23 tuổi và lớn tuổi nhất là 75 tuổi (bảng 1).

Bảng 1: Đặc điểm lâm sàng và kết quả đột biến pTERT của mẫu nghiên cứu

Đặc điểm lâm sàng		n=83
Giới tính	Nam (n,%)	40(48,19)
	Nữ (n,%)	43(51,81)
Tuổi	Trung bình (± Độ lệch chuẩn)	48,39±12,98
	Lớn nhất	75
	Nhỏ nhất	23
Nồng độ DNA	Trung bình (± Độ lệch chuẩn)	48,66±25,97
	Thấp nhất	7,8
	Cao nhất	122
Độ tinh sạch	A260/A280	1,81±0,04
Kết quả đột biến pTERT	C228T (n, %)	17(20,48)
	C250T (n, %)	10(12,05)
	Wild-Type (n, %)	56(67,47)

3.2. Kết quả khuếch đại vùng khởi động gen TERT

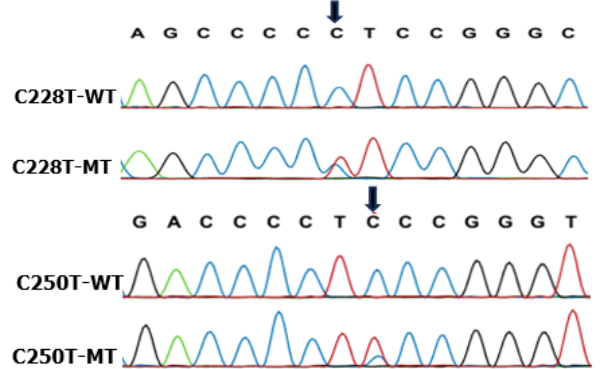


Hình 1. Kết quả khuếch đại vùng khởi động gen TERT

gen TERT

Kết quả khuếch đại vùng gen pTERT bằng cặp môi TERT-F/TERT-R cho thấy tất cả sản phẩm PCR (giếng 1-7) đều xuất hiện 1 vạch sản phẩm có kích thước khoảng 230bp, không xuất hiện vạch phụ. Mẫu chứng âm (giếng 8) không xuất hiện vạch sản phẩm khuếch đại, chứng tỏ phản ứng không nhiễm. Như vậy, nghiên cứu đã khuếch đại thành công vùng gen pTERT chứa đột biến C228T và C250T quan tâm.

Kết quả đột biến tại vùng gen pTERT bằng giải trình tự Sanger



Hình 2. Đột biến C228T và C250T trên vùng gen pTERT

Kết quả giải trình tự của 83 mẫu mô u ghi nhận thấy có 27/83 (32,53%) bệnh nhân u thần kinh đệm mang đột biến trên vùng gen pTERT. Trong đó, 17/83 (20,48%) trường hợp mang đột biến C228T và 10/83 (12,05%) trường hợp mang đột biến C250T. Các bệnh nhân còn lại, 56/83 (67,47%), không ghi nhận đột biến tại vùng gen pTERT.

IV. BÀN LUẬN

U thần kinh đệm được phân loại điều trị dựa trên mức độ biệt hoá của các nhóm nhỏ tế bào ung thư. Bên cạnh sự hiện diện đột biến tại vùng nóng của gen IDH1/2 là dấu ấn phân tử quan trọng của u thần kinh đệm, thì đột biến pTERT và tình trạng methyl hoá của vùng khởi động gen MGMT (pMGMT) cũng được xem là đặc điểm phân tử trong phân loại nhóm bệnh u não [5]. Mặc dù phần lớn các khối u thần kinh đệm không có đột biến IDH, nhưng đột biến pTERT lại thường gặp ở nhóm bệnh nhân u thần kinh đệm không mang đột biến IDH. Đến nay, các nghiên cứu chức năng về con đường liên quan telomerase ở bệnh nhân có/không mang đột biến IDH vẫn chưa rõ ràng. Các nghiên cứu biểu hiện gen ở mẫu u thần kinh đệm biệt hoá kém vẫn chưa nhận định rõ được cơ chế khác biệt giữa nhóm có/không đột biến gen IDH và pTERT

với nhóm IDH và pTERT cùng mang đột biến. Bên cạnh trạng thái đột biến của IDH và pTERT, thì một nhóm hiếm các trường hợp u thần kinh đệm còn được phân loại thông qua các dấu ấn sinh học như đồng mất đoạn 1p19q và đột biến bất hoạt SMARCA1[2]. Trong đó, SMARCA1 đóng vai trò quan trọng trong cơ chế di truyền phân tử mới của ALT và tham gia vào các cơ chế hoạt hoá telomerase mới ở u thần kinh đệm xảy ra ở các con đường bất thường bộ gen vùng điều hoà phía trước gen TERT. Tích hợp kết quả đột biến gen pTERT vào các biến đổi di truyền ở u thần kinh đệm và phân loại rõ đặc điểm di truyền khối u làm tăng hiểu biết về đặc điểm di truyền sinh ung trong khối u.

Rất nhiều nghiên cứu đã mô tả rõ hai điểm đột biến chủ đạo trên vùng gen pTERT gồm C228T và C250T. Vai trò của đột biến này góp phần tăng điều hoà hoạt động của enzyme telomerase. Ở mức độ phân tử, đột biến tại 2 vị trí này tạo trình tự nhận diện 11 bp (CCCGGAAGGGG) mới, vùng nhận diện cho họ protein chuyển dạng đặc hiệu E26 (ETS) của yếu tố phiên mã (GABPA), tham gia vào hoạt hoá phiên mã của TERT. GABPA là trung tâm điều hoà biểu hiện của TERT trong u nguyên bào thần kinh đệm. Ngoài ra, dạng động phân B1L của GABPA hoạt động hết mức khi tế bào có mang đột biến vùng gen pTERT. Trong khi đó GABPA-B1L không hoạt hoá trong trường hợp không có đột biến pTERT. Hơn nữa, nghiên cứu gần đây cho thấy đột biến điểm BRAF V600E u thần kinh đệm có mang đồng thời đột biến vùng gen pTERT, khiến nhiều thành viên của ETS (ETS1, GABPA, ETV1, ETV4 và ETV5) cũng hoạt hoá quá mức [3].

Trong nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận được 32,53% bệnh nhân u thần kinh đệm có mang đột biến vùng gen pTERT. Tỷ lệ này tương đương với các nghiên cứu khác trên thế giới. Các nghiên cứu cho thấy đột biến vùng gen pTERT có mối liên quan tới độ tuổi chẩn đoán u thần kinh đệm, trong đó tỷ lệ đột biến cao ở bệnh nhân lớn tuổi hơn. Đột biến C228T xuất hiện thường xuyên hơn so với đột biến C250T. Khi phân tích 887 bệnh nhân u thần kinh đệm, đột biến C250T ghi nhận thấy ở 9,5% trường hợp còn đột biến C228T ghi nhận được khoảng 30,9% số trường hợp được khảo sát, đặc biệt ở nhóm u thần kinh đệm ít nhánh thì đột biến xảy ra ở 75,7% trường hợp [6]. Bệnh nhân mang đột biến C228T có tỷ lệ sống còn thấp hơn bệnh nhân mang đột biến C250T. Ngoài ra, nghiên

cứ chỉ ra rằng tần suất đột biến xảy ra tăng dần theo độ tuổi và bệnh nhân trẻ hơn có mang đột biến vùng gen pTERT có thời gian sống còn lâu hơn so với bệnh nhân lớn tuổi hơn cùng mang đột biến. Một nghiên cứu khác đánh giá 128 bệnh nhân u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng và phát hiện 86% bệnh nhân có mang đột biến, với 75% mang đột biến C228T và 25% mang đột biến C250T [7]. Do đó, nghiên cứu tình trạng mang đột biến vùng gen pTERT là quan trọng và cần thiết trong chẩn đoán sớm, phân loại bệnh cũng như hỗ trợ đưa ra phác đồ điều trị phù hợp và tiên lượng hiệu quả điều trị.

V. KẾT LUẬN

Tỷ lệ đột biến vùng gen pTERT là 32,53% số trường hợp u thần kinh đệm. Trong đó, tỷ lệ bệnh nhân mang đột biến C228T là 20,48% cao hơn các trường hợp mang đột biến C250T là 12,05%. Phát hiện đột biến trên vùng gen pTERT góp phần phân nhóm bệnh nhân và đưa ra phác đồ điều trị phù hợp.

Tuyên bố về quyền lợi: Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi liên quan đến việc xuất bản bài báo này.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi quỹ nghiên cứu khoa học của Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yuan Y., Qi C., Maling G., et al. (2016). TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk. *J Clin Neurosci*, 26, 57–62.
2. Arita H., Matsushita Y., Machida R., et al. (2020). TERT promoter mutation confers favorable prognosis regardless of 1p/19q status in adult diffuse gliomas with IDH1/2 mutations. *Acta Neuropathol Commun*, 8(1), 201.
3. Olympos N., Gilard V., Marguet F., et al. (2021). TERT Promoter Alterations in Glioblastoma: A Systematic Review. *Cancers*, 13(5), 1147.
4. Killela P.J., Reitman Z.J., Jiao Y., et al. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(15), 6021–6026.
5. Borah S., Xi L., Zaig A.J., et al. (2015). TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science*, 347(6225), 1006–1010.
6. You H., Wu Y., Chang K., et al. (2017). Paradoxical prognostic impact of TERT promoter mutations in gliomas depends on different histological and genetic backgrounds. *CNS Neurosci Ther*, 23(10), 790–797.
7. Mosrati M.A., Malmström A., Lysiak M., et al. (2015). TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget*, 6(18), 16663–16673.