

THIỆP LẬP QUY TRÌNH KHẢO SÁT ĐỘT BIẾN 21 GEN Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG TRẺ TUỔI BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ THỂ HỆ MỚI

Lê Thái Khuong¹, Phạm Thị Tường Oanh⁶, Lê Gia Hoàng Linh¹, Hồ Quốc Chương¹,
Trần Quang Khang⁴, Nguyễn Hoài Nghĩa¹, Nguyễn Hữu Thịnh^{2,5}, Nguyễn Hoàng Bắc^{2,5},
Trần Diệp Tuấn³, Đoàn Thị Phương Thảo⁴, Đỗ Đức Minh¹, Hoàng Anh Vũ¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Ung thư đại trực tràng (UTĐTT) là một trong những bệnh lý ác tính thường gặp của đường tiêu hóa và tỷ lệ người trẻ tuổi mắc bệnh này ngày càng tăng cao. Phần lớn bệnh nhân UTĐTT là do các đột biến sinh dưỡng gây ra, nhưng có khoảng 5% – 10% người bệnh mang các đột biến gen di truyền, liên quan đến một số hội chứng.

Mục tiêu: Xây dựng quy trình phát hiện đột biến 21 gen liên quan đến UTĐTT ở bệnh nhân trẻ tuổi bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới.

Phương pháp: DNA từ mẫu mô u của 20 bệnh nhân được chẩn đoán mắc UTĐTT sẽ được giải trình tự thế hệ mới để phát hiện đột biến sinh dưỡng và khẳng định lại bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger. DNA từ mẫu máu của các bệnh nhân cũng được giải trình tự Sanger nhằm giúp phát hiện các đột biến dòng mầm.

Kết quả: Nghiên cứu đã ghi nhận 15/20 bệnh nhân trẻ tuổi mắc UTĐTT có mang đột biến gen, trong đó tỷ lệ đột biến gen P53 chiếm cao nhất.

Kết luận: Xây dựng thành công quy trình phát hiện đột biến 21 gen liên quan đến UTĐTT ở những bệnh nhân trẻ tuổi bằng việc ứng dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới.

Từ khóa: ung thư đại trực tràng, kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới, NGS

ABSTRACT

STANDARDISED PROTOCOL FOR GENETIC EXAMINATION OF COLORECTAL CANCER IN THE YOUTH BY NEXT GENERATION SEQUENCING

Le Thai Khuong, Pham Thi Tuong Oanh, Le Gia Hoang Linh, Ho Quoc Chuong, Tran Quan Khang,
Nguyen Hoai Nghia, Nguyen Huu Thinh, Nguyen Hoang Bac, Tran Diep Tuan,
Doan Thi Phuong Thao, Do Duc Minh, Hoang Anh Vu

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 25 - No 1 - 2021: 126-133

Background: Colorectal cancer (CRC) is a common gastrointestinal malignancy and the rate of CRC in the youth is increasing. Most of the CRC cases are sporadic, however, 5% – 10% of CRC patients carry genetic mutations, which are related to some syndromes.

Objective: A standardised next-generation sequencing protocol was developed to detect genetic mutations by a panel of 21 CRC-related genes.

¹TT Y Sinh Học Phân Tử, Đại học Y Dược TP. HCM ²BM Ngoại tổng quát, Đại học Y Dược TP. HCM

³Bộ môn Nhi, Đại học Y Dược TP. HCM ⁴Bộ môn Mô phôi – Giải phẫu bệnh, Đại học Y Dược TP. HCM

⁵Bệnh viện Đại học Y Dược TP. HCM

⁶Khoa Sinh học – CNSH, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. HCM

Tác giả liên lạc: PGS.TS. Hoàng Anh Vũ ĐT: 0772993537 Email: hoanganhvu@ump.edu.vn

Methods: Somatic mutations in 20 CRC patients were detected by next generation sequencing and confirmed by Sanger sequencing. Germline mutations were also determined by Sanger sequencing from patients' whole blood DNA.

Results: Somatic mutations were detected in 15 out of 20 young patients with CRC. The mutations were most prevalent in P53 gene.

Conclusion: A next-generation sequencing protocol to detect somatic mutations in CRC of the youth was successfully developed.

Keywords: colorectal cancer, next-generation sequencing

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Tổ chức Y tế thế giới, hiện nay bệnh ung thư gây tử vong nhiều hơn cả bệnh tim - mạch vành và đột quỵ. Trong đó, ung thư đại trực tràng (UTĐTT) là loại ung thư được chẩn đoán phổ biến thứ ba ở nam giới và thứ hai ở nữ giới⁽¹⁾. Mặc dù độ tuổi 60 - 70 tuổi có tần suất mắc UTĐTT cao nhất, trong những năm gần đây, tần suất UTĐTT ở người trẻ tuổi (≤ 50 tuổi) đang có dấu hiệu tăng lên và những bệnh nhân UTĐTT này thường được phát hiện ở giai đoạn muộn (giai đoạn III/IV) so với nhóm bệnh nhân lớn tuổi nên có tiên lượng rất kém^(2,3,4,5,6).

Khoảng 25% bệnh nhân UTĐTT có tiền sử người thân trong gia đình cũng mắc bệnh này, cho thấy có sự đóng góp của yếu tố di truyền gây tăng nguy cơ bệnh. Bên cạnh đó, một số đột biến sinh dưỡng (đột biến soma) là các dấu ấn sinh học (biomarkers) giúp tiên lượng diễn tiến của bệnh hoặc tiên đoán đáp ứng điều trị nhắm trúng đích phân tử trong bệnh lý UTĐTT^(7,8). Hiện nay, các gen được cho rằng có liên quan đến UTĐTT thuộc 3 nhóm: nhóm gen ức chế khối u (tumor suppressor gene như APC, P53, STK11, PTEN, BMPR1A, SMAD4, CHEK2...), nhóm gen tiền sinh ung (proto-oncogene như KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA...) và nhóm gen sửa sai DNA (mismatch repair gene - MMR như POLD1, POLE, MUTYH, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM...). Ngoài ra, một số đột biến gen mới cũng được phát hiện gần đây làm tăng nguy cơ mắc ung thư như gen ATM, CDH1...⁽⁹⁾.

Để phát hiện các biến thể di truyền, kỹ thuật được sử dụng phổ biến trước đây là kỹ thuật giải trình tự Sanger. Tuy nhiên, kỹ thuật này có

giá thành cao, tốn nhiều công sức và độ nhạy thấp (kỹ thuật giải trình tự Sanger khó phát hiện những đột biến có tần suất $< 20\%$)⁽¹⁰⁾. Kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (next generation sequencing - NGS) là công nghệ giải trình tự gen tiên tiến, có thể giúp phát hiện cùng lúc nhiều biến thể di truyền trên các gen khác nhau, với độ nhạy cao và chi phí thấp hơn.

Tại Việt Nam, có nhiều nghiên cứu về lâm sàng - giải phẫu bệnh và điều trị trong UTĐTT. Một số nghiên cứu về đột biến gen ở UTĐTT được thực hiện bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào thực hiện phát hiện các biến thể di truyền ở nhóm bệnh nhân UTĐTT trẻ tuổi. Do đó, nghiên cứu này sẽ ứng dụng kỹ thuật NGS để phát hiện các biến thể di truyền liên quan đến UTĐTT ở người trẻ tuổi nhằm phục vụ công tác chẩn đoán, điều trị và tư vấn di truyền cho bệnh nhân và gia đình bệnh nhân.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu gồm 20 bệnh nhân được chẩn đoán mắc UTĐTT bằng giải phẫu bệnh, có độ tuổi dưới 50 tuổi, được phẫu thuật và điều trị tại bệnh viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết genomic DNA từ mẫu mô u vùi nén và mẫu máu

Mẫu mô vùi nén (Formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE)

Thu hoạch tế bào ung thư từ mô vùi nén sau khi đã được chẩn đoán giải phẫu bệnh vào tube

1,5 ml. DNA từ tế bào mô u được tách chiết bằng GeneRead DNA FFPE Kit (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA được kiểm tra độ tinh sạch và nồng độ bằng máy QFX Fluorometer (DeNovix, Delaware, Mỹ) với lượng DNA tối thiểu cần đạt là 3,0 ng/ μ L.

Mẫu máu

Mẫu máu ngoại vi được lấy vào tube có chất chống đông EDTA. DNA từ 0,2 mL máu được tách chiết bằng Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit của hãng GE Healthcare theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thiết kế môi cho phản ứng multiplex-PCR

Chúng tôi tiến hành khảo sát tình trạng đột biến 21 gen là *APC*, *P53*, *STK11*, *PTEN*, *BMPR1A*, *SMAD4*, *CHEK2*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *POLD1*, *POLE*, *MUTYH*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, *ATM* và *CDH1*.

Các cặp môi dùng cho phản ứng PCR nhân bản vùng mã hóa của 21 gen mục tiêu dựa trên nguyên tắc AmpliSeq Gene, được thiết kế trên phần mềm Design Studio (<https://login.illumina.com>) với thông số kích thước đoạn khuếch đại tối đa là 140bp và độ phủ có thể chấp nhận là trên 95%. Các cặp môi sẽ được tổng hợp tại công ty Illumina và chia thành 3 bộ hỗn hợp môi (pool 1, pool 2 và pool 3).

Xây dựng thư viện DNA

DNA sau khi được tách chiết với nồng độ tối thiểu cần đạt là 3,0 ng/ μ L sẽ được tiến hành phản ứng multiplex-PCR ứng với 3 bộ hỗn hợp môi riêng biệt.

Mẫu DNA chứng dương Tru-Q1 từ dòng tế bào HCT116/RKO/SW48 (Horizon Discovery, Cambridge, Anh), với các trình tự và tỷ lệ đột biến đã biết trước được dùng làm chứng dương cho quy trình giải trình tự gen.

Thành phần phản ứng multiplex-PCR gồm: 2 μ L 5X AmpliSeq HiFi Mix, 2 μ L DNA, 5 μ L bộ hỗn hợp môi và 1 μ L nước khử ion.

Chương trình luân nhiệt của phản ứng multiplex-PCR: 99°C trong 2 phút, theo sau là 19 chu kỳ ở 99°C trong 15 giây và 60°C trong 4

phút; sau cùng mẫu được giữ ở 10°C.

Những đoạn DNA (amplicon) thu được từ phản ứng multiplex-PCR sau đó được xử lý với FuPa Reagent để loại bỏ trình tự môi trong điều kiện ủ ở 50°C trong 10 phút, tiếp theo là 55°C trong 10 phút và cuối cùng là 60°C trong 20 phút.

Để giải trình tự cùng lúc nhiều mẫu trên cùng một cartridge và flow cell, thư viện DNA của mỗi mẫu được gắn trình tự nhận biết (index và adapter) được cung cấp trong AmpliSeq CD Indexes với thể tích là 3 μ L, 3 μ L DNA ligase, 6 μ L Switch Solution và 33 μ L thư viện DNA đã loại bỏ trình tự môi. Phản ứng gắn index được thực hiện trong điều kiện 22°C trong 30 phút, 68°C trong 5 phút và 72°C trong 5 phút.

Thư viện sau khi nối index/adapter sẽ được tinh sạch bằng AMPure XP beads. Sau đó, tiếp tục nhân bản thư viện sau khi tinh sạch với chương trình luân nhiệt như sau: 98°C trong 2 phút, theo sau là 7 chu kỳ ở 98°C trong 15 giây và 60°C trong 1 phút; sau cùng mẫu được giữ ở 10°C. Sau đó, thư viện DNA tiếp tục được tinh sạch lần thứ hai bằng AMPure XP beads.

Thư viện DNA sau khi tinh sạch sẽ được định lượng bằng máy QFX Fluorometer (DeNovix, Delaware, Mỹ), pha loãng mẫu về 2 nM và kết hợp thư viện theo tỷ lệ tương đương cho mỗi mẫu để thu được thư viện đồng thời cho tất cả các mẫu ở nồng độ 2 nM.

Kỹ thuật NGS

Thư viện DNA hoàn chỉnh sẽ được giải trình tự trên hệ thống máy giải trình tự gen thế hệ mới MiniSeq (Illumina) sử dụng bộ hóa chất MiniSeq High Output kit (300 cycles).

Số lượng mẫu được nạp vào máy được tính toán sao cho đảm bảo độ phủ 1000X cho mẫu mô FFPE.

Phân tích dữ liệu

Dữ liệu trình tự được xử lý bằng phần mềm tin-sinh học thương mại BaseSpace Sequence Hub trên hệ thống Illumina.

Sơ đồ vận hành chung của quá trình phân tích dữ liệu NGS gồm các bước sau: xử lý tín hiệu, gọi tên nucleotide, cắt adapter, loại bỏ sản phẩm trùng lặp (PCR duplicate removal hoặc demultiplexing), sắp giống cột các trình tự thu được đến bộ gen tham khảo H19 (human genome 19 reference), kiểm soát chất lượng sắp giống cột, phân tích độ phủ và phát hiện biến thể (variant calling).

Các biến thể sau khi được xác định sẽ được phân loại dựa trên cơ sở dữ liệu ClinVar và cơ sở dữ liệu COSMIC. Những biến thể có hại (deleterious) nếu chúng được ghi nhận là gây bệnh (pathogenic) hoặc rất có thể gây bệnh (likely pathogenic).

Giải trình tự Sanger

Những biến thể được xác định là gây bệnh sẽ được xác định lại bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger. DNA mẫu có đột biến được khuếch đại với cặp mồi thích hợp tại những vị trí đột biến gây bệnh.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Giải trình tự được thực hiện với BigDye™ Terminator v3.1 (Life Technologies) và sau đó đem điện di tự động trên máy ABI 3500 (Applied Biosystems).

Kết quả được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench v5.5.

KẾT QUẢ

Tách chiết gDNA và chuẩn bị thư viện

Tách chiết gDNA thành công ở cả 20 mẫu FFPE. Hiện nay, quá trình tách chiết gDNA có thể được thực hiện bằng nhiều sản phẩm thương mại khác nhau; tuy nhiên, ly trích gDNA từ mẫu FFPE được khuyến cáo sử dụng sản phẩm GeneRead DNA FFPE Kit (Qiagen) vì trong quá trình tách chiết, DNA được xử lý với uracil-DNA glycosylase (UDG) để loại bỏ những đột biến dương tính giả gây ra do hiện tượng khử amin ở cytosine gặp ở mẫu FFPE.

Sau khi có nồng độ DNA, mỗi mẫu được

pha loãng về 3,0 ng để chạy multiplex-PCR. DNA từ 20 mẫu cùng với mẫu chứng dương được khuếch đại số lượng thành công bằng phản ứng multiplex-PCR.

Lượng DNA thư viện thu được sau tinh sạch đủ dùng để giải trình tự.

Thông số giải trình tự gen thế hệ mới

DNA từ các mẫu FFPE của bệnh nhân sau khi chuẩn bị thư viện thành công sẽ được giải trình tự cùng với mẫu chứng dương.

Bộ mồi sau khi được thiết kế sẽ bao phủ được 1313 đoạn trình tự nhỏ (amplicon) với tổng chiều dài là 93453 bp.

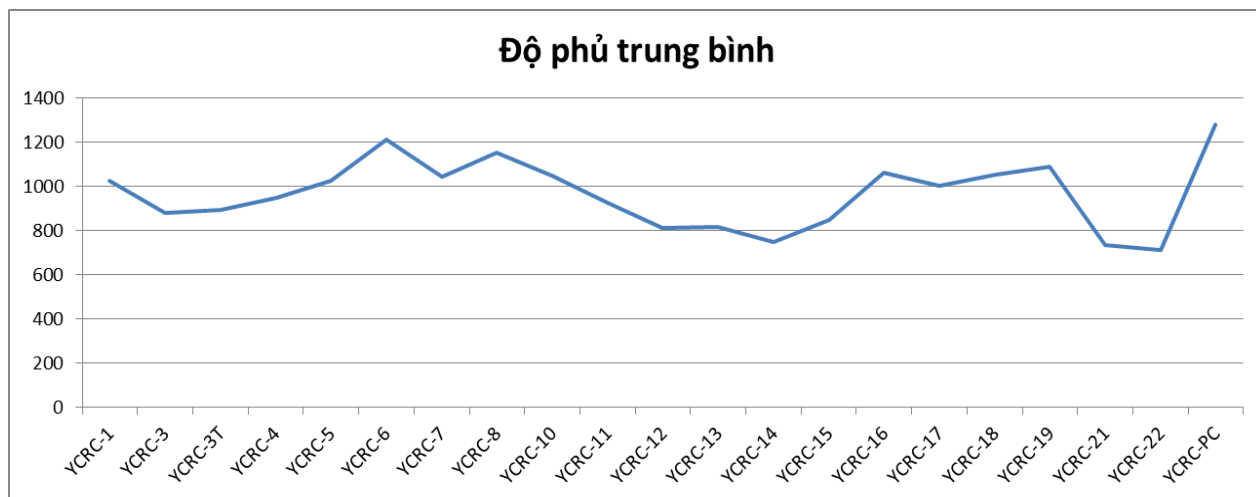
Với nồng độ đã chuẩn bị, khi nạp vào máy sẽ tạo mật độ tạo cụm (cluster density) là 261.800/mm². Tổng dung lượng giải trình tự là 4,3GB, trong đó chỉ số Q30 của lần chạy đạt mức 92% (hay 92% số lượng nucleotide được giải trình tự có tỉ lệ sai sót là 1/1000).

Độ phủ trung bình của các mẫu thể hiện trong *Hình 1*, với mẫu có độ phủ thấp nhất là mẫu 22 với độ phủ trung bình khoảng 700X (trung bình 1 nucleotide được giải trình tự 700 lần) và mẫu có độ phủ cao nhất là mẫu số 6 với độ phủ trung bình là 1200X.

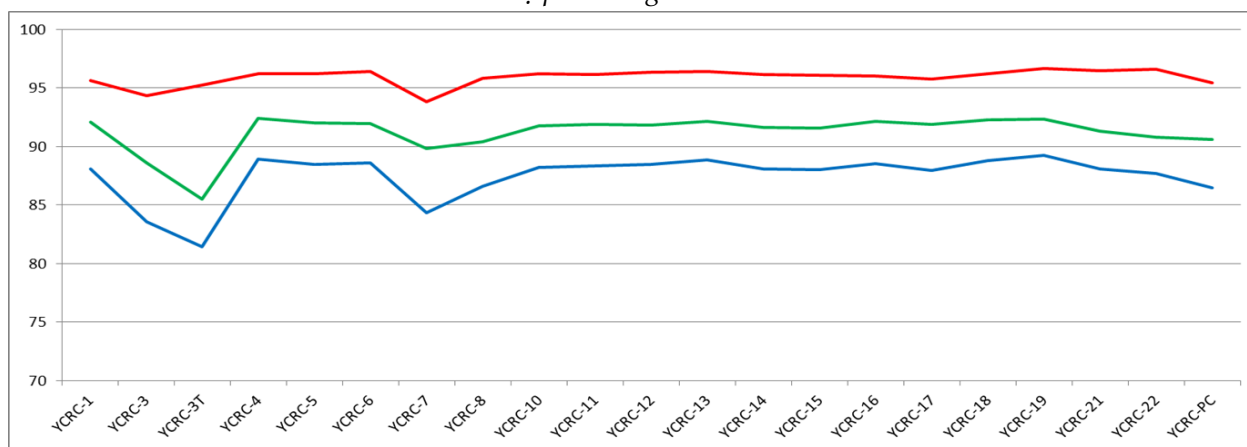
Trình tự đọc đúng mục tiêu dao động quanh mức 95% (đường biểu diễn màu đỏ), có nghĩa là các trình tự được giải 95% khớp với bộ amplicon được thiết kế ban đầu.

Các trình tự này sau đó được so sánh với trình tự mục tiêu của các gen được thiết kế ban đầu. Kết quả cho thấy mức độ khớp này dao động quanh mức 90% (đường biểu diễn xanh lá cây). Cuối cùng, tỉ lệ các trình tự sau khi khớp với trình tự mục tiêu đạt được chuẩn nội kiểm của máy giải trình tự (passing filter), tỉ lệ này dao động quanh mức 87% (đường biểu diễn màu xanh dương) (*Hình 2*).

Tóm lại, có thể thấy các phản ứng giải trình tự cho hiệu suất cao, hơn 87% trong tổng số dung lượng đọc được từ máy giải trình tự có thể giúp ta phân tích kết quả đột biến gen.



Hình 1: Độ phủ trung bình của các mẫu



— Trình tự đọc đúng mục tiêu
 — Trình tự đọc đúng mục tiêu đạt chuẩn
 — Trình tự đọc align được

Hình 2: Các thông số của quy trình kỹ thuật NGS

Kết quả NGS ở mẫu chứng dương

Trong kỹ thuật NGS, bên cạnh việc xác định được các biến thể di truyền, ngưỡng phát hiện đột biến là một yêu cầu rất quan trọng (tỷ lệ DNA đột biến/DNA bình thường). Kết quả giải trình tự của các gen liên quan ở mẫu chứng dương cho thấy khả năng phát hiện các đột biến rất tương đồng so với thành phần công bố của nhà sản xuất (Bảng 1). Như vậy, có thể thấy sự khác biệt về tần suất phát hiện biến thể trong quy trình kỹ thuật của nghiên cứu không có khác biệt ý nghĩa thống kê với tỷ lệ của mẫu chứng dương nên quy trình này có thể ứng dụng vào lâm sàng.

Kết quả NGS ở mẫu mô u FFPE

Các biến thể có tần suất xuất hiện $\geq 5\%$ thường được xem là biến thể có ý nghĩa trong ung thư. Đây cũng là ngưỡng được nhiều nghiên cứu lớn trên thế giới áp dụng cho mục đích tìm nguyên nhân và tiên đoán đáp ứng với điều trị. Phân tích kết quả NGS từ mẫu FFPE ở 20 bệnh nhân, chúng tôi ghi nhận 15 bệnh nhân có mang đột biến gen. Tất cả các đột biến này được xác định lại bằng kỹ thuật Sanger (Bảng 2). Trong số đó có 2 đột biến cũng được phát hiện lại trong DNA của mẫu máu bệnh nhân tương ứng, gợi ý đây là hai đột biến mầm (gen *MUTYH* và *PMS2*).

Bảng 1: Các đột biến gen đã biết của mẫu chứng dương (Tru-Q1) và kết quả NGS trong nghiên cứu

NST	Gen	Biến thể	Tần suất (dựa trên NSX cung cấp)	Tần suất (nghiên cứu này)	p-value
7q34	BRAF	V600E	0,08	0,078 ± 0,016	0,86
7q34	BRAF	V600E	0,04	0,042 ± 0,001	0,96
12p12.1	KRAS	G12A	0,05	0,047 ± 0,005	0,48
12p12.1	KRAS	G12R	0,05	0,049 ± 0,003	0,75
12p12.1	KRAS	G13D	0,25	0,25 ± 0,005	0,54
1p13.2	NRAS	Q16K	0,05	0,051 ± 0,005	0,86
3q26.3	PIK3CA	H1047R	0,30	0,29 ± 0,03	0,57

Bảng 2: Kết quả phát hiện đột biến gen ở mẫu FFPE và máu của bệnh nhân

Mẫu	Kết quả NGS ở mẫu FFPE		Kết quả giải trình tự Sanger	
	Gen	Kiểu đột biến (% alen)	Mẫu FFPE	Mẫu máu
YCRC-1	PIK3CA	c.1624G>A (16,2%)	+	-
	P53	c.844C>T (27,5%)	+	-
	POLE	c.857C>G (17,8%)	+	-
YCRC-2	MUTYH	c.934-2A>G (50%)	+	+
YCRC-3	PIK3CA	c.3140A>G (31,8%)	+	-
	KRAS	c.351A>T (25%)	+	-
	PMS2	c.341_348del (41,2%)	+	+
YCRC-4	P53	c.844C>T (65,8%)	+	-
YCRC-5	P53	c.422G>A (10,7%)	+	-
	KRAS	c.38G>A (13%)	+	-
	APC	c.3927_3931del (17,2%)	+	-
YCRC-6	P53	c.526T>A (50%)	+	-
YCRC-8	P53	c.818G>A (16,6%)	+	-
YCRC-10	P53	c.524G>A (18%)	+	-
	KRAS	c.38G>A (32,4%)	+	-
YCRC-11	PIK3CA	c.1633G>A (10,4%)	+	-
	KRAS	c.35G>A (21,8%)	+	-
YCRC-12	P53	c.524G>A (28,4%)	+	-
	KRAS	c.35G>T (20,2%)	+	-
YCRC-13	PIK3CA	c.1258T>C (26,3%)	+	-
	P53	c.527G>A (23,8%)	+	-
	KRAS	c.35G>A (27,7%)	+	-
YCRC-14	PIK3CA	c.3062A>G (23,4%)	+	-
	P53	c.817C>T (37,2%)	+	-
	PMS2	c.1333A>T (51,4%)	+	-
YCRC-16	APC	c.3340C>T (22,8%)	+	-
	MLH1	c.790+1G>A (16,8%)	+	-
YCRC-17	PIK3CA	c.3140A>G (37,1%)	+	-
	KRAS	c.38G>A (26,8%)	+	-
	APC	c.4348C>T (30,1%)	+	-
YCRC-22	PIK3CA	c.1637A>G (13,6%)	+	-
	KRAS	c.38G>A (34,4%)	+	-

BÀN LUẬN

Việt Nam là nước có tỷ lệ bệnh nhân mắc UTĐTT cao, đứng hàng thứ hai trong các bệnh lý ác tính đường tiêu hóa và là vấn đề lớn đối với sức khỏe cộng đồng. Tần suất UTĐTT ở

bệnh nhân trẻ tuổi ở Việt Nam khác nhau theo một vài nghiên cứu⁽¹¹⁾. Theo nghiên cứu tại bệnh viện Ung bướu TP. Hồ Chí Minh, tỷ lệ này chiếm khoảng 30%⁽¹²⁾. Tại bệnh viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, tỷ lệ này là 24,1% ở

nhóm bệnh nhân nhỏ hơn 50 tuổi và 11,7% ở nhóm bệnh nhân nhỏ hơn 40 tuổi⁽¹³⁾.

Hiện nay, ngoài việc chẩn đoán UTĐTT bằng tiêu chuẩn vàng là hình ảnh giải phẫu bệnh, một số kỹ thuật như hóa mô miễn dịch, giải trình tự Sanger giúp hỗ trợ công tác chẩn đoán và theo dõi điều trị. Tuy nhiên, các kỹ thuật này chưa đánh giá được tính toàn diện và hạn chế về độ nhạy, thời gian thực hiện và chi phí cao. Do đó, kỹ thuật NGS hiện nay là công cụ mạnh, giúp đi sâu tìm hiểu bản chất sinh học của các bệnh lý ung thư. Đối với những bệnh nhân trẻ tuổi mắc UTĐTT, ngoài việc phát hiện các đột biến sinh dưỡng (đột biến soma) thì có khả năng rất cao phát hiện được các đột biến dòng mầm (germline) nhằm hỗ trợ tư vấn di truyền cho người thân bệnh nhân.

Bằng việc ứng dụng kỹ thuật NGS trên 21 gen mục tiêu liên quan đến UTĐTT, nghiên cứu đã ghi nhận tỷ lệ gen có đột biến cao nhất là *P53* (chiếm 45%), tỷ lệ này khá tương đồng với nghiên cứu trước đây khi thực hiện bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger⁽¹⁴⁾. Tỷ lệ đột biến gen *KRAS* trong nghiên cứu này chiếm 40% so với nghiên cứu khác là 35,8%⁽¹⁵⁾. Tuy nhiên, tỷ lệ đột biến gen *PIK3CA* trong nghiên cứu này (35%) cao hơn nhiều so với nghiên cứu thực hiện tại Cần Thơ (6%)⁽¹⁶⁾. Hiện nay, chưa có thuốc điều trị nhắm trúng đích đột biến gen *PIK3CA* trong UTĐTT. Việc phát hiện đột biến gen *PIK3CA* cùng với các đột biến gen *KRAS*, *NRAS* và *BRAF* có thể có ý nghĩa trong việc tiên đoán đáp ứng kém hoặc kháng với điều trị nhắm trúng đích bằng kháng thể đơn dòng.

Những gen liên quan đến sự di truyền của UTĐTT cũng được phát hiện như gen *POLE*, *MUTYH*, *PMS2*, *APC*, *MLH1*. Đột biến ở các gen này cũng được xác định lại bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger và tiến hành khảo sát đột biến trong máu bệnh nhân. Kết quả ghi nhận có 2 trường hợp bệnh nhân mang đột biến dòng mầm (YCRC-2 và YCRC-3). Các đột biến dòng mầm này nên được tiến hành khảo sát ở người thân của bệnh nhân để được tư vấn di truyền.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thiết kế thành công quy trình ứng dụng kỹ thuật NGS cho mẫu chứng dương và bước đầu ứng dụng trên bệnh nhân trẻ tuổi mắc UTĐTT. Với kỹ thuật NGS, công tác chẩn đoán phân tử có thể hiệu quả về mặt thời gian và kinh phí. Tuy nhiên, các thông số về độ nhạy, độ đặc hiệu và độ lặp của kỹ thuật cần được xác định chính xác trước khi ứng dụng rộng rãi vào lâm sàng.

Thông tin tài trợ: Nghiên cứu được thực hiện dựa trên kinh phí tài trợ của Sở Khoa học và Công nghệ TP. HCM, Việt Nam theo hợp đồng số 16/2019/HĐ-QPTKHCN ngày 15 tháng 5 năm 2019).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015). Cancer statistics, 2015. *A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1):5-29.
2. Đỗ Đình Công và Nguyễn Hữu Thịnh (2009). Các yếu tố ảnh hưởng đến chẩn đoán muộn ung thư đại trực tràng. *Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 13(1):22-25.
3. Dozois EJ, Boardman LA, Suwanthanma W, Limburg PJ, Cima RR, Bakken JL, Vierkant RA, Aakre JA, Larson DW (2008). Young-onset colorectal cancer in patients with no known genetic predisposition: can we increase early recognition and improve outcome? *Medicine*, 87(5):259-263.
4. O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA (2003). Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *American Surgeon*, 69(10):866-872.
5. Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Anti M (2014). Early-onset colorectal cancer: a sporadic or inherited disease? *WJG*, 20(35):12420-12430.
6. Syngal S (2015). Colorectal cancer in young adults. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(3):722-733.
7. Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407):330-337.
8. Van Cutsem E, Kohne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*, 29(15):2011-2019.
9. Grady WM, Pritchard CC (2014) Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicologic Pathology*, 42(1):124-139.
10. Johnson B, Cooke L, Mahadevan D (2017). Next generation sequencing identifies 'interactome' signatures in relapsed and refractory metastatic colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8(1):20-31.
11. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in

- GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5):E359-E386.
12. Bùi Chí Việt, Nguyễn Bá Trung và Đinh Thanh Bình (2010). Khảo sát tình hình ung thư trực tràng tại Bệnh viện Ung bướu từ 1/2006 - 12/2007. *Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 14(4):284-289.
 13. Quách Trọng Đức và Nguyễn Trường Kỳ (2015). Đặc điểm nội soi và mô bệnh học của ung thư đại trực tràng: nghiên cứu loạt ca trên 1.033 trường hợp. *Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 19(1):114-118.
 14. Hoàng Anh Vũ, Phùng Ngọc Thùy Linh, Đỗ Thị Thanh Thủy, Hứa Thị Ngọc Hà (2010) Xác định đột biến gen P53 trong carcinôm tuyến đại trực tràng bằng kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA. *Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 14(4):689-696.
 15. Hoàng Anh Vũ và Hứa Thị Ngọc Hà (2013) Phát hiện đột biến gen KRAS trong ung thư đại trực tràng bằng kỹ thuật COLD-PCR và giải trình tự DNA. *Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 17(3):51-55.
 16. Nguyễn Hồng Phong, Nguyễn Thanh Tuấn Minh, Huỳnh Quyết Thắng, Hoàng Anh Vũ, Ngô Quốc Đạt, Mai Văn Nhã, Võ Văn Kha và Hồ Long Hiến (2015). Đặc điểm đột biến gen KRAS, NRAS, BRAF và PIK3CA trong carcinôm tuyến đại trực tràng tại Bệnh viện Ung bướu Cần Thơ. *Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 19(5):171-178.

Ngày nhận bài báo:	01/12/2020
Ngày nhận phản biện nhận xét bài báo:	20/02/2021
Ngày bài báo được đăng:	10/03/2021