

ĐỘT BIẾN GEN Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ TẾ BÀO GAN BẰNG SINH THIẾT LỒNG SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ GIẢI TRÌNH TỰ THỂ HỆ MỚI

Nguyễn Văn Chủ¹, ✉, Trần Thị Thanh Hương¹, Đào Văn Tú¹, Kim Văn Vụ¹,
Phạm Thế Anh¹, Nguyễn Hoài Nghĩa², Giang Hoa³, Trần Lê Sơn⁴, Phan Minh Duy⁴,
Đỗ Ngọc Hiếu⁴, Phạm Thị Hân¹, Dương Minh Long¹, Bạch Thị Hoài Phương¹

¹ Bệnh viện K, ² Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

³ Viện Di truyền Y học, ⁴ Công ty cổ phần Giải pháp Gene

Hàm lượng ctDNA trên tổng số cfDNA trong bệnh nhân ung thư rất dao động, có thể trên 25% nhưng cũng có thể xuống thấp đến 0,01%. Với đặc tính không xâm nhập, đơn giản và độ chính xác cao, phương pháp phát hiện ctDNA trở nên đầy tiềm năng trong chẩn đoán sớm ung thư gan, khắc phục các giới hạn của những phương pháp phát hiện sớm đang được sử dụng hiện nay. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định các đột biến gen ở bệnh nhân ung thư gan bằng công nghệ NGS qua sinh thiết lỏng. Với 52 mẫu máu bệnh nhân ung thư gan và 108 mẫu máu của người khỏe mạnh được xét nghiệm ctDNA để phát hiện đột biến gen bằng NGS với bộ 8 gen. Trong 52 bệnh nhân ung thư gan, tỷ lệ phát hiện 36,5% trường hợp bị đột biến gen hoặc đơn thuần hoặc kết hợp với gen khác, đạt độ nhạy là 82,6% và độ đặc hiệu là 75,9%. Đột biến gen trong ung thư gan hoặc đơn thuần hoặc phối hợp với gen khác, với mức độ phổ biến từ TP53, PTEN, CTNNB1, STK11, CDKN2A đến các gen APC, ARID1A và BRAF.

Từ khóa: Ung thư gan, ctDNA, Đột biến gen, NGS.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

DNA ngoại bào mang đột biến ung thư (ctDNA - circulating tumor DNA) là cfDNA được phóng thích từ tế bào ung thư. Các ctDNA thường được phân biệt với các cfDNA từ tế bào bình thường dựa trên các đột biến sinh dưỡng (somatic mutation) hoặc epigenetics (thường là sự methyl hóa trên DNA) gây ung thư. Hàm lượng ctDNA trên tổng số cfDNA trong bệnh nhân ung thư rất biến động, có thể trên 25% nhưng cũng có thể xuống thấp đến 0,01% (nghĩa là cứ mỗi 10.000 phân tử cfDNA trong máu, chỉ có 1 phân tử ctDNA được phóng thích từ tế bào ung thư).^{1,2} Tỷ lệ này cũng được gọi là tần suất đột biến (MAF: mutation allele fraction).

MAF biến động phụ thuộc vào dạng ung thư và giai đoạn bệnh. Giai đoạn bệnh càng muộn, khối u càng lớn, ctDNA được phóng thích vào máu càng tăng. Hiện nay, những ứng dụng trên ctDNA có thể được chia làm 4 hướng chính: i) nhận dạng các đột biến trên ctDNA phục vụ điều trị đích; ii) đánh giá hiệu quả điều trị bằng định lượng ctDNA; iii) tiên lượng khả năng tái phát ung thư và iv) phát hiện ung thư giai đoạn sớm.

Sự phát triển của các kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (Next generation sequencing - NGS) cho phép xác định các đột biến gây ung thư trên cfDNA.³ Với đặc tính không xâm nhập, đơn giản và độ chính xác cao, phương pháp phát hiện ctDNA trở nên đầy tiềm năng trong chẩn đoán sớm ung thư gan, khắc phục các giới hạn của những phương pháp phát hiện sớm đang được sử dụng hiện nay. Chính vì lý do trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài

Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Chủ

Bệnh viện K

Email: chunv@bvk.org.vn

Ngày nhận: 16/10/2020

Ngày được chấp nhận:

này nhằm mục đích: “Xác định các đột biến gen ở bệnh nhân ung thư gan bằng công nghệ NGS qua sinh thiết lỏng”.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Gồm 52 bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan được khám và điều trị tại Bệnh viện K năm 2019 và nhóm chứng là 108 người khỏe mạnh.

Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng

- Được chẩn đoán xác định ung thư gan, trong đó giai đoạn III - IV < 50% tổng số ca.
- Không truyền máu trong vòng 3 tháng trước khi được thu nhận máu cho nghiên cứu.
- Chưa qua điều trị can thiệp.
- Có đầy đủ thông tin hành chính, tiền sử, giai đoạn bệnh, kết quả giải phẫu bệnh.
- Đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ

- Đã qua điều trị (phẫu thuật, hóa trị hoặc xạ trị).
- Ung thư di căn gan.
- Không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Phương pháp nghiên cứu: Quá trình giải trình tự được thực hiện trên hệ thống NGS Illumina tại độ phủ cao (>10.000X) để phát hiện biến đổi di truyền hiện diện với tần suất rất thấp trong huyết tương. Kết quả giải trình tự sẽ được phân tích bằng phần mềm của hãng Swift Bioscience.

Phương pháp thu thập số liệu:

- Nội dung 1: *Thu mẫu:* 10 ml máu ngoại vi từ 52 bệnh nhân ung thư và 108 người khỏe mạnh sẽ được thu nhận trong ống EDTA Vacutainer (Becton Dickinson) và giữ mát tại 4°C không

quá 6 giờ và tách lấy huyết tương.

- Nội dung 2: *Tách chiết cfDNA:* Bộ kit tách chiết MagMax cell-free DNA kit (ThermoFisher) được sử dụng để tách chiết cfDNA. cfDNA được tách chiết sẽ được định lượng bằng Quantus (Promega) và bộ kit QuantiFluor ONE dsDNA System (Promega); lượng cfDNA ≥ 5 ng để đảm bảo đủ lượng DNA cho bước chuẩn bị thư viện. Kích thước của cfDNA sẽ được kiểm tra bằng Bioanalyzer và bộ kit Bioanalyzer HS dsDNA kit (Agilent), kích thước cfDNA cần nằm trong khoảng 150-250 bp (là kích thước trung bình của các cfDNA trong huyết tương).

- Nội dung 3: *gắn mã xác định (UID) và tạo thư viện giải trình tự:* gắn mã xác định UID cho từng cfDNA và tạo thư viện (bao gồm việc gắn index, adaptor và PCR) sử dụng bộ kit Acel-NGS 2S Plus DNA library kit (Swift Biosciences). DNA được tinh sạch bằng AMPure XP beads (Beckman-Coulter). Sản phẩm của bước chuẩn bị thư viện phải có kích thước 300 – 400 bp (cfDNA được gắn với các adaptor và index) và có hàm lượng đạt ≥ 100 ng để đảm bảo đủ lượng DNA tối thiểu cần cho bước “lai - bắt giữ” kế tiếp.

- Nội dung 4: *thực hiện “lai - bắt giữ” (hybridization - capture) để làm giàu các phân mảnh cfDNA của 8 gen mục tiêu:* Sản phẩm PCR từ bước tạo thư viện sẽ được lai với hỗn hợp mẫu dò gắn biotin đặc hiệu cho 8 gen: *APC*, *CDKN2A*, *TP53*, *STK11 (LKB1)* (gen ức chế u), *ARID1A* (gen quy định cấu trúc nhiễm sắc thể), *BRAF*, *CTNNB1*, *PTEN* (con đường tín hiệu nội bào), sau đó sử dụng hạt từ Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (ThermoFisher) để bắt giữ các cfDNA của các gen trên thông qua tương tác streptavidin-biotin. Các cfDNA được làm giàu sẽ được nhân bản lần 2 bằng PCR với 8-14 chu kỳ. Phản ứng lai sử dụng bộ kit xGen Lockdown reagent (IDT). Các mẫu dò được thiết kế và tổng hợp bởi xGen panel (IDT). Nồng độ cfDNA

sau bước “lai-bắt giữ” phải đạt ít nhất 10 nM, là nồng độ DNA tối thiểu cần cho giải trình tự.

- Nội dung 5: *xác định ngưỡng phát hiện (tần suất đột biến - MAF) thấp nhất có thể phát hiện được* và độ lặp của qui trình sử dụng dòng tế bào HTC-15 mang đột biến đã biết trên các gen APC, TP53, PIK3CA, KRAS: DNA bộ gen (gDNA) được tách chiết từ mỗi dòng tế bào mang đột biến sẽ được phân cắt bằng NEBnext dsDNA fragmentase (NEB). Phản ứng cắt sẽ được tối ưu hóa thời gian và nồng độ enzyme để có được DNA với kích thước trong khoảng 150 - 250 bp, tương ứng với kích thước của cfDNA trong máu. gDNA sau khi được phân cắt sẽ được trộn với cfDNA được tách chiết từ huyết tương của bệnh nhân tại các nồng độ pha loãng: 1%, 0,1%, 0,05%, 0,001% để tạo nên những tần suất đột biến (MAF) khác nhau. Các DNA tại nồng độ pha loãng khác nhau sẽ được chuẩn bị thư viện với hàm lượng DNA đầu vào tương tự như hàm lượng trung bình của DNA ngoại bào tách chiết từ bệnh nhân ung thư. DNA sau khi được chuẩn bị thư viện sẽ tiến hành giải trình tự trên hệ thống NGS Illumina sử dụng bộ hóa chất NextSeq Mid output kit (150 cycles) tại các độ sâu >10.000X. Kết quả giải trình tự sẽ được phân tích bằng phần mềm tin-sinh học được cung cấp bởi Swift Biosciences, tóm tắt như sau:

Cặp trình tự (pair-end reads) được sắp xếp (align/map) lên trình tự bộ gen của người phiên bản số 19 (human genome version hg19) bằng phần mềm BWA. Những cặp trình tự sắp xếp duy nhất lên một vị trí trên bộ gen (uniquely mapped pair-end reads) sẽ được sử dụng để xác định đột biến di truyền.

Đột biến điểm và đột biến mất/thêm đoạn ngắn được xác định bằng quy trình tính toán VarScan 2 qua nhiều bước kiểm tra để tăng độ tin cậy của mỗi đột biến được tìm thấy.

Phần mềm phân tích Swift Bioscience được

sử dụng để nhận biết các cfDNA từ cùng một phân tử cfDNA ban đầu (do mang cùng mã xác định UID). Một đột biến là chính xác nếu hơn 90% cfDNA của cùng một dòng (clone) mang cùng đột biến này.

Đột biến chuyển đoạn và dung hợp đoạn được xác định bằng quy trình FACTERA qua các bước: 1) xác định những cặp trình tự sắp xếp bất hợp lý trên trình tự bộ gen người (discordant reads) - đây là những trình tự bao phủ vùng chuyển đoạn và dung hợp đoạn nên sẽ có chiều dài chèn bất thường, hay được sắp xếp trên 2 nhiễm sắc thể khác nhau, những cặp trình tự này được dùng xác lập những vùng gen có nhiều khả năng chuyển đoạn hay dung hợp đoạn; 2) xác định vị trí chuyển đoạn/dung hợp đoạn ở mức độ từng nucleotide - những vùng gen có nhiều khả năng chuyển đoạn hay dung hợp đoạn sẽ được xếp hạng dựa trên độ sâu tại vị trí chuyển đoạn hay dung hợp đoạn (tối thiểu là 2X), sau đó những cặp trình tự sắp xếp đúng ở gần những vùng này sẽ được sử dụng để xác định chính xác vị trí nucleotide mà hiện tượng chuyển đoạn/dung hợp đoạn đã xảy ra; 3) kiểm tra đột biến chuyển đoạn/dung hợp đoạn bằng phương pháp giả lập trên máy tính - tạo ra những trình tự giả lập ở từng đột biến chuyển đoạn/dung hợp đoạn và tái sắp xếp những cặp trình tự lên trình tự giả lập này để kiểm tra mức độ định vị của những cặp trình tự. Tỷ lệ định vị cao (quality alignment) thể hiện độ chính xác của việc xác định đột biến chuyển đoạn/dung hợp đoạn.

Tần suất của từng đột biến điểm và đột biến mất/thêm đoạn được tính toán dựa trên tỷ lệ từng loại nucleotide tại vị trí đột biến bằng phần mềm SAMtools.

Kết quả giải trình tự phải đạt các tiêu chuẩn sau: mật độ DNA trên flowcell phải đạt chuẩn: 160 - 220 k/mm², chất lượng giải trình tự với tiêu chuẩn Q30 (nghĩa là độ chính xác của giải

trình tự cho mỗi nucleotide là 99.9%) phải lớn hơn 90% và nhận dạng đầy đủ các đột biến đã biết của dòng tế bào HTC-15 và HCT116.

- Nội dung 6: Các biến thể được nhận biết sau bước phân tích dữ liệu được phân 3 lớp chính: biến thể gây bệnh (pathogenic variant), biến thể lành tính (benign variant) và biến thể chưa rõ chức năng (variant of uncertain significance), dựa trên 3 cơ sở dữ liệu lớn nhất, phổ biến nhất và đầy đủ thông tin biến thể nhất hiện nay trên thế giới, bao gồm: ClinVar, OMIM và HGMD. Một bệnh nhân được xem là dương tính với ctDNA khi mang đột biến gây bệnh hoặc gần giống gây bệnh trên một hoặc nhiều gen trong tập hợp 8 gen khảo sát.

Để đánh giá độ chính xác của việc phát hiện đột biến từ mẫu máu, kết quả giải trình tự cũng

được ngoại kiểm bằng phương pháp giải trình tự Sanger trên 10 mẫu được chọn ngẫu nhiên.

- Dựa trên kết quả phát hiện ctDNA trong bệnh nhân ung thư gan, độ nhạy và độ đặc hiệu của qui trình sẽ được xác định. Dựa trên các công bố gần đây (Phallen và cs), yêu cầu độ nhạy và độ đặc hiệu của nghiên cứu cần đạt như sau: độ nhạy > 70%, độ đặc hiệu > 95%.

3. Xử lý số liệu

Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 20.0. Tính độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự báo dương tính và âm tính.

4. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài được hội đồng khoa học và đạo đức của Bệnh viện K phê duyệt, theo số 4451/QĐ-BVK., ngày 24 tháng 12 năm 2019.

III. KẾT QUẢ

Bảng 1. Giá trị xét nghiệm đột biến của xét nghiệm các đột biến (ít nhất 1 đột biến/nhóm)

	Nhóm chứng	Ung thư	Σ	Se (95% CI)	Sp (95% CI)
Không đột biến	104 (96,3)	33 (63,5)	137 (85,6)		
Đột biến	4 (3,7)	19 (36,5)	23 (14,4)	82,6	75,9
Σ	108	52	160		

Trong 52 bệnh nhân ung thư gan, tỷ lệ phát hiện ít nhất 1 gen bị đột biến là 36,5% và có 3,7% người lành xác định đột biến gen bằng phương pháp sinh thiết lỏng

Bảng 2. Giá trị xét nghiệm đột biến bộ 8 gen

Đột biến gen	Lành (n = 108)	Ung thư (n = 52)	Tổng	Se (95% CI)	Sp (95% CI)
TP53	-	106(98,2)	44 (84,6)	80,0	70,6
	+	2(1,8)	8 (15,4)		
PTEN	-	108 (100,0)	46 (88,5)	100,0	70,1
	+	0	6 (11,5)		
STK11	-	108 (100,0)	50 (96,2)	100,0	68,4
	+	0	2 (3,8)		

Đột biến gen	Lành (n = 108)	Ung thư (n = 52)	Tổng	Se (95% CI)	Sp (95% CI)	
<i>APC</i>	-	108 (100,0)	51 (98,1)	159	100,0	67,9
	+	0	1 (1,9)	1		
<i>CDKN2A</i>	-	106 (98,2)	50 (96,2)	156	50,0	67,9
	+	2 (1,8)	2 (3,8)	4		
<i>ARID1A</i>	-	108 (100,0)	51 (98,1)	159	100,0	67,9
	+	0	1 (1,9)	1		
<i>CTNNB1</i>	-	108 (100,0)	48 (92,3)	156	100,0	69,2
	+	0	4 (7,7)	4		
<i>BRAF</i>	-	108 (100,0)	51 (98,1)	159	100,0	67,9
	+	0	1 (1,9)	1		

Trong 52 bệnh nhân ung thư gan, gen *TP53* bị đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất (15,4%), tiếp đến là gen *PTEN* (11,5%), gen *CTNNB1* là 7,7%, 2 gen *CDKN2A* và *STK11* đều chiếm 3,8% và các gen còn lại là *ARID1A*, *BRAF* và *APC* chỉ gặp 1 trường hợp (1,9%). Trong 4 người lành bị đột biến gen, 2 trường hợp đột biến gen *CDKN2A* và 2 gen *TP53*.

Bảng 3. Tỷ lệ các gen bị đột biến đơn thuần hoặc phối hợp

	<i>APC</i>	<i>ARID1A</i>	<i>BRAF</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>PTEN</i>	<i>STK11</i>	<i>TP53</i>	Σ
<i>APC</i>	1(5,3)								1
<i>ARID1A</i>		0							
<i>BRAF</i>			1(5,3)						1
<i>CDKN2A</i>		1(5,3)		0					1
<i>CTNNB1</i>					2(10,5)				2
<i>PTEN</i>				1(5,3)	1(5,3)	3(15,7)			5
<i>STK11</i>							0		
<i>TP53</i>					1(5,3)	1(5,3)	2(10,5)	5(26,2)	9
Σ	1	1	1	1	4	4	2	5	19

Trong 19 bệnh nhân ung thư bị đột biến gen, có 5 gen bị đột biến đơn thuần đó là *APC* (5,3%), *BRAF* (5,3%), *CTNNB1* (10,5%), *PTEN* (15,7%) và 5 ca bị đột biến gen *TP53* (26,2%). 6 ung thư gan có đột biến 2 gen phối hợp, trong đó gen *TP53* phối hợp với 3 gen khác nhau, gồm *STK11* (10,5%), *PTEN* (5,3%) và *CTNNB1* (5,3%), 3 trường hợp còn lại là sự kết hợp của đột biến gen *PTEN* - *CDKN2A* (5,3%), *PTEN* - *CTNNB1* (5,3%) và *CDKN2A* - *ARID1A* (5,3%). Ba gen không bị đột biến đơn thuần là *ARID1A*, *CDKN2A* và *STK11*.

Bảng 4. Số lượng các loại đột biến của các gen bị đột biến

Loại đột biến gen	TP53	PTEN	CTNNB1	CDKN2A	APC	STK11	ARID1A	BRAF
NC_000017.11:g.7673776G>A	1							
NC_000017.11:g.7673776G>C	1							
NC_000017.11:g.7674872T>C	1							
NC_000017.11:g.7674872T>G	1							
NC_000017.11:g.7675052C>T	1							
NM_001126112.2:c.536A>T (p.His179Leu)	2							
NC_000017.11:g.7675139C>G	1							
NM_000546.6:c.659A>G (p.Tyr220Cys)	1							
NM_001126112.2:c.473G>C (p.Arg158Pro)	1							
NM_001126112.2:c.747G>T (p.Arg249Ser)	2							
NC_000017.11:g.7675139C>T	1							
NM_001126112.2:c.814G>A (p.Val272Met)	1							
NM_001126112.2:c.820G>T (p.Val274Phe)	1							
NC_000010.11:g.87952116A>G		1						
NC_000010.11:g.87957918C>T		2						
NC_000010.11:g.87960905delT		2						
NM_000314.7:c.493-2A>G		1						
NM_000314.7:c.698G>A (p.Arg233Gln)		1						
NM_000314.7:c.700C>T (p.Arg234Trp)		2						
NM_000314.7:c.813del (p.His272fs)		2						
NC_000003.12:g.41224607A>C			1					
NC_000003.12:g.41224634C>A			1					

Loại đột biến gen	<i>TP53</i>	<i>PTEN</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>APC</i>	<i>STK11</i>	<i>ARID1A</i>	<i>BRAF</i>
NC_000003.12:g.41224634C>T			1					
NM_001904.4:c.110C>T (p.Ser37Phe)			1					
NM_001904.4:c.122C>A (p.Thr41Asn)			1					
NM_001904.4:c.133T>C (p.Ser45Pro)			1					
NC_000009.12:g.21974861C>A				1				
NC_000009.12:g.21974861C>G				1				
NC_000009.12:g.21974861C>T				2				
NM_000077.4:c.-34G>C				1				
NM_000077.4:c.-34G>T				1				
NC_000005.10:g.112780831T>A					1			
NC_000005.10:g.112780831T>C					1			
NM_000038.6:c.573T>A (p.Tyr191Ter)					1			
NM_000455.4:c.396C>A (p.Cys132Ter)						1		
NM_000455.4:c.841_842delCC (p.Pro281Alafs)						1		
NC_000001.11:g.26697516delG							1	
NC_000007.14:g.140734764C>T								1

Trong các gen bị đột biến, gen *TP53* có số loại đột biến cao nhất là 15, tiếp đến là gen *PTEN* có 11 loại đột biến, gen *CTNNB1* và *CDKN2A* đều chiếm 6 loại đột biến, gen *APC* có 3 loại đột biến, gen *STK11* có 2 loại đột biến và chỉ có 1 loại đột biến là gen *ARID1A* và *BRAF*.

IV. BÀN LUẬN

Hiện nay, những ứng dụng trên ctDNA có thể được chia làm 4 hướng chính: i) nhận dạng các đột biến trên ctDNA phục vụ điều trị đích; ii) đánh giá hiệu quả điều trị bằng định lượng ctDNA; iii) tiên lượng khả năng tái phát ung thư và iv) phát hiện ung thư giai đoạn sớm. ctDNA trở thành hướng đi đầy tiềm năng để phát hiện

sớm ung thư vì sự đơn giản, không xâm nhập và độ chính xác cao (do dựa trên đột biến gây ung thư). Để lựa chọn các gen khảo sát, chúng tôi dựa trên các gen có tần suất đột biến cao nhất trong ung thư gan và tổng 8 gen dựa trên vai trò và cơ chế tác động lên sự phát triển của ung thư gan được lựa chọn sẽ chiếm ít nhất

80% tổng tần suất đột biến xuất hiện trong ung thư gan.⁴ Trong 52 bệnh nhân ung thư gan, tỷ lệ phát hiện ít nhất đột biến gen là 36,5% bằng phương pháp sinh thiết lỏng với độ nhạy (Se) là 82,6% và độ đặc hiệu (Sp) là 75,9% (bảng 1). Khi xét tỷ lệ các gen bị đột biến đơn thuần hoặc phối hợp (bảng 2), trong 19 ca bị đột biến gen, có 5 gen bị đột biến đơn thuần đó là *APC* (5,3%), *BRAF* (5,3%), *CTNNB1* (10,5%), *PTEN* (15,7%) và 5 ca bị đột biến gen *TP53* (26,2%). Sáu ung thư gan có đột biến 2 gen phối hợp, trong đó gen *TP53* phối hợp với 3 gen khác nhau, gồm *STK11* (10,5%), *PTEN* (5,3%) và *CTNNB1* (5,3%), 3 trường hợp còn lại là sự kết hợp của đột biến gen *PTEN-CDKN2A* (5,3%), *PTEN-CTNNB1* (5,3%) và *CDKN2A-ARID1A* (5,3%). Ba gen không bị đột biến đơn thuần là *ARID1A*, *CDKN2A* và *STK11*. Trong 8 gen bị đột biến chỉ có gen *CDKN2A* đạt Se là 50,0% và gen *TP53* là 80,0%, các gen còn lại đều đạt 100%; gen *TP53* có Sp cao nhất là 70,6% tiếp đến là gen *PTEN* là 70,1%, gen *CTNNB1* là 69,2%, gen *STK11* là 68,4% và 4 gen còn lại có Sp thấp nhất đều là 67,9%. Trong 8 gen bị đột biến, bảng 4 cho thấy có tất cả 45 loại đột biến khác nhau, trong đó gen *TP53* có số loại đột biến cao nhất là 15, tiếp đến là gen *PTEN* có 11 loại đột biến, gen *CTNNB1* và *CDKN2A* đều chiếm 6 loại đột biến, gen *APC* có 3 loại đột biến, gen *STK11* có 2 loại đột biến và chỉ có 1 loại đột biến là gen *ARID1A* và *BRAF*.

Theo nghiên cứu của của Cohen và cộng sự,⁵ *TP53* và *CTNNB1* là hai gen có tần suất đột biến cao nhất (lần lượt là 59% và 18%) trong tổng số 44 mẫu ung thư gan giai đoạn I-III. Ngoài ra, những công bố gần đây cho thấy đột biến trong vùng điều hoà của gen *TERT* mã hoá cho telomerase reverse transcriptase rất phổ biến ở ung thư gan.^{6,7} Nault và cộng sự⁶ xác định 59% (179/305) các trường hợp ung thư gan mang đột biến trên gen này và là kiểu

đột biến thường gặp nhất. Tương ứng với kết quả của các nghiên cứu này, *TERT* cũng là gen chỉ thị có tần số đột biến cao thứ 3 (17%) từ kết quả của Cosmic.⁴

V. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu mẫu máu (ctDNA) của 52 ung thư gan và 108 người khỏe mạnh, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Có 36,5% bệnh nhân ung thư gan bị đột biến ít nhất 1 gen với Se là 82,6% và Sp là 75,9%.
- Trong 19 ca ung thư gan bị đột biến gen hoặc đơn thuần hoặc phối hợp với gen khác, với mức độ phổ biến từ *TP53*, *PTEN*, *CTNNB1*, *STK11*, *CDKN2A* đến các gen *APC*, *ARID1A* và *BRAF*, với độ nhạy từ 50 - 100% và độ đặc hiệu từ 67,9 đến 70,6%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bettegowda C, Sausen M, Leary R.J, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra224.
2. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors". *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102 (45):16368-16373.
3. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Ben Maad I.B, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2012;44(6):694-698.
4. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
5. Cohen J.D, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science.*

2018;359(6378):926-930.

6. Nault J. C, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat*

Commun. 2013;4:2218.

7. Totoki Y, Tatsuno K, Covington K.R, Ueda H, Creighton C.J, Kato M, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014;46(12):1267-1273.

Summary

GENETIC MUTATION IN PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA BY LIQUID BIOPSY USING THE NEW GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGY

The ctDNA content of the total cfDNA in cancer patients is very variable, it may be up 25% but it can also be as low as 0.01%. With simplicity, more exact and noninvasive characteristics, the ctDNA detection method has great potential in early diagnosis of liver cancer, overcoming the limits of currently used early screening stools. *Identification of genetic mutations in patients with liver cancer using NGS technology via ctDNA.* 52 patients with liver cancer and 108 healthy participants were tested for ctDNA to detect genetic mutations by NGS with panel 8 genes. In 52 patients with liver cancer, 36.5% of cases were detected the genetic mutation either alone or in combination with another gene, achieving sensitivity was 82.6% and specificity was 75.9%. Genetic mutation in liver cancer was either alone or in combination with another gene, with prevalence ranging from *TP53*, *PTEN*, *CTNNB1*, *STK11*, *CDKN2A* to *APC*, *ARID1A* and *BRAF*.

Keywords: Liver cancer, ctDNA, Gene mutation, NGS.