

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ THANH HƯƠNG

**NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN *CDH1* (E - CADHERIN)  
TRÊN BỆNH NHÂN UNG THƯ DẠ DÀY LAN TỎA DI TRUYỀN**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

----\*\*\*----

NGUYỄN THỊ THANH HƯƠNG

**NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN *CDH1* (E - CADHERIN)  
TRÊN BỆNH NHÂN UNG THƯ DẠ DÀY LAN TỎA DI TRUYỀN**

Chuyên ngành : Hóa sinh y học

Mã số : 62720112

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Đặng Thị Ngọc Dung

**HÀ NỘI - 2020**

## LỜI CẢM ƠN

*Trong suốt thời gian học tập và thực hiện luận án này tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, chỉ bảo tận tình của các cơ quan, đơn vị, Thầy cô, đồng nghiệp, bạn bè, bệnh nhân và gia đình thân yêu của mình.*

*Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc đến cô PGS. TS Đặng Thị Ngọc Dung, người thầy đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt cho tôi những kiến thức, phương pháp nghiên cứu khoa học vô cùng quý báu, là người luôn giúp đỡ, động viên và tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.*

*Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến:*

*- Ban Giám hiệu, phòng Quản lý và Đào tạo Sau đại học – Trường Đại học Y Hà Nội, Ban Giám đốc BV Phụ sản TW đã tạo điều kiện, giúp đỡ để tôi học tập và hoàn thành luận án.*

*- GS. TS Tạ Thành Văn, Hiệu trưởng, Trưởng bộ môn Hóa sinh – Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo điều kiện cho tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án.*

*- TS Nguyễn Thúy Hương, Bộ môn Giải phẫu bệnh – Trường Đại học Y Hà Nội đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi hoàn thành luận án.*

*- Tập thể cán bộ nhân viên khoa Sinh hóa – BV Phụ sản TW đã chia sẻ, động viên và tạo điều kiện cho tôi trong quá trình công tác và học tập.*

*- Tập thể cán bộ nhân viên Trung tâm Kiểm chuẩn chất lượng – Xét nghiệm Y học, các thầy cô bộ môn Hóa sinh trường Đại học Y Hà Nội đã giúp đỡ tôi trong suốt quá trình làm nghiên cứu.*

*- Các em học viên bác sĩ nội trú Hóa sinh: Trần Đức Anh, Ngô Diệu Hoa, Đặng Thị Nga, Lê Thị Yến, Hàn Thị Thanh Thủy đã giúp đỡ, đồng hành với tôi trong quá trình nghiên cứu.*

- Tôi xin được gửi lời cảm ơn đến các bệnh nhân cùng gia đình họ đã tin tưởng, giúp đỡ và hợp tác với tôi trong quá trình làm nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận án.

- Xin cảm ơn các bạn bè, đồng nghiệp đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, công tác và nghiên cứu.

- Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc, tình cảm yêu quý đến bố mẹ tôi, bố mẹ chồng, anh chị em trong gia đình đã luôn yêu thương, động viên và chia sẻ với tôi trong thời gian qua. Cảm ơn chồng và 2 con yêu quý, những người đã hi sinh rất nhiều cho sự nghiệp của tôi, là chỗ dựa vững chắc và cũng là động lực vô cùng to lớn để tôi hoàn thành nhiệm vụ.

Hà Nội, ngày      tháng      năm 2020

**Nguyễn Thị Thanh Hương**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Thị Thanh Hương, nghiên cứu sinh khóa 35, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa sinh Y học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của cô PGS.TS. Đặng Thị Ngọc Dung.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày tháng năm 2020*

**Người viết cam đoan**

**Nguyễn Thị Thanh Hương**

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Tên tiếng Anh</b>	<b>Tên tiếng Việt</b>
<b>AJCC</b>	American joint committee on cancer	Ủy ban ung thư Hoa Kỳ
<b>APC</b>	Adenomatous polyposis coli	
<b>CDH1</b>	Cadherin-1	
<b>EC</b>	Extracellular Cadherin	Tiểu phần ngoại bào
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor	Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì
<b>EMT</b>	Epithelial – mesenchymal transitions	Chuyển đổi biểu mô-trung mô
<b>GAPPS</b>		Ung thư tuyến dạ dày và hội chứng polyp đại tràng dạ dày
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Glycogen synthase kinase 3 $\beta$	
<b>GTT</b>		Giải trình tự
<b>HMMD</b>		Hóa mô miễn dịch
<b><i>H.Pylori</i></b>		Vi khuẩn <i>Helicobacter Pylori</i>
<b>IGCLC</b>	International Gastric Cancer Linkage Consortium	Hiệp hội liên kết ung thư dạ dày thế giới
<b>MLPA</b>	Multiplex ligation-dependent probe amplification	
<b>NST</b>		Nhiễm sắc thể
<b>Nu</b>	Nucleotide	
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
<b>SHPT</b>		Sinh học phân tử
<b>SIFT</b>	Sorting Intolerant from Tolerant	Thuật toán sắp xếp không dung nạp từ dung nạp sai
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphisms	Đa hình đơn nucleotide
<b>TNM</b>	Tumor – Nodes – Metastasis	Khối u nguyên phát - Hạch bạch huyết - Di căn
<b>UICC</b>	Union for international cancer control	Hiệp hội kiểm soát ung thư quốc tế
<b>UTBM</b>		Ung thư biểu mô
<b>UTDD</b>		Ung thư dạ dày
<b>WHO</b>	World Health Organization	Tổ chức y tế thế giới

# MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1: TỔNG QUAN.....</b>	<b>3</b>
1.1. Ung thư dạ dày lan tỏa di truyền.....	3
1.1.1. Lịch sử phát hiện và dịch tễ học .....	3
1.1.2. Các yếu tố nguy cơ.....	4
1.1.3. Đặc điểm lâm sàng.....	12
1.1.4. Giải phẫu bệnh.....	13
1.1.5. Chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa di truyền .....	17
1.1.6. Chẩn đoán giai đoạn ung thư dạ dày.....	18
1.1.7. Điều trị và tiên lượng .....	20
1.2. Vai trò của gen <i>CDH1</i> trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền.....	22
1.2.1. Cấu trúc và chức năng của gen <i>CDH1</i> .....	22
1.2.2. Cơ chế gây bệnh của gen <i>CDH1</i> trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền..	25
1.2.3. Đặc điểm di truyền của ung thư dạ dày lan tỏa di truyền.....	28
1.2.4. Tình hình nghiên cứu về ung thư dạ dày lan tỏa di truyền và đột biến gen <i>CDH1</i> ở trên thế giới và Việt Nam.....	30
1.2.5. Quản lý bệnh ung thư dạ dày lan tỏa di truyền do đột biến gen <i>CDH1</i> ...	32
1.3. Các phương pháp phát hiện đột biến gen <i>CDH1</i> .....	36
1.3.1. Khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR.....	37
1.3.2. Kỹ thuật giải trình tự gen theo phương pháp Sanger.....	37
1.3.3. Dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến gen <i>CDH1</i> bằng phần mềm phân tích tin sinh học.....	38
<b>Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>40</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu .....	40
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	41

2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	41
2.3.1. Thiết kế nghiên cứu: .....	41
2.3.2. Cỡ mẫu nghiên cứu .....	41
2.3.3. Phương pháp thu thập mẫu .....	42
2.3.4. Các biến số nghiên cứu .....	43
2.3.5. Sơ đồ nghiên cứu .....	45
2.3.6. Phương tiện nghiên cứu .....	46
2.3.7. Quy trình kỹ thuật phân tích đột biến gen <i>CDH1</i> .....	48
2.3.8. Thử nghiệm Clo-Test trong chẩn đoán nhiễm <i>H. Pylori</i> .....	51
2.3.9. Quy trình kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch .....	52
2.4. Xử lý và phân tích số liệu .....	53
2.5. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu .....	53
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>55</b>
3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu .....	55
3.1.1. Đặc điểm về tuổi, giới, tiền sử bệnh và yếu tố nguy cơ .....	55
3.1.2. Đặc điểm lâm sàng.....	58
3.1.3. Đặc điểm tổn thương dạ dày qua nội soi .....	60
3.1.4. Phân loại giai đoạn bệnh theo TNM .....	61
3.2. Kết quả phân tích gen <i>CDH1</i> của đối tượng nghiên cứu .....	61
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA và phản ứng PCR khuếch đại các exon của gen <i>CDH1</i> .....	61
3.2.2. Kết quả phát hiện đột biến và SNP của gen <i>CDH1</i> .....	62
3.2.3. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu mang đột biến và SNP trên gen <i>CDH1</i> .....	72



3.3. Xác định đột biến gen <i>CDH1</i> ở các thành viên trong gia đình bệnh nhân mang đột biến gen <i>CDH1</i> . .....	79
3.3.1. Phả hệ và kết quả phát hiện đột biến gen <i>CDH1</i> ở các thành viên trong gia đình. ....	79
3.3.2. Đặc điểm về phả hệ và các thành viên gia đình mang đột biến gen <i>CDH1</i> . ....	87
<b>Chương 4: BÀN LUẬN.....</b>	<b>91</b>
4.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu.....	91
4.2. Đột biến gen <i>CDH1</i> trên bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền. ....	101
4.3. Đột biến gen <i>CDH1</i> ở các thành viên trong gia đình bệnh nhân mang đột biến gen <i>CDH1</i> . ....	120
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>134</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Phân loại mô bệnh học ung thư biểu mô dạ dày của Tổ chức Y tế Thế giới năm 2010 và so sánh với phân loại Lauren .....	15
Bảng 1.2.	Phân loại TNM trong ung thư dạ dày theo AJCC 8th 2017.....	19
Bảng 1.3.	Phân loại giai đoạn bệnh UTDD theo TNM .....	20
Bảng 1.4.	Ý nghĩa của các phương pháp đánh giá đột biến gen <i>CDH1</i> .....	37
Bảng 2.1.	Thành phần phản ứng PCR.....	49
Bảng 2.2.	Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR .....	49
Bảng 2.3.	Thành phần phản ứng PCR cho giải trình tự.....	50
Bảng 2.4.	Chu trình nhiệt phản ứng PCR cho giải trình tự .....	50
Bảng 2.5.	Quy trình xử lý tiêu bản hóa mô miễn dịch.....	52
Bảng 3.1.	Phân loại đối tượng nghiên cứu theo tiêu chuẩn IGCLC 2015...	55
Bảng 3.2.	Phân bố tuổi và giới của bệnh nhân tham gia nghiên cứu.....	56
Bảng 3.3.	Mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh với giới tính.....	56
Bảng 3.4.	Tiền sử cá nhân, gia đình và một số yếu tố nguy cơ .....	57
Bảng 3.5.	Lý do vào viện của đối tượng nghiên cứu.....	58
Bảng 3.6.	Thời gian xuất hiện triệu chứng đầu tiên đến khi vào viện.....	59
Bảng 3.7.	Đặc điểm tổn thương dạ dày qua nội soi.....	60
Bảng 3.8.	Phân loại giai đoạn bệnh theo TNM.....	61
Bảng 3.9.	Các SNP được tìm thấy trong nghiên cứu.....	63
Bảng 3.10.	Đột biến và SNP của gen <i>CDH1</i> tìm được ở 4 bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền .....	64
Bảng 3.11.	Dự đoán khả năng gây bệnh của các đột biến sai nghĩa.....	70
Bảng 3.12.	Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân mang đột biến gen <i>CDH1</i> ....	73
Bảng 3.13.	Đặc điểm nội soi và mô bệnh học của bệnh nhân mang đột biến	74
Bảng 3.14.	Phân bố SNP trên các bệnh nhân tham gia nghiên cứu.....	77

Bảng 3.15. Đặc điểm lâm sàng và một số yếu tố nguy cơ.....	77
Bảng 3.16. Đặc điểm của phả hệ mang đột biến gen trong nghiên cứu .....	87
Bảng 3.17. Tỷ lệ mang đột biến gen <i>CDH1</i> trong phả hệ gia đình .....	88
Bảng 3.18. Đặc điểm nội soi và mô bệnh học của các thành viên gia đình mang đột biến gen <i>CDH1</i> .....	89

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	(A) Ung thư biểu mô tế bào nhẵn tại chỗ: tuyến với màng nền còn nguyên vẹn được lột bởi các tế bào hình nhẵn. (B) Sự xâm nhập của các tế bào hình nhẵn bên dưới biểu mô (đầu mũi tên). (C) Ung thư biểu mô tế bào nhẵn xâm lấn giai đoạn T1a.....	16
Hình 1.2.	Hình ảnh gen <i>CDH1</i> nằm trên nhánh dài NST 16, gồm 16 exon mã hóa cho các vùng protein tương ứng .....	23
Hình 1.3.	Vị trí của E-cadherin và vai trò trong kết dính tế bào.....	24
Hình 1.4.	Các con đường sinh ung thư liên quan đến E-cadherin .....	25
Hình 1.5.	Phức hợp cadherin-catenin và protein APC. ....	26
Hình 1.6.	Con đường Rho-GTPase .....	27
Hình 1.7.	Sơ đồ phả hệ .....	29
Hình 1.8.	Vị trí và phân loại các dạng đột biến gen <i>CDH1</i> trong UTDD lan tỏa di truyền đã được công bố .....	30
Hình 3.1.	Kết quả PCR exon 9 (A) và exon 13 (B) của gen <i>CDH1</i> , (-): chứng âm, (+): chứng dương, M: ladder thang chuẩn 100 bp...	62
Hình 3.2.	Kết quả giải trình tự đoạn gen mang đột biến. ....	65
Hình 3.3.	Kết quả giải trình tự đoạn gen mang đột biến. ....	66
Hình 3.4.	Kết quả giải trình tự đoạn gen mang đột biến .....	67
Hình 3.5.	Kết quả giải trình tự đoạn gen mang đột biến. ....	68
Hình 3.6.	Phân bố đột biến và SNP trên gen <i>CDH1</i> .....	69
Hình 3.7.	Hình ảnh minh họa sử dụng công cụ Polyphen 2 trong dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến sai nghĩa.....	71
Hình 3.8.	Hình ảnh minh họa sử dụng công cụ Mutation Taster xác định khả năng gây bệnh của đột biến .....	72
Hình 3.9.	Ảnh vi thể UTDD thể lan tỏa của bệnh nhân B4 .....	75

Hình 3.10.	Ảnh vi thể UTDD thể lan tỏa của bệnh nhân B732 .....	75
Hình 3.11.	Ảnh vi thể UTDD thể lan tỏa bệnh nhân B532.....	76
Hình 3.12.	Ảnh vi thể UTDD thể lan tỏa của bệnh nhân B151 .....	76
Hình 3.13.	Phả hệ và kết quả phân tích gen <i>CDHI</i> của gia đình bệnh nhân B4..	79
Hình 3.14.	Hình ảnh giải trình tự gen <i>CDHI</i> tại vị trí mang đột biến của thành viên gia đình B4.....	80
Hình 3.15.	Phả hệ và kết quả phân tích gen <i>CDHI</i> của gia đình bệnh nhân B732 ...	81
Hình 3.16.	Hình ảnh giải trình tự gen <i>CDHI</i> của thành viên gia đình B732 mang đột biến. ....	82
Hình 3.17.	Phả hệ và kết quả phân tích gen <i>CDHI</i> của gia đình bệnh nhân B15183	
Hình 3.18.	Hình ảnh giải trình tự gen <i>CDHI</i> của thành viên gia đình B151 mang đột biến .....	84
Hình 3.19.	Phả hệ và kết quả phân tích gen <i>CDHI</i> của gia đình bệnh nhân B532....	85
Hình 3.20.	Hình ảnh giải trình tự gen <i>CDHI</i> của thành viên gia đình B532 mang đột biến .....	86
Hình 4.1.	Bản đồ phân bố các đột biến trên gen <i>CDHI</i> .....	104

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư dạ dày (UTDD) là loại ung thư thường gặp, có ảnh hưởng to lớn đến sức khỏe cộng đồng. Theo thống kê của Globocan 2018, thì UTDD là loại ung thư phổ biến thứ 5 và là nguyên nhân gây tử vong thứ 3 ở cả hai giới [1]. Hầu hết UTDD là không di truyền, tuy nhiên khoảng 10% các trường hợp UTDD có tính chất gia đình, trong đó UTDD lan tỏa di truyền chiếm 1-3% [2]

Ung thư dạ dày lan tỏa di truyền là bệnh lý di truyền hiếm gặp, đặc trưng bởi mô bệnh học là những tế bào ung thư kém biệt hóa, xâm lấn lan tỏa ở lớp dưới niêm mạc nên khó phát hiện sớm. Biểu hiện lâm sàng trong UTDD lan tỏa di truyền là bệnh thường khởi phát khi tuổi còn trẻ (tuổi trung bình phát hiện là 38), tiến triển nhanh, tiên lượng xấu và tỷ lệ tử vong cao, tuy nhiên nếu phát hiện bệnh ở giai đoạn sớm thì tỷ lệ sống trên 5 năm có thể tăng lên 90% [3].

Trong cơ chế bệnh sinh của UTDD lan tỏa thì việc kiểm soát độ bám dính và tính di động của tế bào là một trong những yếu tố quan trọng trong quá trình tạo thành và tiến triển của khối u. Gen *CDH1* quy định tổng hợp protein E-cadherin có vai trò quan trọng trong việc bám dính và liên kết tế bào phụ thuộc canxi, duy trì sự phân hóa và kiến trúc bình thường của biểu mô [4]. Khi xảy ra đột biến trên gen *CDH1*, dẫn đến suy giảm chức năng của E-cadherin làm giảm khả năng bám dính tế bào, gây nên hình thái bất thường về cấu trúc biểu mô và mất phân cực tế bào. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc mất sự bám dính giữa các tế bào với tế bào là điều kiện tiên quyết dẫn đến sự xâm lấn và di căn của tế bào ung thư [5]. Đột biến gen *CDH1* được phát hiện đầu tiên vào năm 1998 bởi Guilford, thông qua phân tích đột biến ở các thành viên mắc UTDD lan tỏa khởi phát sớm trong 3 gia đình người Maori (New Zealand) [6]. Mặc dù, đã có một vài nghiên

cứu trên thế giới về một số gen có liên quan đến UTDD lan tỏa di truyền như *CTNNA1*, *BRCA2*, *MAP3K6*...tuy nhiên, vai trò của các đột biến gen nói trên vẫn chưa chắc chắn vì số lượng mẫu nghiên cứu không đủ để xác định mức độ phổ biến và mức độ thâm nhập của gen [7]. Tỷ lệ phát hiện đột biến của gen *CDH1* chiếm 30 – 40% trong các gia đình chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền [6]. Vì vậy, việc xác định đột biến gen trong UTDD lan tỏa di truyền hiện được giới hạn ở gen *CDH1*.

Đặc điểm di truyền của bệnh là theo cơ chế di truyền gen trội trên nhiễm sắc thể thường, do đó một cá thể trong gia đình có bố hoặc mẹ mang đột biến gen thì có 50% cơ hội nhận được đột biến gen từ bố hoặc mẹ. Vì vậy, việc sàng lọc và phát hiện sớm các thành viên gia đình của bệnh nhân mang đột biến gen *CDH1* nhưng chưa biểu hiện bệnh là rất cần thiết. Từ đó, có biện pháp phòng bệnh và đưa ra những can thiệp điều trị sớm hiệu quả. Tại Việt Nam, nghiên cứu về đột biến gen *CDH1* ở các bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền, cũng như xác định đột biến ở các thành viên gia đình có nguy cơ cao vẫn còn mới mẻ. Với những lý do trên đề tài “*Nghiên cứu đột biến gen CDH1 (E-cadherin) trên bệnh nhân ung thư dạ dày lan tỏa di truyền*” được thực hiện với 2 mục tiêu:

- 1. Phân tích đột biến gen *CDH1* và đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trên bệnh nhân ung thư dạ dày lan tỏa di truyền.**
- 2. Xác định đột biến gen *CDH1* ở các thành viên trong gia đình bệnh nhân ung thư dạ dày lan tỏa di truyền mang đột biến gen *CDH1*.**

## Chương 1

### TỔNG QUAN

#### 1.1. Ung thư dạ dày lan tỏa di truyền

##### 1.1.1. Lịch sử phát hiện và dịch tễ học

Hiệp hội tiêu hóa của Mỹ đã báo cáo vào năm 1994 về một gia đình có 8 thành viên bị UTDD xảy ra ở lứa tuổi từ 31 – 65 tuổi, trong vòng 4 thế hệ [8]. Gia đình có một cặp sinh đôi giống nhau, cả hai đều bị chết vì UTDD. Kết quả giải phẫu bệnh của 3 thành viên trong gia đình đều thấy các tế bào ung thư hình nhẫn trong niêm mạc dạ dày. Đây là một báo cáo về gia đình có các thành viên bị UTDD, nhưng cơ sở di truyền của hiện tượng này vẫn chưa được biết rõ vào thời điểm đó.

Năm 1998, Guilford và cộng sự đã xác định đột biến gen *CDH1* là nguyên nhân chủ yếu gây ra ung thư dạ dày lan tỏa di truyền [9]. Nghiên cứu được thực hiện trong ba gia đình người Maori ở New Zealand, với nhiều trường hợp khởi phát ung thư dạ dày sớm, đa thế hệ. Phân tích di truyền cho thấy có sự liên quan đáng kể với E-cadherin, một protein mã hoá bởi gen *CDH1*, có vai trò quan trọng trong việc bám dính của tế bào và duy trì sự toàn vẹn của biểu mô. Phát hiện này đã giúp xác định đột biến gen *CDH1* trong các gia đình có nhiều thành viên bị UTDD lan tỏa [10]. Một nghiên cứu được thực hiện trên 6 gia đình bị chi phối bởi ung thư dạ dày lan tỏa và ung thư vú thùy. Các đột biến dị hợp được tìm thấy trong gen *CDH1* và phân bố rải rác trên khắp cả gen. Các bệnh nhân bị đột biến gen *CDH1* thường không có triệu chứng cho đến thời điểm chẩn đoán, do các tế bào ung thư phát triển âm thầm dưới niêm mạc dạ dày, và không hình thành khối u nên rất khó phát hiện sớm, khi được chẩn đoán thường là đã muộn [10].

Khoảng 10 – 30% các trường hợp UTDD cho thấy có tính chất gia đình, nhưng chỉ có 1 – 3% gây ra bởi hội chứng ung thư dạ dày lan tỏa di truyền



[11] . Trong một bài đánh giá trên 439 gia đình có người mắc UTDD, đột biến gen *CDH1* được ưu tiên quan sát thấy trong các gia đình có đầy đủ tiêu chuẩn lâm sàng của UTDD lan tỏa di truyền chiếm 36,4% [12] . Trong ung thư dạ dày gia đình, thì tần số đột biến dòng mầm gen *CDH1* thấp hơn nhiều (12,5%) [12] . Đột biến gen *CDH1* chưa được tìm thấy trong các gia đình không có tiền sử UTDD. Tuy nhiên, tỷ lệ đột biến lên đến 10% đã được mô tả ở các cá nhân không có tiền sử gia đình nhưng được chẩn đoán bệnh ở độ tuổi < 35 tuổi, từ các quần thể với tỷ lệ thấp của UTDD [13] .

Không phải tất cả những ai mang đột biến gen *CDH1* cũng phát triển thành ung thư dạ dày lan tỏa di truyền. Ở những người có đột biến gen *CDH1*, nguy cơ mắc UTDD lan tỏa được ước tính là 67 – 70% ở nam giới và 56 – 83% đối với nữ giới ở độ tuổi 80 [14] . Nguy cơ tích lũy ung thư vú ở nữ giới có đột biến gen *CDH1* khoảng 39 – 52% sau 80 tuổi [14] .

Một điều lưu ý khác là có sự tương quan nghịch giữa tần số đột biến gen *CDH1* và tỉ lệ mắc UTDD. Cụ thể, tại các nước có tỷ lệ UTDD thấp, thì tần số đột biến gen ở những gia đình UTDD lan tỏa di truyền là >40%, trong khi ở những nước có tỷ lệ trung bình hoặc cao của bệnh UTDD thì tỷ lệ đột biến gen *CDH1* là khoảng 20% [15] . Mặc dù tỷ lệ mắc bệnh UTDD cao hơn ở Nhật Bản, Hàn Quốc, nhưng tỷ lệ mắc UTDD lan tỏa di truyền ở các nước này lại thấp hơn, hầu hết đột biến gen *CDH1* lại được phát hiện nhiều trong quần thể người châu Âu và châu Mỹ. Có thể nhận định tỷ lệ mắc UTDD ở mức trung bình và cao ở các nước này có sự liên quan với các yếu tố nguy cơ về môi trường (lối sống, chế độ ăn uống), còn các yếu tố di truyền chỉ đóng góp một phần nhỏ.

### **1.1.2. Các yếu tố nguy cơ**

Cơ chế bệnh sinh của UTDD là một quá trình phức tạp do nhiều yếu tố gây nên. Đó là sự kết hợp của các yếu tố có nguồn gốc từ môi trường và những biến đổi về gen và di truyền. Các yếu tố có nguồn gốc môi trường được nghiên cứu nhiều nhất là tình trạng nhiễm *H.pylori*, hút thuốc lá, uống rượu

và chế độ ăn uống. Trong những năm gần đây khi những hiểu biết về cơ chế bệnh sinh của UTDD ở mức độ phân tử ngày càng được mở rộng. Các kết quả nghiên cứu đều chỉ ra những biến đổi di truyền là nguyên nhân sự phát triển của UTDD trong đó nổi bật nhất là UTDD lan tỏa di truyền, tuy nhiên quá trình này diễn ra rất phức tạp và còn nhiều khoảng trống trong hiểu biết của con người. Nghiên cứu các biến đổi ở cấp độ phân tử hứa hẹn cho việc phát triển các dấu ấn trong chẩn đoán, điều trị, tiên lượng, phòng bệnh UTDD nói chung và UTDD lan tỏa di truyền nói riêng.

#### *1.1.2.1. Các yếu tố có nguồn gốc môi trường*

##### **❖ Lối sống và chế độ ăn uống**

- Hút thuốc lá: Hút thuốc lá được cho là yếu tố nguy cơ của nhiều loại ung thư trong đó có UTDD. Hút thuốc làm tăng nguy cơ UTDD lên 1,56 lần [16]. Theo Gonzalez, có xấp xỉ 18% trường hợp UTDD được quy cho hút thuốc lá. Nguy cơ UTDD tăng theo thời gian hút thuốc và giảm đi sau 10 năm cai thuốc [17]. Trong nghiên cứu tổng hợp của Ladeiras (2008), về mối quan hệ giữa hút thuốc và ung thư dạ dày đã cho thấy có mối liên quan về hành vi hút thuốc và liều lượng sử dụng thuốc lá mỗi ngày [18].

Đã có nhiều giả thuyết về cơ chế của tình trạng hút thuốc lá làm tăng nguy cơ mắc UTDD. Một số nghiên cứu đưa ra giả định về việc tạo gốc tự do và thúc đẩy quá trình chết theo chương trình của tế bào do hút thuốc, điều đó gây ra các biến đổi tiền ung thư của niêm mạc dạ dày [19]. Hút thuốc lá làm tăng nguy cơ loạn sản và dị sản ruột là các tổn thương tiền ung thư [20].

Hút thuốc lá làm tăng nguy cơ mắc UTDD thể ruột cao hơn thể lan tỏa và vị trí ở tâm vị cao hơn so với không tâm vị. Nghiên cứu của Sasazuki (2002) đã cho thấy có mối liên quan giữa hút thuốc lá với UTDD thể ruột và vị trí không tâm vị [21]. Tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu về tác động của hút thuốc lá trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền.

- Uống rượu: Môi liên quan giữa sử dụng rượu với UTDD đã được đề cập đến trong nhiều nghiên cứu dịch tễ học với kết quả không nhất quán. Trong nghiên cứu của Duell (2011), trên 444 trường hợp ung thư biểu mô dạ dày nguyên phát đã cho thấy có môi liên quan giữa tiêu thụ nhiều rượu (>60g/ngày) làm tăng nguy cơ mắc ung thư dạ dày 1,6 lần so với người không sử dụng rượu [22]. Một số nghiên cứu khác cho rằng không có môi liên quan giữa việc tiêu thụ rượu với nguy cơ mắc ung thư dạ dày [23], [24]. Nghiên cứu của Hansson (1994) [23], và nghiên cứu của Sjodahl (2007) [25] đều cho thấy uống rượu kết hợp với hút thuốc lá làm tăng nguy cơ ung thư dạ dày, và uống rượu có xu hướng làm tăng nguy cơ sử dụng thuốc lá.

- Chế độ ăn uống: Bài tổng quan của tác giả Wang cho thấy có một môi tương quan mạnh mẽ giữa lượng muối tiêu thụ với tỷ lệ UTDD [26]. Nghiên cứu đánh giá môi tương quan giữa lượng muối và natri niệu 24 giờ với tỷ lệ tử vong do UTDD ở nam giới trong 5 vùng địa lý của Nhật Bản, cho thấy một môi tương quan chặt chẽ giữa tỷ lệ tử vong do UTDD và bài tiết muối [27]. Một nghiên cứu khác của Nhật Bản được thực hiện bằng bảng câu hỏi về tần suất ăn uống của 38 loại thực phẩm cho 634 nam và vợ của 373 người trong số này ở 6 thành phố của Nhật Bản, hệ số tương quan giữa tử vong do ung thư dạ dày với lượng tiêu thụ rau muối là 0,36 [28]. Môi quan hệ này cũng hợp lý về mặt sinh học, vì nồng độ muối cao có thể làm tổn thương lớp niêm mạc bảo vệ của dạ dày. Thức ăn nhiều nitrate như các loại cá, thịt chế biến sẵn, các loại thức ăn xông khói cũng làm tăng nguy cơ UTDD [29]. Ngược lại, ăn nhiều rau xanh, trái cây, vitamin C có thể làm giảm nguy cơ mắc UTDD. Những bằng chứng này đã nhấn mạnh tầm quan trọng của chế độ ăn uống trong UTDD. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của chế độ ăn đối với UTDD lan tỏa di truyền.

### ❖ **Trực khuẩn *Helicobacter Pylori***

Vào năm 1983, Marshall và Warren đã phân lập được trực khuẩn *Helicobacter Pylori* (*H. pylori*) từ các mảnh sinh thiết biểu mô dạ dày. *H. pylori* là tác nhân quan trọng nhất, gặp trong 90% bệnh nhân UTDD [30]. *H. pylori* có khả năng thích nghi đặc biệt để sống trong môi trường acid dạ dày, sự cư trú của *H. pylori* thể làm tổn thương niêm mạc, viêm niêm mạc dạ dày và sau đó gây dị sản, loạn sản và ung thư. Tuy nhiên, có một điều đặc biệt là tỷ lệ UTDD tương đối thấp ở các nước châu Phi mặc dù tỷ lệ nhiễm *H. pylori* ở đây lại rất cao [31]. Nghiên cứu sau đó chỉ ra việc đồng nhiễm cả giun sán và *H. pylori* đã chuyển đáp ứng của hệ miễn dịch từ tế bào T helper 1 sang T helper 2 là dạng ít gây tổn thương hơn và giải thích một phần cho hiện tượng này [32]. Hút thuốc lá cũng làm tăng tác dụng gây ung thư của vi khuẩn *H. pylori* [33].

Trong ung thư dạ dày thể lan tỏa thì vai trò của *H. pylori* vẫn còn gây nhiều tranh cãi, vì từ khi có phác đồ điều trị vi khuẩn *H. pylori* tỷ lệ mắc UTDD đã giảm. Tuy nhiên, tỷ lệ mắc ung thư dạ dày thể lan tỏa vẫn giữ nguyên hoặc tăng ở châu Á, Hoa Kỳ và châu Âu chiếm 35 – 45% trường hợp UTDD trong các nghiên cứu gần đây [34]. Tỷ lệ mắc bệnh tăng gấp 10 lần từ năm 1970 đến năm 2000 [35]. Do đó, vai trò của các yếu tố nguy cơ trong ung thư dạ dày thể lan tỏa cần được nghiên cứu thêm.

#### 1.1.2.2. *Biến đổi về gen và di truyền trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền*

### ❖ **Đột biến gen**

Ung thư dạ dày có tính chất gia đình chiếm khoảng 10%, nhưng chỉ 1 – 3% là UTDD lan tỏa di truyền. Đột biến gen *CDH1* đã được chứng minh là nguyên nhân chính gây bệnh ung thư dạ dày lan tỏa di truyền. Tỷ lệ phát hiện đột biến gen *CDH1* chiếm 30 – 40% trong các gia đình được chẩn đoán là ung thư dạ dày lan tỏa di truyền [6], do đó khoảng 60% các trường hợp UTDD lan tỏa di truyền còn lại nguyên nhân vẫn chưa được biết rõ. Đã có một vài

ngiên cứu trên thế giới về một số gen có liên quan đến UTDD lan tỏa di truyền như *CTNNA1*, *CTNNB1*, *BRCA2*, *MAP3K6*.

Có ba gia đình đáp ứng các tiêu chí trong chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền đã được mô tả mang đột biến gen *CTNNA1* [14] , [36] . Các gia đình này có các biểu hiện về lâm sàng tương tự như các gia đình mang đột biến gen *CDH1*, nhưng không có nhiều dữ liệu để đưa ra mức độ thâm nhập của gen *CTNNA1* với bệnh UTDD lan tỏa di truyền [36] . Majewski và cộng sự, đã phát hiện ra đột biến gen  $\alpha$ -E-catenin (*CTNNA1*) có mặt ở hai thành viên trong một gia đình có 6 thành viên bị ung thư dạ dày lan tỏa di truyền [37] . Với các thành viên khác trong gia đình catenin (*CTNNB1*, *CTNND1* và *JUP*), các nhà khoa học vẫn chưa tìm thấy đột biến nào có ý nghĩa. Ngoài ra một số gia đình khác cũng đã được mô tả với đột biến ở các gen *BRCA2*, *PALB2* và *MAP3K6* [14] , [38] . Đột biến gen *MAP3K6* mới được mô tả gần đây, do đó cần tìm hiểu thêm về các gia đình có đột biến gen này trước khi được dùng để xét nghiệm di truyền, nếu có ít trường hợp dương tính thì khó đánh giá được khả năng gây bệnh của gen đó. Tầm quan trọng của các đột biến gen nói trên là không chắc chắn vì số lượng mẫu nghiên cứu không đủ để xác định mức độ phổ biến và mức độ xâm nhập [7] . Vì vậy, xét nghiệm di truyền trong UTDD lan tỏa di truyền hiện được giới hạn ở gen *CDH1*.

#### ❖ **Biến đổi ngoài gen**

Di truyền ngoại sinh là sự biến đổi trong biểu hiện gen, sự biến đổi này không phải do những biến đổi trình tự base trên DNA, nó bao gồm sự methyl hóa DNA, biến đổi histone... Trong di truyền ngoại sinh thì methyl hóa DNA được nghiên cứu nhiều nhất.

Methyl hóa là sự gắn nhóm methyl vào vị trí C thứ 5 ở cytosine của vòng pyrimidine nhờ enzyme methyl transferase. Có 3 dạng methyl hóa DNA khác nhau được biết đến liên quan tới ung thư đó là: sự giảm methyl hóa, tăng cường methyl hóa và sự mất đi dấu ấn gen.

Sự tăng cường methyl hóa DNA lại xảy ra ở các vị trí điều hòa đặc hiệu ở các vùng promoter, dẫn tới sự ngăn cản quá trình phiên mã từ đó gây bất hoạt gen. Có nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng sự tăng cường methyl hóa ở vùng promoter của gen *CDHI* là cơ chế phân tử thứ hai kết hợp với đột biến gen *CDHI* dẫn đến ung thư dạ dày lan tỏa di truyền [39]. Sự methyl hóa DNA có thể phát hiện được các DNA bắt nguồn từ mẫu mô, mẫu phân hoặc dịch cơ thể.

Vì vậy, nếu các phương pháp nghiên cứu sự methyl hóa DNA được tối ưu về độ nhạy và độ đặc hiệu của nó sẽ giúp xác định chính xác những khác biệt trong tình trạng methyl hóa DNA giữa bệnh nhân ung thư và người bình thường, và cho thấy rằng đây có thể là một công cụ giúp cho việc phát hiện sớm bệnh và là một chỉ thị để tầm soát cho UTDD lan tỏa di truyền.

Trong nghiên cứu của Grady và cộng sự (2000), tiến hành nghiên cứu trên 2 gia đình được chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền, trong đó đã nghiên cứu về tình trạng methyl hóa của 6 người, 3 trong 6 người có sự tăng cường methyl hóa ở vùng promoter. Đồng thời, ở những bệnh nhân không có đột biến gen *CDHI* cũng không có tình trạng tăng cường methyl hóa [39].

#### ❖ Đa hình đơn nucleotid (SNP)

Sự khác biệt cho mỗi cá thể được tạo bởi tính đa hình của các gen, hiện tượng đa hình đơn nucleotid (SNP) là sự khác nhau giữa các cá thể của một loài hay giữa các cặp NST của một người. Giống nhau giữa các cá thể lên đến trên 90% và khoảng 1% sự khác biệt chủ yếu biểu hiện bởi các SNP [40]. Đa hình nucleotid đơn là một hiện tượng phổ biến, được coi là hậu quả của đột biến điểm thay thế một cặp nucleotid, tần số xuất hiện > 1% trong quần thể [40]. Hiện tượng đa hình nucleotid đơn có thể xảy ra ở vùng mã hóa (exon) và vùng không mã hóa (intron). Có những SNP làm thay đổi acid amin dẫn đến có thể ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein, có những SNP mặc dù thay đổi nucleotid nhưng lại không làm thay đổi acid amin. Tuy nhiên nếu những SNP đó nằm trên vùng có chức năng quan trọng thì cũng có thể

gây ra các ảnh hưởng đến chức năng của gen đó. Ứng dụng lớn nhất của SNP là so sánh vùng gen giữa các nhóm người với nhau (ví dụ như nhóm bị bệnh và không bị bệnh), xác định mối liên quan giữa SNP với sự hình thành và phát triển của bệnh. Để từ đó tiến hành sàng lọc, tư vấn di truyền cho những cá nhân có nguy cơ mắc bệnh cao.

Đã có nhiều nghiên cứu về mối liên quan giữa đa hình đơn nucleotid trong gen *CDH1* với tính nhạy cảm của UTDD nói chung và UTDD lan tỏa nói riêng. Chu và cộng sự (2014), đã nghiên cứu về SNP của gen *CDH1* trong 3 nhóm bệnh nhân là UTDD thể lan tỏa, UTDD thể ruột và nhóm chứng. Kết quả cho thấy so với nhóm chứng thì tần số alen của SNP -160C>A (rs16260) cao hơn đáng kể trong các trường hợp UTDD lan tỏa, nhưng không có sự khác biệt với UTDD thể ruột. Khi kết hợp ba đa hình trên một bệnh nhân (-160C>A, 48+6T>C, 2076C>T và -160C>A, 1937-13T>C, 2253C>T) thì có liên quan đến nguy cơ mắc UTDD lan tỏa ( $p=0,011$  và  $p=0,042$  tương ứng) [41]. Humar và cộng sự, đã đưa ra bằng chứng khi kết hợp từ ba đa hình trên một bệnh nhân (-160C>A, 48+6T>C, 2076C>T) có liên quan đến UTDD lan tỏa và cho rằng haplotype ATT (-160A, 48+6T, 2076T) là dấu hiệu cho sự tăng nguy cơ mắc UTDD, trong khi haplotype CTT (-160C, 48+6T, 2076T) có tác dụng bảo vệ [42]. Một số SNP khác cũng được quan sát thấy ở bệnh nhân UTDD trên khắp chiều dài gen *CDH1*, bao gồm vùng exon, intron, promoter và các nghiên cứu liên quan đến SNP của gen *CDH1* cũng đang được thực hiện để có thể làm sáng tỏ hơn cơ chế gây bệnh UTDD.

#### ❖ Tiền sử gia đình bị ung thư dạ dày

Mặc dù phần lớn UTDD là tự phát nhưng có khoảng 10% số trường hợp có yếu tố gia đình [6]. Tiền sử gia đình là một yếu tố nguy cơ được công nhận đối với bệnh UTDD, một ví dụ nổi tiếng nhất về UTDD gia đình là của Napoleon Bonaparte, trong gia đình có 5 người thuộc họ hàng bậc 1 và bậc 2 đều bị UTDD, ảnh hưởng đến 3 thế hệ liên tiếp [43]. Các bệnh nhân UTDD

có tiền sử gia đình có thể nằm trong các hội chứng di truyền như: Di truyền UTDD liên quan đến polyp (Hội chứng đa nang Mutyh, hội chứng Peutz – Jeghers, hội chứng Polyoseis...), di truyền UTDD không có polyp (UTDD lan tỏa di truyền, UTDD ruột gia đình, hội chứng Li-Fraumeni...). Nguy cơ mắc UTDD ở những người có tiền sử UTDD gia đình cao gấp 3 lần so với người không có tiền sử, nguy cơ này thậm chí cao hơn ở những ung thư mô mềm của người trưởng thành, ngoại trừ ung thư buồng trứng [44]. Mặc dù tiền sử UTDD gia đình đã được chứng minh là yếu tố nguy cơ của ung thư dạ dày nhưng trong một số trường hợp như: nhiều thành viên trong gia đình cùng tiếp xúc chung với tác nhân gây ung thư kích thích làm tổn hại DNA và cùng khởi phát một loại ung thư, hoặc một số đột biến dòng mầm có thể khiến một số cá nhân khởi phát ung thư sớm trong môi trường phơi nhiễm với tác nhân gây ung thư, thì rất khó phân biệt được nguyên nhân gây bệnh do yếu tố di truyền hay yếu tố môi trường.

#### 1.1.2.3. Các yếu tố khác

❖ **Nhóm máu:** Mối liên quan giữa hệ nhóm máu ABO với nguy cơ UTDD đã được nghiên cứu từ lâu, nhưng các kết quả đưa ra không được nhất quán. Tuy nhiên, mối liên quan giữa nhóm máu A với nguy cơ UTDD đã được quan sát thấy ở nhiều nghiên cứu. Trong nghiên cứu của Mao và cộng sự, với một cỡ mẫu lớn, cho thấy cả nhóm máu A và AB có liên quan đến UTDD [45]. Nghiên cứu của Wang (2012), với nhóm máu ABO được thu thập từ 1045 trường hợp UTDD và nhóm máu ABO của 53.026 người khỏe mạnh làm nhóm chứng, kết quả cho thấy nguy cơ UTDD ở nhóm máu A cao hơn đáng kể so với nhóm không A (nhóm O, B và AB), tỷ lệ nhiễm *H. pylori* ở nhóm máu A cao hơn đáng kể so với nhóm không A [46]. Đã có nhiều giả thuyết được đưa ra, Roberts và cộng sự đã đưa ra rằng những người có nhóm máu A dễ bị bệnh thiếu máu ác tính hơn so với người không thuộc nhóm máu A [47], mà thiếu máu ác tính dễ bị UTDD [48]. Sievers và cộng sự đề xuất



rằng những người có nhóm máu A sản xuất ít acid tự do hơn trong dạ dày của họ (giá trị trung bình của pepsinogen huyết tương là 494 đơn vị/ml so với 564 đơn vị/ml) so với những người có nhóm O [49] .

❖ **Béo phì:** Béo phì được xem là một trong các yếu tố chính gây nên ung thư dạ dày vùng tâm vị do làm tăng trào ngược ống tiêu hóa, gây tổn thương di sản ruột – một loại tiền ung thư biểu mô tuyến dạ dày. Tại Mỹ, một nghiên cứu gần đây cho thấy chỉ số khối cơ thể có mối liên quan chặt chẽ với tỉ lệ tử vong do UTDD ở nam giới [50] . Năm 1999, Largergren thực hiện một nghiên cứu trên người Thụy Điển, thấy rằng 25% dân số - nhóm có cân nặng cao nhất có nguy cơ UTDD gấp 2 – 3 lần so với 25% dân số có cân nặng nhẹ nhất [51] .

### ***1.1.3. Đặc điểm lâm sàng***

Nhìn chung các triệu chứng trong UTDD lan tỏa di truyền cũng tương tự như UTDD nói chung. Các dấu hiệu lâm sàng trong giai đoạn sớm thường khó phát hiện, không đặc hiệu hoặc nhầm lẫn với triệu chứng của một số bệnh lành tính khác. Bệnh nhân thường đến viện với các biểu hiện nặng khi ung thư đã tiến triển với các triệu chứng như đau bụng, buồn nôn, nôn, ợ hơi, khó tiêu, gầy sút cân hoặc các biến chứng khi ung thư di căn. Tuy nhiên có một số đặc điểm lâm sàng nổi bật trong UTDD lan tỏa di truyền:

**Tuổi khởi phát bệnh:** Tuổi trung bình khởi phát UTDD lan tỏa di truyền là 38 tuổi (từ 14 – 69 tuổi). Phần lớn các bệnh nhân UTDD lan tỏa mang đột biến gen *CDH1* xảy ra trước 40 tuổi. Tuổi khởi phát có thể thay đổi giữa các cá nhân trong gia đình [9] .

**Tình trạng sống thêm:** Bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền do đột biến gen *CDH1* có tỷ lệ sống thấp hơn sau 1 và 5 năm (tương ứng 36% và 4%) so với bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền mà không có đột biến (tương ứng 48% và 13%) [7] . Với những UTDD lan tỏa được phát hiện sớm (tức là khối u phát triển tại lớp niêm mạc và dưới niêm mạc, chưa xâm lấn lớp cơ), tỷ lệ sống sót sau 5 năm lên đến 90%. Tỷ lệ sống sót sau 5 năm giảm

xuống dưới 30% khi chẩn đoán được thực hiện ở giai đoạn muộn [3] . Trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, các tế bào ung thư xâm lấn ở dạng lan tỏa, tiến triển âm thầm ở lớp dưới niêm mạc, không hình thành nên khối u rắn là nguyên nhân gây khó khăn trong việc phát hiện sớm.

#### **1.1.4. Giải phẫu bệnh**

##### *1.1.4.1. Vị trí tổn thương*

UTDD có thể gặp ở bất kỳ vị trí nào ở dạ dày nhưng hay gặp nhất là vùng hang – môn vị (60 – 70%), sau đó là bờ cong nhỏ (18 – 30%), các vùng khác ít gặp hơn [52] . Hiện nay, dựa theo vị trí tổn thương UTDD được chia thành 2 loại chính là ung thư tâm vị và ung thư không thuộc tâm vị bởi lẽ dịch tễ, bệnh nguyên, mô bệnh học, điều trị và tiên lượng của UTDD từ hai vị trí này khác nhau rõ rệt [53] , [54] . Ung thư tâm vị là ung thư trong khoảng 1cm trên đến 2 cm dưới đường nối thực quản dạ dày. UTDD không thuộc tâm vị gồm ung thư ở phình vị, thân vị, bờ cong lớn, bờ cong nhỏ, hang vị và môn vị.

Trong UTDD không thuộc tâm vị có mối liên quan khá chặt chẽ với tình trạng nhiễm *H.pylori* mạn tính, ngược lại ung thư tâm vị thường là hậu quả của trào ngược dạ dày thực quản mạn tính và tình trạng béo phì [55] . Tiên lượng ung thư tâm vị thường xấu hơn UTDD không thuộc tâm vị [53] , [54] .

##### *1.1.4.2. Hình ảnh đại thể*

Hình ảnh đại thể UTDD được mô tả từ rất sớm. Phân loại của Borrmann (1926) hiện vẫn đang được sử dụng rộng rãi, chia thành 4 type áp dụng cho các trường hợp UTDD tiến triển [56] :

- Type I: thể sùi, u sùi vào lòng dạ dày, loét, dễ chảy máu.
- Type II: thể loét không xâm lấn, loét sâu vào thành dạ dày, bờ gồ cao.
- Type III: thể loét xâm lấn, không rõ giới hạn, đáy ổ loét thâm nhiễm cứng.
- Type IV: thể thâm nhiễm, tổn thương dạ dày thường lan rộng, giới hạn không rõ, có khi toàn bộ dạ dày bị thâm nhiễm cứng.

Phân loại của hiệp hội nội soi tiêu hóa Nhật Bản chia đại thể thành 6 type [57] : Type 0 (0I, 0IIa, 0IIb, 0IIc, 0III), type I, II, III, IV giống như Borrmann, thêm type V không được xếp loại. Phân loại các type có thể chia thành 2 giai đoạn rõ ràng:

- Type 0: các tổn thương ở giai đoạn sớm, khối u có kích thước  $\leq 3$  cm, xâm lấn giới hạn ở niêm mạc hoặc dưới niêm, chưa xâm lấn vào lớp cơ. Nhô lên, hoặc phẳng, hoặc lõm xuống nhẹ và được chia thành các dưới nhóm:

+ Type 0I: type lồi u có dạng polyp.

+ Type 0II: type phẳng.

0IIa - phẳng gồ: tổ chức u phát triển ở niêm mạc tạo thành một mảng nhỏ hơi gồ lên, ranh giới rõ, cao hơn so với niêm mạc xung quanh.

0IIb - phẳng dẹt: tổ chức u phát triển ở niêm mạc tạo thành mảng nhỏ, hơi chắc và tương đối phẳng so với niêm mạc xung quanh.

0IIc - phẳng lõm: lõm nông so với niêm mạc xung quanh có thể thấy những vết xước bề mặt, có dịch phù mỏng bao phủ.

+ Type 0III - type loét: loét có độ sâu khác nhau.

- Type I - type V: là các tổn thương ở giai đoạn muộn. Khối u thường có kích thước lớn, phát triển xâm nhập vào lớp cơ thành dạ dày, có thể tới thanh mạc và xâm lấn vào các tạng lân cận, di căn hạch [57] .

#### 1.1.4.3. Đặc điểm mô bệnh học

Mô bệnh học được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán UTDD. Phổ biến nhất là sử dụng tiêu chuẩn phân loại theo Lauren và Tổ chức y tế thế giới (WHO).

Theo tiêu chuẩn phân loại của Lauren chia mô bệnh học của UTDD thành 2 loại chính: thể lan tỏa và thể ruột [31] . Thể ruột cho thấy có các thành phần ống tuyến, đi kèm với thâm nhập tế bào viêm lan tỏa. Trong đó, thể lan tỏa thường có các tế bào hình nhẵn, ít thâm nhập tế bào viêm và thường có mức độ biệt hóa kém. Hai thể mô bệnh học này có sự khác nhau rõ

rệt về dịch tế, bệnh nguyên và đặc biệt là tiên lượng [31] . Phân loại mô bệnh học theo Lauren khá đơn giản và đã được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới.

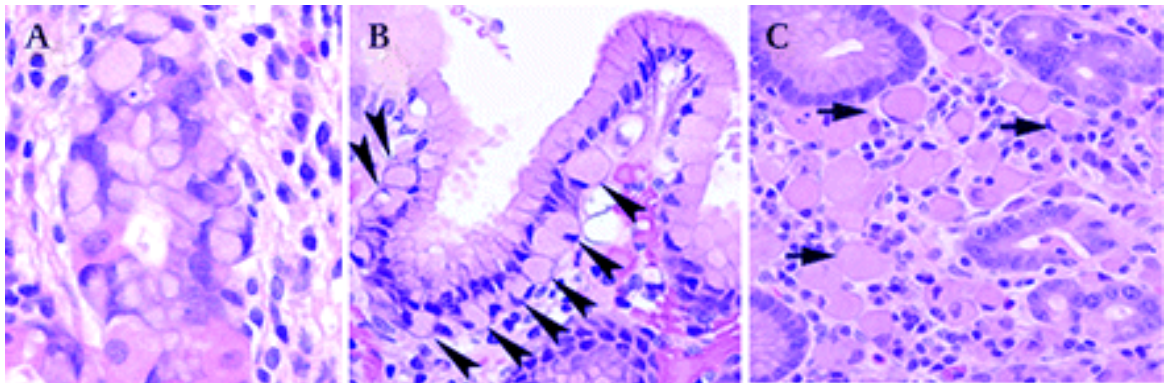
Phân loại mô bệnh học của Tổ chức y tế thế giới năm 2010 chi tiết hơn so với phân loại Lauren, trong đó ung thư dạ dày thể lan tỏa của Lauren tương ứng với ung thư biểu mô tế bào nhẵn và ung thư kém kết dính khác trong phân loại của WHO [58] .

*Bảng 1.1. Phân loại mô bệnh học ung thư biểu mô dạ dày của Tổ chức Y tế Thế giới năm 2010 và so sánh với phân loại Lauren [31] .*

<b>WHO (2010)</b>	<b>Lauren (1965)</b>
Ung thư biểu mô tuyến (UTBMT) thể nhú (papillary) UTBMT thể ống nhỏ (tubular) UTBMT thể nhầy (mucinous)	Thể ruột (Intestinal)
UTBM thể tế bào nhẵn (signet-ring cell) Các ung thư kém kết dính khác (poorly cohesive carcinoma)	Thể lan tỏa (diffuse)
Thể hỗn hợp	Thể hỗn hợp ( không xác định)
UTBM tuyến vảy UTBM tế bào vảy UTBM tế bào nhỏ UTBM không biệt hóa Các loại UTBM khác	

**Mô bệnh học trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền:** Bệnh lý do đột biến gen *CDH1* mà không biểu hiện triệu chứng lâm sàng có thể đại diện cho một mô hình mới trong ung thư. Đặc điểm quan trọng nhất của bệnh này là ung

thư xâm lấn nhiều ổ mà không có tổn thương hàng loạt và không có triệu chứng. Trong một mẫu cắt dạ dày ở giai đoạn đầu của ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, được đặc trưng bởi sự hiện diện từ một vài đến hàng trăm ổ có chứa tế bào nhẵn trong giai đoạn T1a, chưa có di căn hạch. Phần lớn các ổ này xuất hiện rải rác, với các tế bào ung thư không hoạt động. Những tế bào nhỏ khi phóng to về phía bề mặt niêm mạc dạ dày có hình ảnh giống cái nhẫn. Hình ảnh mô học đánh giá sự tiến triển của UTDD lan tỏa bắt đầu bằng ung thư biểu mô tế bào nhẵn tại chỗ, tương ứng với sự hiện diện của các tế bào hình nhẫn ở màng đáy, và sau đó là xâm nhập của các tế bào nhẵn bên dưới biểu mô và trong màng đáy.



**Hình 1.1. (A) Ung thư biểu mô tế bào nhẵn tại chỗ: tuyến với màng nền còn nguyên vẹn được lột bởi các tế bào hình nhẫn. (B) Sự xâm nhập của các tế bào hình nhẫn bên dưới biểu mô (đầu mũi tên). (C) Ung thư biểu mô tế bào nhẵn xâm lấn giai đoạn T1a [59].**

**Hóa mô miễn dịch trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền:** E-cadherin là một protein xuyên màng có chức năng ức chế sự phát triển cũng như xâm lấn của tế bào. Do đó mất biểu hiện của E-cadherin gây mất kết dính tế bào với tế bào, cho phép các tế bào tách ra khỏi khối u chính để xâm nhập vào các mô xung quanh và di chuyển đến các tổ chức ở xa. Những thay đổi trong chức năng của E-cadherin với việc mất hoàn toàn biểu hiện của gen có thể quan trọng với các quá trình này. Trong hóa mô miễn dịch các tuyến niêm mạc dạ dày bình thường đều có biểu hiện dương tính với protein E-cadherin, việc mất

hoàn toàn biểu hiện sẽ cho kết quả âm tính. Nghiên cứu về biểu hiện hoá mô miễn dịch trong ung thư dạ dày của Lazăr và cộng sự, cho thấy giảm biểu hiện E-cadherin gặp nhiều hơn ở UTDD thể lan tỏa (82,4%) so với UTDD thể ruột (31,6%). Nghiên cứu cũng cho thấy có mối tương quan mạnh mẽ giữa phân loại ung thư biểu mô dạ dày của Lauren và biểu hiện hóa mô miễn dịch E-cadherin [60]. Nghiên cứu của López cho thấy biểu hiện hóa mô miễn dịch của protein E-cadherin âm tính trong một trường hợp bị UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến tạo mã kết thúc sớm của gen *CDH1* và người chú của bệnh nhân bị UTDD không phải thể lan tỏa và không mang đột biến thì có biểu hiện protein E-cadherin dương tính [61]. Nghiên cứu của Caggiari, khi phát hiện một đột biến mới tạo mã kết thúc sớm tại exon 9 của gen *CDH1* ở một người đàn ông 41 tuổi bị UTDD thể lan tỏa, nhuộm hóa mô miễn dịch cho thấy mất biểu hiện của protein E-cadherin [62]. Tuy nhiên, không dùng kết quả hóa mô miễn dịch trong việc sàng lọc UTDD lan tỏa di truyền do đột biến gen *CDH1*, vì 60% các trường hợp UTDD không có biểu hiện protein E-cadherin và 70% UTDD có biểu hiện bất thường của protein E-cadherin thì không có đột biến gen *CDH1* [63].

#### **1.1.5. Chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa di truyền**

Tiêu chuẩn chẩn đoán đầu tiên được công bố của Hiệp hội liên kết Ung thư dạ dày thế giới (International Gastric Cancer Linkage Consortium - IGCLC) vào năm 1999 bao gồm: 1) Gia đình có từ 2 trường hợp được chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa với quan hệ họ hàng bậc 1 hoặc bậc 2, có ít nhất một trường hợp được chẩn đoán trước 50 tuổi; 2) Gia đình có từ 3 trường hợp UTDD lan tỏa ở người có quan hệ họ hàng bậc 1 hoặc bậc 2 không phụ thuộc tuổi. Khi áp dụng tiêu chuẩn này, mức độ phát hiện đột biến gen *CDH1* là 30 – 40% trong các gia đình UTDD lan tỏa di truyền [64].

Nhằm mở rộng đối tượng sàng lọc và chủ yếu phục vụ cho những nước có tỷ lệ mắc UTDD thấp, hướng dẫn đồng thuận năm 2010 cập nhật

năm 2015 của IGCLC [7] , đã đưa ra các tiêu chí lâm sàng để sàng lọc di truyền ở các gia đình bị ung thư dạ dày lan tỏa di truyền bao gồm một trong các tiêu chuẩn sau:

1) Gia đình có từ 2 người trở lên bị ung thư dạ dày có quan hệ họ hàng bậc 1 hoặc bậc 2 bất kể lứa tuổi, trong đó có ít nhất một trường hợp chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa.

2) Một trường hợp ung thư dạ dày lan tỏa chẩn đoán trước 40 tuổi.

3) Gia đình có trường hợp bị ung thư dạ dày lan tỏa và ung thư vú thùy, trong đó có ít nhất một trường hợp chẩn đoán trước 50 tuổi.

Khi áp dụng tiêu chuẩn mới năm 2015, tỷ lệ phát hiện đột biến đã giảm còn 10 – 18% [7] . Chưa có một nghiên cứu có hệ thống ở các nước có tỷ lệ mắc UTDD cao, hầu hết các nghiên cứu trên cỡ mẫu nhỏ ở những nước này cho thấy tỷ lệ phát hiện đột biến gen *CDHI* khoảng 8 – 15% [65] , [66] .

Trong một báo cáo của Hansford và cộng sự, trong số các gia đình đáp ứng tiêu chí 1 (gia đình có từ 2 trường hợp UTDD, có ít nhất một trường hợp bị ung thư dạ dày lan tỏa và thêm một tiêu chí là có một trường hợp chẩn đoán trước 50 tuổi), có 26% trong số 84 trường hợp được phát hiện có đột biến gen *CDHI* [14] . Tuy nhiên trong nghiên cứu này chỉ có 2 trong số 38 trường hợp (chiếm 5%) đột biến gen *CDHI* được chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa trước 40 tuổi [14] . Ở tiêu chí thứ 3 (có cá nhân trong gia đình bị ung thư dạ dày lan tỏa và ung thư vú thùy với một trường hợp dưới 50 tuổi), có 10 trong số 60 trường hợp (chiếm 17%) có đột biến gen *CDHI* [14] .

#### ***1.1.6. Chẩn đoán giai đoạn ung thư dạ dày***

Hệ thống phân loại giai đoạn bệnh UTDD được công nhận và sử dụng rộng rãi nhất trên toàn thế giới hiện nay là hệ thống phân loại TNM của AJCC/UICC với bản sửa đổi mới nhất hiện nay là bản được công bố lần thứ 8 năm 2017 [67] .

Bảng 1.2. Phân loại TNM trong ung thư dạ dày theo AJCC 8th 2017

<b>T (tumor): U nguyên phát</b>	
Tx	Không xác định được u
T0	Không có bằng chứng của u
Tis	Loạn sản nặng
T1	U xâm lấn lớp đệm, cơ niêm hay lớp dưới niêm mạc
T1a	U xâm lấn tới lớp cơ niêm
T1b	U xâm lấn tới lớp dưới niêm mạc
T2	U xâm lấn tới lớp cơ
T3	U xâm lấn lớp áo ngoài, chưa phá thủng lớp thanh mạc
T4	U xâm lấn qua thanh mạc hoặc các cấu trúc lân cận
T4a	U xâm lấn tới lớp thanh mạc
T4b	U xâm lấn ra các cấu trúc lân cận
<b>N (nodes): Hạch vùng</b>	
Nx	Không đánh giá được hạch vùng
N0	Không có di căn hạch vùng
N1	Di căn 1 – 2 hạch vùng
N2	Di căn 3 – 6 hạch vùng
N3	Di căn $\geq 7$ hạch vùng
N3a	Di căn từ 7 – 15 hạch vùng
N3b	Di căn $\geq 16$ hạch vùng
<b>M (metastasis): Di căn xa</b>	
M0	Không di căn xa
M1	Có di căn xa (gan, phúc mạc, phổi, buồng trứng, hạch thượng đòn)



*Bảng 1.3. Phân loại giai đoạn bệnh UTDD theo TNM (UICC 2018)*

GĐ 0	Tis	N0	M0
GĐ IA	T1	N0	M0
GĐ IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
GĐ IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
GĐ IIB	T1	N3	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
GĐ IIIA	T2	N3a	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1-2	M0
	T4b	N0	M0
GĐ IIIb	T1-2	N3b	M0
	T3	N3	M0
	T4a	N3a	M0
	T4b	N1-2	M0
GĐ IIIc	T3	N3b	M0
	T4a	N3b	M0
	T4b	N3a-3b	M0
GĐ IV	T bất kỳ	N bất kỳ	M1

### **1.1.7. Điều trị và tiên lượng**

#### **1.1.7.1. Điều trị**

UTDD lan tỏa di truyền là một bệnh tương đối hiếm gặp, số ca bệnh rải rác nên hiện tại chưa có nghiên cứu hệ thống nào đánh giá kết quả điều trị của những bệnh nhân này. Phương pháp điều trị chính được áp dụng là cắt dạ dày toàn phần. Đây là phương pháp được đề cập trong nhiều khuyến cáo nhờ khả năng điều trị triệt căn cao hơn so với cắt dạ dày bán phần. Hiệu quả điều trị sẽ

tăng lên khi kết hợp với hóa chất hỗ trợ nhằm tiêu diệt các tế bào ung thư còn sót lại, giảm nguy cơ tái phát. Ngoài ra có thể chỉ định điều trị diệt *H. pylori* cho các trường hợp phát hiện nhiễm *H. pylori*.

Hóa trị giữ vai trò khá quan trọng trong điều trị hỗ trợ UTDD. Chúng được chỉ định với mục đích giảm tái phát bằng cách tiêu diệt các tế bào u còn sót lại sau phẫu thuật triệt căn. Các nghiên cứu đã chứng minh hóa chất hỗ trợ có hiệu quả cho UTDD giai đoạn II, III (trừ T1). Các phác đồ kinh điển được áp dụng trong điều trị đều chủ yếu dựa trên thuốc 5FU như FAM, EOX, XELOX, FOLFOX... [68] .

Xạ trị là dùng tia phóng xạ năng lượng cao để tiêu diệt tế bào ung thư, gây phá hủy cấu trúc DNA của tế bào, đặc biệt là các tế bào đang phân chia nhanh như tế bào ung thư. Tuy nhiên trên thực tế xạ trị chưa có nhiều tác dụng trong điều trị ung thư dạ dày. Chỉ định của phương pháp khá hạn chế và ít được áp dụng tại Việt Nam.

Ngoài ra, một số phương thức điều trị mới cho bệnh UTDD, như vai trò của liệu pháp miễn dịch, vai trò của các yếu tố tăng trưởng biểu bì... cũng đang được nghiên cứu và phát triển.

#### 1.1.7.2. Tiên lượng

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến tiên lượng UTDD gồm có: toàn trạng, tuổi, giới tính, vị trí, kích thước, đặc điểm đại thể, phân loại mô bệnh học của khối u [69] . Tuy nhiên, quan trọng nhất vẫn là độ xâm lấn (giai đoạn T), tình trạng di căn hạch vùng (giai đoạn N) và di căn xa (giai đoạn M) [70] . Chẩn đoán UTDD càng sớm tiên lượng càng tốt. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, cùng một giai đoạn TNM nhưng diễn biến lâm sàng cũng có sự khác nhau đáng kể.

### ❖ **Tiên lượng ung thư dạ dày lan tỏa trong giai đoạn sớm**

Ung thư dạ dày giai đoạn sớm, theo mô tả của Hiệp hội Ung thư dạ dày Nhật Bản là khi khối u vẫn còn giới hạn trong lớp niêm mạc hoặc lớp dưới niêm mạc bất kể là có hay không có di căn [71]. Tiên lượng của ung thư dạ dày lan tỏa trong giai đoạn sớm được báo cáo trong các nghiên cứu là tương đương hoặc tốt hơn so với các ung thư khác của dạ dày. Trong một nghiên cứu số lượng lớn về UTDD sớm ở 1520 bệnh nhân, so sánh tiên lượng của ung thư dạ dày thể lan tỏa với không phải thể lan tỏa, cho thấy bệnh nhân bị ung thư dạ dày thể lan tỏa có tỷ lệ sống tốt hơn so với ung thư khác của dạ dày [72]. Trong số các nghiên cứu về tiên lượng bệnh, ba nghiên cứu cho thấy tiên lượng của UTDD thể lan tỏa tốt hơn so với dạng ung thư khác của dạ dày trong UTDD giai đoạn sớm [73], [74] và hai nghiên cứu cho thấy tiên lượng của hai nhóm trong UTDD giai đoạn sớm là tương tự nhau [75], [76]. Kết quả này có thể được giải thích do trong UTDD thể lan tỏa khối u bị giới hạn trong lớp niêm mạc và dưới niêm mạc, có ít hạch bạch huyết xâm lấn hơn so với dạng ung thư dạ dày không phải thể lan tỏa.

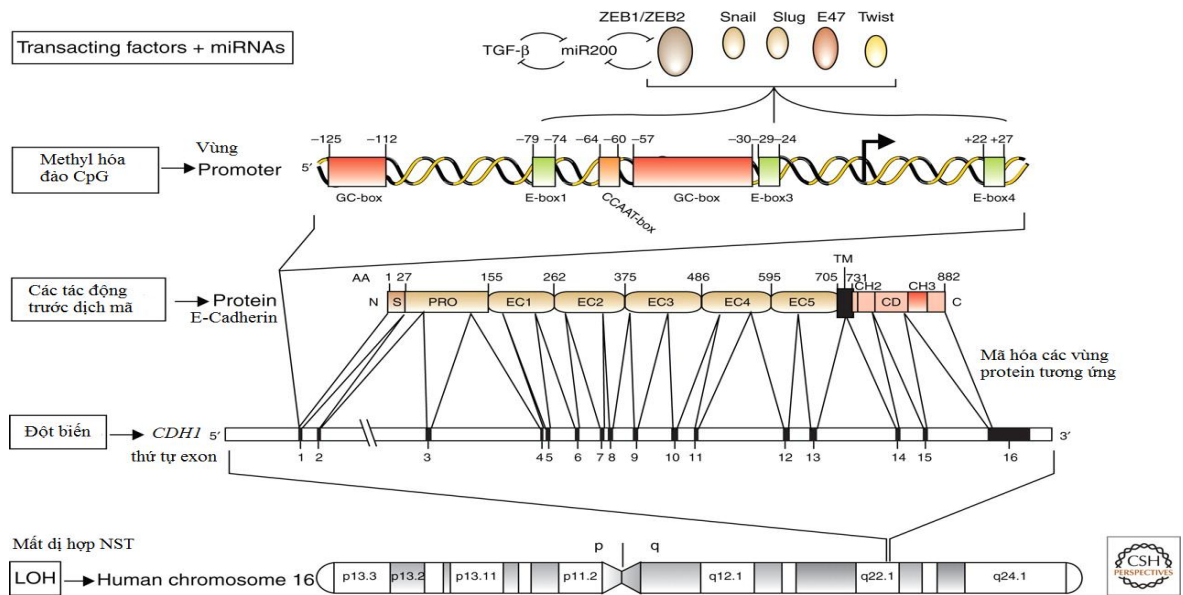
### ❖ **Tiên lượng ung thư dạ dày lan tỏa trong giai đoạn tiến triển**

Ngược lại với UTDD giai đoạn sớm, tiên lượng về tỷ lệ sống trên 5 năm của UTDD lan tỏa trong giai đoạn tiến triển thấp hơn đáng kể so với dạng ung thư dạ dày không phải thể lan tỏa [77]. Tuy nhiên một vài nghiên cứu nhỏ khác lại không kết luận UTDD lan tỏa có tiên lượng xấu hơn [78]. Vì vậy tiên lượng của UTDD lan tỏa trong giai đoạn tiến triển vẫn còn chưa thống nhất.

## **1.2. Vai trò của gen *CDH1* trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền**

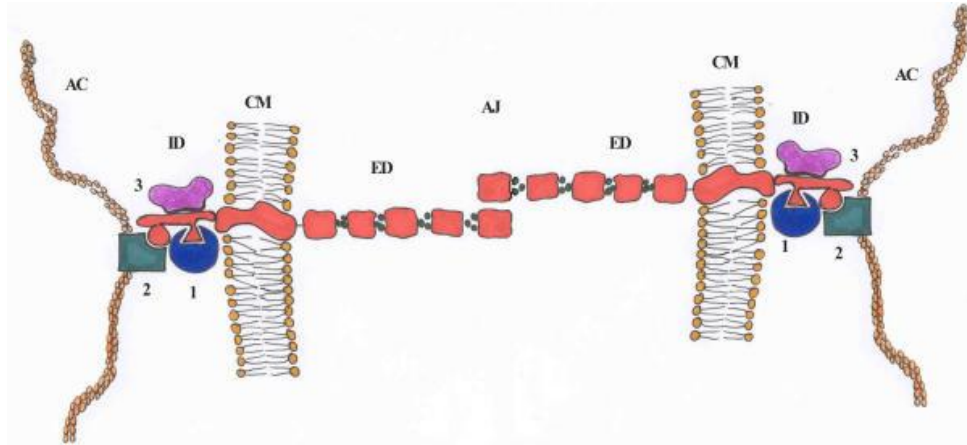
### **1.2.1. Cấu trúc và chức năng của gen *CDH1***

Gen *CDH1* nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể (NST) 16, tại vị trí 16q22.1. Gen *CDH1* mã hóa cho E-cadherin, là một glycoprotein có trọng lượng phân tử 120 kD, với 16 exon trải rộng một khu vực khoảng 100kb. Các exon dao động từ 114 đến 2251 bp, và có 15 intron.



**Hình 1.2. Hình ảnh gen *CDH1* nằm trên nhánh dài NST 16, gồm 16 exon mã hóa cho các vùng protein tương ứng [79].**

E-cadherin là một loại cadherin cổ điển, được phát hiện lần đầu tiên ở tủy sống bởi nhà khoa học Takeichi [80], [4]. Cấu trúc của E-cadherin gồm 3 phần: một miền ngoại bào lớn, một phân đoạn xuyên màng đơn và một miền tế bào chất ngắn [81]. Miền ngoại bào lớn gồm 5 tiểu phần ngoại bào (EC) từ EC1 đến EC5 kết nối với nhau thông qua các ion  $Ca^{2+}$ . Mỗi EC gồm 110 acid amin, chia thành 7 chuỗi beta được sắp xếp theo kiểu sandwich – sandwich. Vùng xuyên màng đơn được mã hóa dưới dạng các protein tiền thân chứa một chuỗi tín hiệu. Trong khi đó miền nội bào là nơi E-cadherin gắn với một bó sợi actin thông qua phức hợp protein gồm:  $\alpha$ -catenin và  $\beta$ -catenin hoặc  $\gamma$ -catenin, trong đó  $\beta$ - và  $\gamma$ -catenin chia sẻ vai trò tương đồng với nhau và liên kết với đầu tận C của E-cadherin [82]. E-cadherin thường không biểu hiện cấu trúc chức năng cuối cùng của mình nếu không bắt cặp với cấu trúc gắn của nó [82].



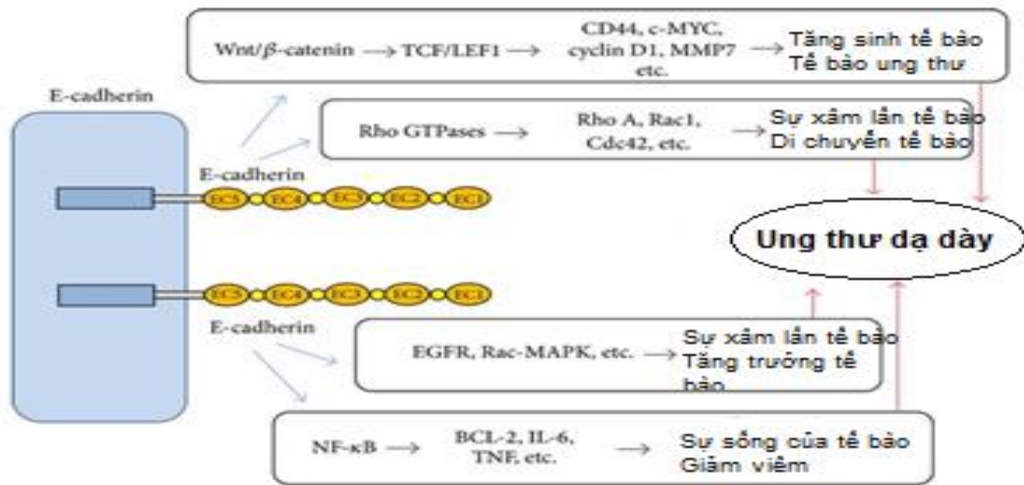
**Hình 1.3. Vị trí của E-cadherin và vai trò trong kết dính tế bào [83]**

*CM: Màng tế bào; ED: Miền ngoại bào; ID: Miền nội bào;*

*AC: Actin cytoskeleton; AJ: Nối tiếp; 1:  $\beta$ -catenin; 2:  $\alpha$ -catenin; 3: p120*

E-cadherin là một phân tử đóng vai trò quan trọng trong việc kết dính tế bào phụ thuộc canxi, duy trì sự phân hóa, kiến trúc bình thường của biểu mô và cân bằng nội mô [84]. Chức năng của E-cadherin đòi hỏi một sự hợp tác tốt giữa miền tế bào chất của E-cadherin kết nối với sợi actin thông qua các catenin khác nhau ( $\alpha$ -,  $\beta$ - và p120) và các liên kết canxi ở miền ngoại bào. Suy giảm chức năng của E-cadherin sẽ làm suy giảm sự kết dính tế bào, gây nên những hình thái bất thường về kiến trúc biểu mô, mất phân cực tế bào và dẫn đến sự xâm lấn, di căn tới các mô lân cận.

Trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, E-cadherin đóng vai trò quan trọng trong nhiều chức năng của tế bào như biệt hóa, tăng sinh, phát triển, di động và chết của tế bào (hình 1.4) [85]. Các chức năng này được thể hiện thông qua các con đường như WNT, Rho GTPases, EGFR...



**Hình 1.4. Các con đường sinh ung thư liên quan đến E-cadherin [85]**

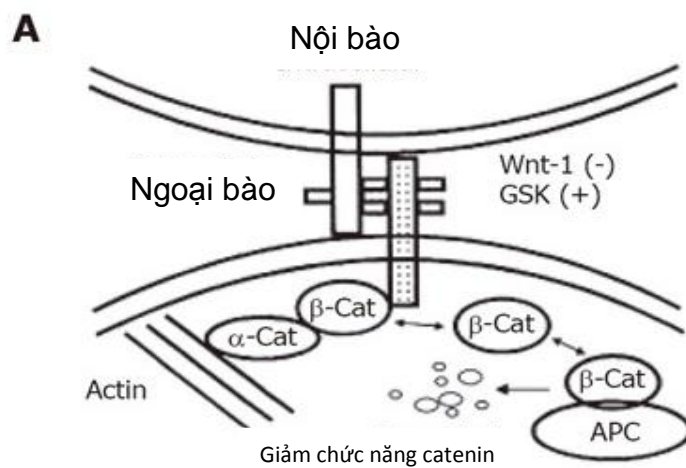
### 1.2.2. Cơ chế gây bệnh của gen *CDH1* trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền

#### 1.2.2.1. Vai trò của E-cadherin trong ung thư

Việc kiểm soát độ bám dính và tính di động của tế bào là một trong những cơ chế quan trọng trong quá trình tạo thành và tiến triển của khối u. Suy giảm chức năng của E-cadherin gây giảm khả năng bám dính của tế bào, con đường truyền tín hiệu tăng sinh gây nên những hình thái bất thường về cấu trúc của biểu mô, mất phân cực tế bào dẫn đến sự xâm lấn.

E-cadherin là một protein ức chế khối u nổi bật. Mất biểu hiện của E-cadherin cùng với quá trình chuyển đổi biểu mô – trung mô (EMT), xảy ra thường xuyên trong quá trình phát triển và di căn của ung thư [86]. Mất E-cadherin gây mất kết dính tế bào - tế bào, cho phép các tế bào tách khỏi khối u chính, xâm nhập vào các mô xung quanh và di chuyển đến các tổ chức ở xa. Tuy nhiên, trong một số trường hợp ung thư biểu mô vẫn di căn xa mặc dù chức năng của E-cadherin bình thường và quá trình biến đổi biểu mô – trung mô không bắt buộc là do di căn gây nên. Hơn nữa, E-cadherin tham gia vào quá trình di chuyển của tế bào bất thường cùng các tế bào khác, tạo thuận lợi cho quá trình xâm lấn và di căn xa.

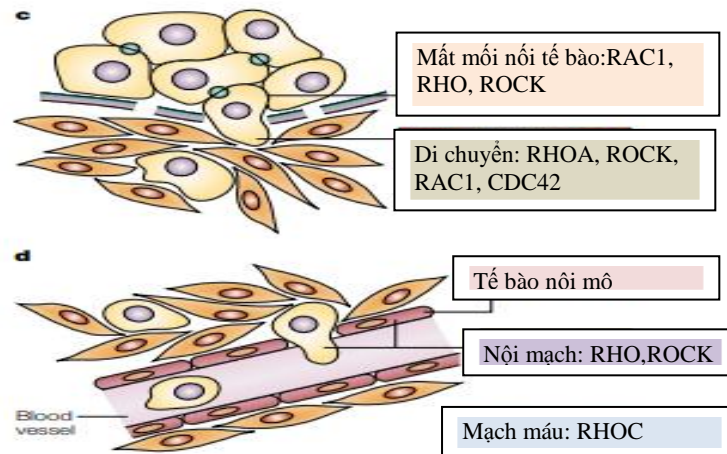
Các nghiên cứu đã chứng minh vai trò của E-cadherin trong ung thư không chỉ giới hạn ở việc hình thành và di căn, mà nó còn có vai trò trong việc điều chỉnh tín hiệu nội bào và do đó thúc đẩy sự phát triển của khối u. Sự kết dính tế bào với tế bào qua trung gian có thể ảnh hưởng đến đường dẫn tín hiệu wnt [87].  $\beta$ -catenin (cũng như  $\gamma$ -catenin) thường được hấp thụ bởi các cadherin trong phức hợp catherin – cadherin. Khi mất chức năng của E-cadherin,  $\beta$ -catenin tự do thường được phosphoryl hóa bởi glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) trong phức hợp adenomatous polyposis coli (APC) – axin – GSK-3 $\beta$  và sau đó bị phân hủy bởi con đường ubiquitin – proteasome, con đường này góp phần hạn chế hậu quả của đột biến *CDHI*, và phần nào hạn chế nguy cơ hình thành khối u. Các khối u có thể hình thành khi gen ức chế khối u APC bị mất chức năng, đột biến  $\beta$ -catenin hoặc ức chế GSK-3 $\beta$  qua con đường wnt, dẫn đến sự tồn tại tự do của  $\beta$ -catenin trong tế bào chất.  $\beta$ -catenin sau đó chuyển thành hạt nhân, liên kết với các thành viên của họ Tcf/Lef-1 của các nhân tố phiên mã và điều chỉnh sự biểu hiện của các gen Tcf/Lef-1-target, bao gồm proto – oncogene c – myc và cyclin D1. Ngoài ra các nghiên cứu gần đây về ung thư dạ dày gia đình cho thấy rằng E-cadherin cũng có thể hoạt động ở giai đoạn sớm hơn trong quá trình phát triển của khối u [88].



**Hình 1.5. Phức hợp cadherin-catenin và protein APC. Trong trường hợp không có tín hiệu Wnt-1, có sự hiện diện của GSK,  $\beta$ -catenin ( $\beta$ -cat) được liên kết với cadherin hoặc protein APC [88].**

### 1.2.2.2. Vai trò của E-cadherin trong hoạt động di căn

Con đường Rho GTPase, đặc biệt là thông qua protein Cdc42, Rac1 và Rho A là con đường quan trọng trong cơ chế di căn của tế bào ung thư.



**Hình 1.6. Con đường Rho-GTPase [89]**

Protein Cdc42 có liên quan với filopodia, một cấu trúc giàu actin, có khả năng cảm nhận tín hiệu và quyết định hướng di chuyển của tế bào. Protein Rac gắn vào cấu trúc giàu actin khác là lamellipodia trong khi protein Rho gây mất phân cực biểu mô ở tế bào u lành và đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển đổi biểu mô – trung mô (EMT) ở những khối u ác tính (hình 1.6). Ba protein này tạo ra liên kết giữa tế bào và cấu trúc ngoài tế bào qua integrin [89]. Sự thay đổi của tín hiệu điều hòa hệ Rho GTPase có thể tác động đến khả năng di chuyển, xâm lấn và di căn, thậm chí là cả tăng sinh tế bào [90]. Tuy nhiên, cơ chế kết nối giữa hệ này và E-cadherin vẫn cần nghiên cứu thêm.

Trong một nghiên cứu của Petrova và cộng sự [91], đã tiến hành nghiên cứu để chứng minh giả thuyết: Vai trò của E-cadherin trong quá trình di căn là do sự điều hòa của E-cadherin trên bề mặt ở trạng thái hoạt động, không liên quan đến số lượng E-cadherin. Để làm được như vậy, nhóm nghiên cứu đã sử dụng một kháng thể đơn dòng kích hoạt (mAb) cho E-cadherin mà đã được sử dụng trong các nghiên cứu trước [91], [92], xác định xem liệu nó có ảnh hưởng đến mức độ di căn không và sự ảnh hưởng của nó có liên quan đến cơ chế điều



chỉnh bề mặt tế bào hay không. Nghiên cứu đã cho thấy sự biểu hiện cao của E-cadherin ở các tế bào khối u thì quá trình di căn vẫn được thực hiện. Thực nghiệm trên động vật mang khối u bằng mAb kích hoạt hoạt động kết dính của E-cadherin mà không liên quan đến số lượng cho thấy giảm đáng kể hoạt động di căn. Điều đó cho thấy sự điều chỉnh tăng giảm hoạt động bám dính của E-cadherin đã góp phần vào quá trình di căn của các tế bào khối u. Đột biến gen *CDH1* được biết là yếu tố quan trọng trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, với tỷ lệ xấp xỉ khoảng 30% [93]. Nghiên cứu trên của Petrova cũng đưa ra mối liên quan ở một số đột biến sai nghĩa của gen *CDH1* trong bệnh UTDD lan tỏa di truyền, ảnh hưởng có chọn lọc đến cơ chế điều chỉnh bề mặt tế bào mà không làm giảm chức năng bám dính của E-cadherin. Điều này cho thấy ảnh hưởng của đột biến trong việc quy định E-cadherin ở bề mặt tế bào góp phần vào sự tiến triển ung thư [91]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc mất sự bám dính giữa các tế bào tế bào là điều kiện tiên quyết trong việc xâm nhập tế bào ung thư và hình thành di căn [5].

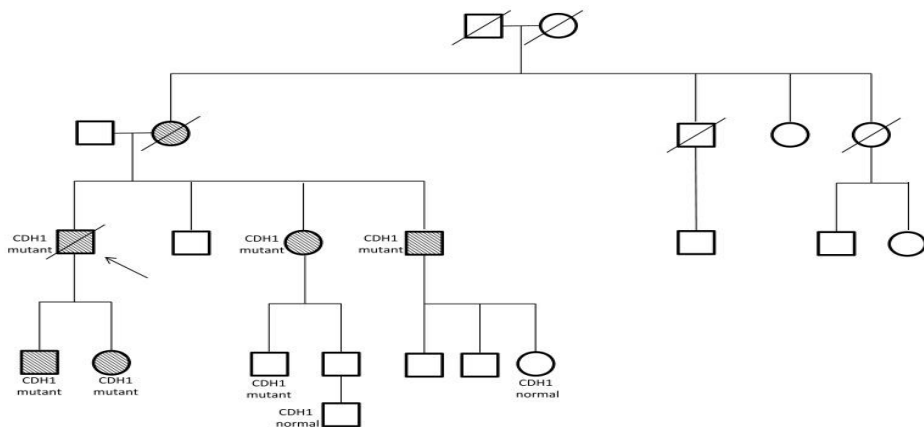
Gần đây, các nhà nghiên cứu đang chú ý tới sự tương tác giữa phức hợp E-cadherin/catenin với thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) như một trục tín hiệu trong quá trình sinh ung thư. E-cadherin ức chế tín hiệu của EGFR, một chất bình thường gây mất kết dính tế bào làm tăng khả năng di động và xâm lấn. Nếu được hoạt hóa, EGFR sẽ phosphoryl hóa E-cadherin gắn với  $\beta$ -catenin,  $\gamma$ -catenin và  $\delta$ -catenin 1, gây mất ổn định cấu trúc này. Đột biến sai nghĩa ở gen *CDH1* làm ảnh hưởng đến vùng ngoại bào của E-cadherin, gây mất ức chế EGFR và xuất hiện di căn [94].

### **1.2.3. Đặc điểm di truyền của ung thư dạ dày lan tỏa di truyền**

Bằng chứng đầu tiên về một dạng UTDD thể lan tỏa có tính di truyền đã được quan sát thấy vào năm 1994, khi Becker và các đồng nghiệp đã xác định đột biến soma của gen *CDH1* trên những mẫu bệnh phẩm UTDD lan tỏa [95]. Cùng năm đó Hiệp hội tiêu hóa của Mỹ đã báo cáo một gia đình có nhiều thành

viên bị UTDD ở các lứa tuổi từ 31 – 65 tuổi trong vòng bốn thế hệ [8] . Sau đó đến năm 1998, Guilford và cộng sự đã phát hiện ra đột biến gây bệnh của gen *CDH1* trong 3 gia đình ở New Zealand có nhiều trường hợp khởi phát UTDD sớm, đa thế hệ [9] . Từ đó đến nay đã có nhiều nghiên cứu về tính di truyền của gen *CDH1* trong bệnh lý UTDD lan tỏa di truyền [96] , [97] , [98] .

Phả hệ trong gia đình một người đàn ông bị UTDD lan tỏa di truyền do đột biến gen *CDH1*, đột biến này cũng được tìm thấy ở 5 thành viên khác trong gia đình gồm em trai, em gái, 2 người con và 1 người cháu của bệnh nhân được mô tả trong nghiên cứu của Onitilo và cộng sự [99] .



**Hình 1.7. Sơ đồ phả hệ [99]**

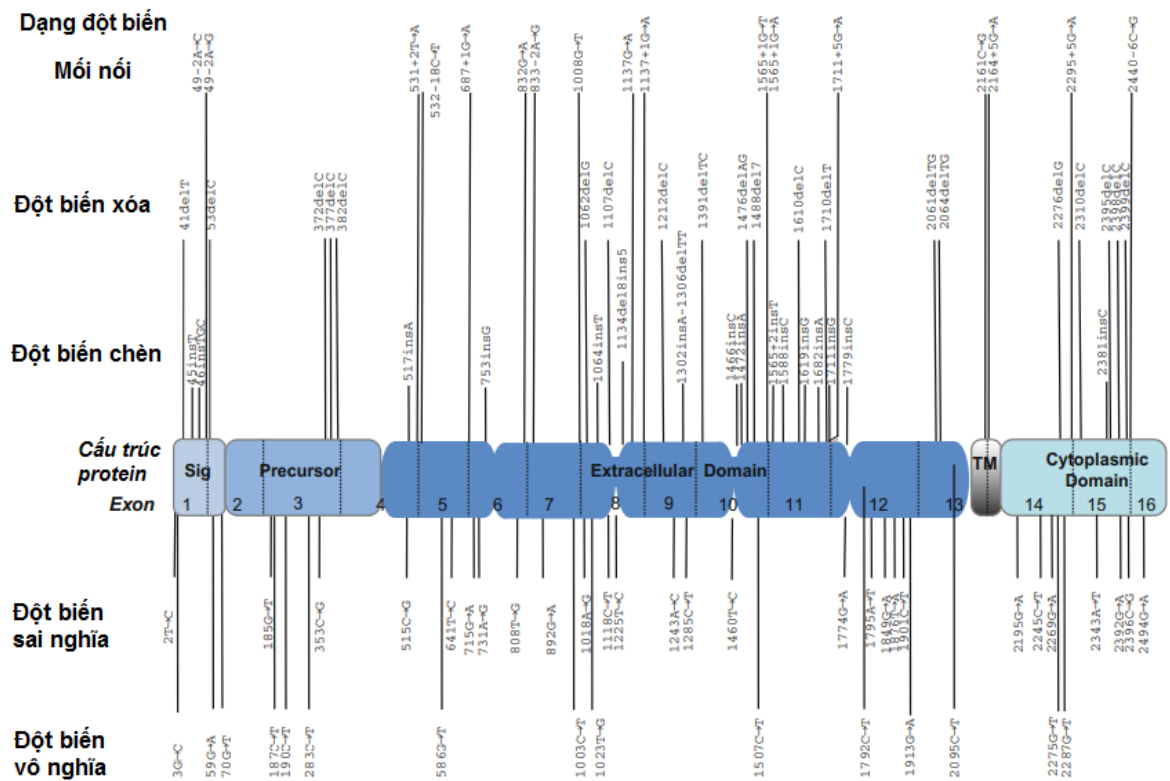
*Các hình tròn và hình vuông đậm màu biểu thị bệnh nhân bị UTDD. Mũi tên chỉ vào là đối tượng trong nghiên cứu. Dòng chữ ở cạnh và bên dưới hình vuông, hình tròn biểu thị tình trạng đột biến hay bình thường của gen *CDH1*.*

Đặc điểm di truyền trong UTDD lan tỏa di truyền tuân theo quy luật di truyền gen trội trên NST thường. Đặc điểm của bệnh di truyền gen trội trên NST thường: trong quần thể có 3 kiểu gen (AA, Aa, aa) và chỉ có hai kiểu hình, bệnh biểu hiện trong trạng thái dị hợp nên 2 kiểu gen AA và Aa có kiểu hình trội giống nhau. Bố và mẹ có khả năng ngang nhau trong việc di truyền gen bệnh cho con cái. Bệnh di truyền trực tiếp từ bố mẹ sang con cái liên tục không ngắt quãng qua các thế hệ, nếu có ngắt quãng có thể là do gia đình đẻ ít con. Đột biến gen *CDH1* trong UTDD lan tỏa di truyền là đột biến dị hợp tử,

do đó khi bố hoặc mẹ mang đột biến thì con cái của họ có nguy cơ 50% bị bệnh và 50% không bị bệnh theo quy luật di truyền của Mendel. Hầu hết bệnh do rối loạn di truyền gen trội trên NST thường có đặc trưng là sự biểu hiện bệnh muộn và tính biến thiên lớn trong biểu hiện lâm sàng.

**1.2.4. Tình hình nghiên cứu về ung thư dạ dày lan tỏa di truyền và đột biến gen CDH1 ở trên thế giới và Việt Nam.**

Theo nghiên cứu của tác giả Hansford năm 2015, có khoảng 155 kiểu đột biến gen CDH1 đã được phát hiện [14]. Các loại đột biến hay gặp nhất liên quan đến gen CDH1 là thêm hoặc mất đoạn nhỏ (chiếm 35%), đột biến sai nghĩa (28%), đột biến vô nghĩa và đột biến chỗ nối exon-intron (16%). Đột biến mất exon lớn khá hiếm (chỉ chiếm 5% số trường hợp) [100]. Hiện tại các nghiên cứu tập trung phát hiện các kiểu đột biến gen CDH1 cũng như một số gen tiền năng khác để bổ sung vào ngân hàng dữ liệu về bệnh.



**Hình 1.8. Vị trí và phân loại các dạng đột biến gen CDH1 trong UTDD lan tỏa di truyền đã được công bố [100]**

Trên thế giới đã có nhiều những nghiên cứu về tình trạng đột biến gen, đặc điểm di truyền của gen *CDHI* trong phá hệ gia đình bị UTDD lan tỏa di truyền và các nghiên cứu cũng chứng minh khả năng gây bệnh của các đột biến. Lần đầu tiên vào năm 1998, Guilford và cộng sự đã báo cáo đột biến gen *CDHI* trong 3 gia đình người Maori bị UTDD lan tỏa di truyền ở New Zealand [9]. Gia đình thứ nhất, là một trường hợp 30 tuổi có đột biến dị hợp tử c.2095C>T dẫn đến một đột biến vô nghĩa. Gia đình thứ hai, có nhiều thành viên bị UTDD, có đột biến dị hợp tử thêm nucleotid ở vị trí c.2381insC nằm trên exon 15. Gia đình thứ ba, cũng xuất hiện đột biến dị hợp tử c.70G>T nằm trên exon 2 của gen *CDHI* [9].

Richards và cộng sự, đã phân tích trong 8 gia đình bị UTDD ở Anh và cũng đã xác định được đột biến gen *CDHI* trong 2 gia đình [10]. Đó là đột biến ở vị trí nối c.49 – 2A>G nằm trên intron 1 và một trường hợp khác là đột biến vô nghĩa c.59G>A nằm trên exon 2.

Trong một nghiên cứu của Gayther và cộng sự, cũng mô tả đột biến gen *CDHI* trong gia đình bị UTDD lan tỏa di truyền. Tác giả đã tìm thấy ba đột biến trong ba gia đình khác nhau, đột biến vô nghĩa c.2095 C>T, một đột biến thêm nucleotid ở vị trí c.1711insG và trong gia đình thứ ba là đột biến thêm nucleotid ở vị trí c.1588insC của exon 11 [10].

Becker và cộng sự, cho rằng đột biến gen *CDHI* đã góp phần vào sự xuất hiện ung thư dạ dày ở những bệnh nhân nằm trong nhóm ung thư dạ dày lan tỏa. Nghiên cứu đã tiến hành phân tích gen *CDHI* trong 26 trường hợp thể lan tỏa, 20 thể ruột và 7 hỗn hợp, kết quả cho thấy đột biến gen *CDHI* được xác định trong 50% (13/26) của thể lan tỏa, 14% (1/7) của thể hỗn hợp và không có trường hợp nào của thể ruột có đột biến gen [95].

Chun và cộng sự, khi nghiên cứu một trường hợp 47 tuổi, có một tiền sử mạnh mẽ của gia đình bị ung thư dạ dày lan tỏa. Đột biến gen *CDHI*

đã được phát hiện ở bệnh nhân này, anh trai của bệnh nhân và 3 người anh em họ của bệnh nhân [101] .

Trong nghiên cứu của Yelskaya và cộng sự (2016), báo cáo về trường hợp một người đàn ông 50 tuổi gốc Ấn Độ, được chẩn đoán bị ung thư dạ dày lan tỏa. Trong thế hệ của mình, có 2 người anh trai cũng bị UTDD, trong đó đã có một người qua đời ở tuổi 45, còn người anh khác được chẩn đoán UTDD ở tuổi 63. Một đột biến gen *CDH1* đã được tìm thấy ở bệnh nhân cùng với người anh trai của mình [102] .

Nghiên cứu của Onitilo và cộng sự (2013), đã mô tả một trường hợp người đàn ông 56 tuổi sống ở miền Tây Hoa Kỳ, được chẩn đoán UTDD lan tỏa. Xét nghiệm di truyền được đề xuất khi mẹ ông qua đời ở tuổi 51 vì UTDD. Kết quả giải trình tự gen *CDH1* cho thấy có đột biến dị hợp tử (c.1003 C>T). Xét nghiệm di truyền các thành viên khác trong gia đình có em gái (50 tuổi) và em trai (48 tuổi) có đột biến gen *CDH1*. Em gái sau khi thử nghiệm dương tính với đột biến gen *CDH1* đã quyết định cắt dạ dày dự phòng, mô bệnh học dạ dày của người em gái có hình ảnh ung thư biểu mô tế bào nhẵn. Con trai và con gái của đối tượng cũng làm xét nghiệm di truyền và có kết quả dương tính với đột biến gen *CDH1*. Cả 2 đều cắt dạ dày dự phòng với kết quả mô bệnh học đều có hình ảnh ung thư biểu mô tế bào nhẵn [99] .

Tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào được thực hiện về đột biến gen *CDH1* trên bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền cũng như lập phả hệ và phân tích đột biến ở những thành viên gia đình bệnh nhân mang đột biến gen *CDH1*.

### **1.2.5. Quản lý bệnh ung thư dạ dày lan tỏa di truyền do đột biến gen *CDH1***

#### **1.2.5.1. Phương pháp lập phả hệ**

Phương pháp lập phả hệ gia đình để nghiên cứu bệnh xem có di truyền hay không và quy luật di truyền như thế nào. Theo dõi bệnh qua ít nhất ba thế hệ và lập ra phả hệ. Mỗi cá thể trong phả hệ có một ký hiệu theo quy ước, tùy theo giới tính, có bệnh hay không có bệnh, có mang đột biến gen

không... Bản đồ phả hệ được vẽ theo hình bậc thang từ trên xuống dưới theo thứ tự các thế hệ ông bà, bố mẹ, con cháu. Mỗi thế hệ là một bậc thang, các con của bố mẹ được ghi lần lượt từ trái sang phải và từ người con lớn nhất. Dương sự là bệnh nhân tham gia nghiên cứu được đánh dấu bằng 1 mũi tên, các chữ số La mã để chỉ thứ tự các thế hệ, các chữ số Ả rập để chỉ thứ tự của thành viên trong thế hệ đó. Trong một phả hệ có bệnh lý di truyền, tần số mắc bệnh giảm dần theo mức độ huyết thống theo hệ số di truyền: họ hàng bậc một (bố mẹ, anh chị em ruột, con cái) có tỷ lệ mắc bệnh cao nhất, giảm dần ở họ hàng bậc hai (ông, bà, chú, bác, cô dì ruột, cháu ruột) rồi đến họ hàng bậc 3 (anh chị em họ...).

#### *1.2.5.2. Tư vấn di truyền và tiêu chí xét nghiệm đột biến gen CDH1*

Tư vấn di truyền là hoạt động rất cần thiết đối với bệnh nhân có đột biến gen *CDH1* nói riêng và bệnh UTDD lan tỏa di truyền nói chung. Tư vấn di truyền thực hiện nhiệm vụ phòng bệnh di truyền ở từng gia đình, từng cá nhân, cùng với việc thực hiện các xét nghiệm sàng lọc đột biến gen, sàng lọc trong chẩn đoán trước sinh góp phần làm giảm tỷ lệ bệnh di truyền trong gia đình và quần thể. Tư vấn di truyền bao gồm việc phân tích phả hệ gia đình với ít nhất là ba thế hệ và làm mô bệnh học ở những cá nhân mắc bệnh để chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa. Do cơ chế giảm tính thấm của một gen (reduced penetrance) nên bố mẹ của những người bệnh này sẽ có thể mắc hoặc không mắc ung thư. Nếu không phát hiện gen bệnh ở bố mẹ thì đột biến này thường là dạng tự phát sinh (de novo). Còn anh chị em của người bệnh có nguy cơ mang đột biến là 50% nếu như bố mẹ của đối tượng này có gen đột biến gen *CDH1*. Nguy cơ mang đột biến với những người con của đối tượng cũng là 50%.

Xét nghiệm di truyền nên được bắt đầu từ người được chẩn đoán mắc ung thư dạ dày lan tỏa di truyền. Rất hiếm các trường hợp ung thư dạ dày lan tỏa trước 18 tuổi được báo cáo ở các gia đình có thành viên bị bệnh, nguy cơ mắc bệnh trước 20 tuổi là rất thấp [103]. Xét nghiệm di truyền có thể được áp

dụng từ tuổi 18, tuy nhiên với lứa tuổi dưới 18 tuổi cần xem xét lại tuổi khởi phát sớm của bệnh trong các gia đình bị UTDD lan tỏa di truyền. Các tiêu chí do Hiệp hội liên kết Ung thư dạ dày quốc tế (IGCLC) đưa ra để chọn bệnh nhân có nguy cơ ung thư dạ dày gia đình để làm xét nghiệm đột biến gen *CDH1* là: 1) Gia đình có từ 2 người trở lên bị ung thư dạ dày ở bất kể lứa tuổi, trong đó có ít nhất một trường hợp chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa; 2) Một trường hợp ung thư dạ dày lan tỏa chẩn đoán trước 40 tuổi; 3) Gia đình có trường hợp bị ung thư dạ dày lan tỏa và ung thư vú thùy, trong đó có ít nhất một trường hợp chẩn đoán trước 50 tuổi. Ngoài ra trong trường hợp chẩn đoán UTDD mà mô bệnh học xuất hiện tế bào nhầy hoặc có sự xâm nhập của các tế bào nhầy đến các cơ quan lân cận với UTDD lan tỏa thì cũng nên xem xét việc làm xét nghiệm di truyền ở những đối tượng này [104].

Trong buổi tư vấn với gia đình có người bị mắc UTDD lan tỏa di truyền, người tư vấn cần tập trung 6 vấn đề chính, đó là: hiểu về nguy cơ mắc ung thư, các vấn đề thực tiễn (bảo hiểm, công việc...), các vấn đề về gia đình (giao tiếp, trách nhiệm), các vấn đề với con cái (lo lắng về nguy cơ mắc của con...), chung sống với ung thư và các vấn đề về tâm lý (lo lắng, tức giận, cảm giác mất mát...) [105].

#### 1.2.5.3. Nội soi tiêu hóa

Kiểm tra định kỳ bằng nội soi tiêu hóa rất quan trọng, được khuyến cáo cho những người mang đột biến gen *CDH1* mà không muốn cắt dạ dày dự phòng, cho những người có nguy cơ cao mà chưa làm sàng lọc di truyền, cũng như cho các thành viên trong gia đình UTDD lan tỏa di truyền mà không có đột biến gen *CDH1*. Các đối tượng này cần thực hiện nội soi dạ dày, sinh thiết vùng niêm mạc bất thường, làm xét nghiệm *H. pylori*. Mặc dù chưa thấy mối liên quan giữa nhiễm *H. pylori* với UTDD lan tỏa di truyền, nhưng tỷ lệ nhiễm *H. pylori* ở những người mang đột biến gen cần phải ghi lại; hơn nữa *H. pylori* lại là yếu tố nguy cơ cao gây UTDD.

Nội soi trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền được khuyến nghị thực hiện như mô tả trong tiêu chuẩn Cambridge [59] . Nội soi nên được sử dụng bằng ống nội soi ánh sáng trắng có độ nét cao, thời gian tối thiểu cho 1 lần soi là 30 phút để kiểm tra cẩn thận niêm mạc và lấy mẫu sinh thiết, với tối thiểu 30 mẫu sinh thiết [59] . Nội soi cho phép kiểm tra trực tiếp hình ảnh đại thể và sinh thiết các vùng nghi ngờ. Nhưng UTDD thể lan tỏa thường khó phát hiện ở giai đoạn đầu do các tổn thương có khuynh hướng lây lan rộng, phát triển ở lớp dưới niêm mạc mà không xuất hiện khối u. Vì thế, nội soi dạ dày nên được thực hiện bởi các bác sĩ chuyên khoa về nội soi tiêu hóa, cũng như các mẫu mô bệnh học cần phải được đánh giá bởi các nhà chuyên khoa với thể bệnh này.

#### 1.2.5.4. Cắt dạ dày dự phòng

Phương pháp duy nhất đã được chứng minh để dự phòng cho người mang đột biến gen *CDH1* gây bệnh là cắt dạ dày dự phòng [106] . Tiên lượng của phương pháp cắt dạ dày dự phòng là tốt. Tỷ lệ tử vong ước tính sau khi cắt dạ dày dự phòng là 2 – 4% so với nguy cơ mắc bệnh lâu dài là 80% [59] . Các bệnh nhân sau điều trị có thể gặp một số vấn đề như đau bụng sau ăn, đầy bụng, khó tiêu, không dung nạp lactose, kém hấp thu chất béo, chứng hôi miệng. Thời gian tối ưu cắt dạ dày dự phòng ở những người mang đột biến gen *CDH1* vẫn còn là điều tranh cãi. Tuy nhiên thời gian của hoạt động này có thể thay đổi tùy theo nhu cầu, tuổi tác, thể trạng và tâm lý của bệnh nhân. Trong ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, các tế bào ung thư xâm lấn ở dạng lan tỏa, tiến triển âm thầm trong một thời gian dài. Điều này giải thích tại sao nhiều cá nhân sau khi tiến hành cắt dạ dày dự phòng và làm sinh thiết dạ dày mới phát hiện ra có các khối u ở giai đoạn T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>, mà không có bất kỳ dấu hiệu hay triệu chứng của UTDD [107] .



Cắt dạ dày dự phòng là một biện pháp phòng bệnh rất hiệu quả, tuy nhiên nó lại chịu sự chi phối bởi tâm lý, sức khỏe cá nhân, cam kết gia đình về việc quyết định thời điểm phẫu thuật. Do đó cần có một sự liên kết giữa nhiều chuyên khoa với nhau như ngoại khoa, di truyền, nội soi... để tư vấn trước phẫu thuật cho bệnh nhân.

Trong tương lai, có thể với những hiểu biết sâu hơn về bất hoạt gen *CDH1* thứ phát, các nhà nghiên cứu có thể tìm ra phương pháp điều trị dự phòng bằng hóa chất.

### **1.3. Các phương pháp phát hiện đột biến gen *CDH1***

Để chẩn đoán được bệnh thì bên cạnh yếu tố lâm sàng, cần những công cụ sinh học phân tử (SHPT) để xác định chính xác các bất thường của hệ gen nói chung và gen *CDH1* nói riêng. Phát hiện đột biến và nguyên nhân gây bệnh do đột biến gen *CDH1* cần cách tiếp cận đa mô thức và vẫn chưa có giải pháp tối ưu để đánh giá tổng thể. Mỗi phương pháp có ưu nhược điểm riêng, tùy từng trường hợp mà có thể đánh giá lựa chọn phương pháp phù hợp. Các yếu tố cần được cân nhắc để đánh giá là khả năng áp dụng và hạn chế của các phương pháp phân tích, khả năng kinh tế, tính chất của nghiên cứu... Ngoài ra, do yêu cầu của từng cách tiếp cận và đặc điểm của từng nghiên cứu mà ngay từ khâu lựa chọn mẫu đã có những lưu ý nhất định để có thể nghiên cứu các đột biến.

Các phương pháp có thể sử dụng là PCR và sequencing thông thường, nhưng cũng có thể cần phối hợp với các phương pháp khác mới hơn như MLPA, NGS, quantitative PCR (qPCR), RT-PCR, multiplex sequencing, pyrosequencing, bisulfite sequencing... Những trường hợp phát hiện đột biến gen sẽ cần phải đánh giá loại đột biến là sai nghĩa, mất đoạn hay vô nghĩa. Các trường hợp gây đột biến mất đoạn thì đều là những người có nguy cơ cao mắc bệnh và cần những biện pháp theo dõi và điều trị dự phòng dựa theo khuyến cáo [105] .

*Bảng 1.4. Ý nghĩa của các phương pháp đánh giá đột biến gen CDH1 [108]*

<b>Gene</b>	<b>Phương pháp đánh giá</b>	<b>Tỷ lệ mang đột biến gen</b>
<i>CDH1</i>	Giải trình tự gen thông thường	30%-50%
	Phân tích đột biến mất/thêm đoạn gene	4%

### ***1.3.1. Khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)***

PCR là một kỹ thuật kinh điển, một trong những phương pháp quan trọng nhất trong lĩnh vực SHPT để khuếch đại DNA. Chỉ từ một lượng DNA rất ít ban đầu, có thể ra hàng triệu bản sao để phục vụ phân tích, giải trình tự và nhiều kỹ thuật khác trên gen. Kỹ thuật cần sử dụng 2 đoạn mồi cho mỗi đầu của đoạn DNA cần nhân lên, các nucleotid tự do và enzym DNA polymerase bền với nhiệt để khuếch đại đoạn gen... Nếu chỉ khuếch đại một lượng nhỏ DNA mẫu thì phương pháp này có độ chính xác rất cao. Ngoài ra thời gian thực hiện nhanh, giá thành rẻ, dễ áp dụng rộng rãi cho nhiều nghiên cứu nên được sử dụng trong việc phát hiện đột biến gen *CDH1*. Tuy nhiên phương pháp này cũng có một số nhược điểm như cần có đoạn mồi đặc trưng và dễ bị ngoại nhiễm. Một lưu ý nữa trong nghiên cứu gen *CDH1* là phương pháp này cũng không thể dùng được để phát hiện các đột biến mất đoạn/nhân đoạn lớn, gặp trong 4-5% số trường hợp được chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền.

### ***1.3.2. Kỹ thuật giải trình tự gen theo phương pháp Sanger***

Giải trình tự gen trực tiếp là phương pháp kinh điển với các bước tiến hành tương đối đơn giản. Đầu tiên DNA sợi kép được tách thành sợi đơn, sau đó được chia làm 4 ống. Mỗi ống bao gồm một đoạn mồi oligonucleotid, DNA polymerase và hỗn hợp 4 loại nucleotid dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) và 1 trong 4 loại dideoxynucleotid có đánh dấu đồng vị phóng xạ ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) để tạo các cấu trúc kép mới. Các đoạn gen sẽ được ghép đôi bằng dNTP cho đến khi ddNTP gắn vào. Quá trình giải trình tự sẽ dừng lại tại vị trí này, tạo các đoạn DNA có độ dài khác nhau.

Sau đó mẫu này được đưa vào điện di trên môi trường gel Polyacrylamide hoặc Agarose để giải trình tự gen. Ưu điểm của phương pháp này là giá thành rẻ, dễ thực hiện và khả năng phát hiện đột biến tốt. Tuy nhiên, nhược điểm là thời gian hoàn thành lâu, có thể lên đến vài ngày tùy thuộc chiều dài của đoạn gen cần phân tích. Ngoài ra, với các mẫu mô được thu thập từ vị trí khối u thì độ đặc hiệu của phương pháp giảm đi, dễ gây âm tính giả. Tuy vậy nhờ ưu thế về giá thành và tính đại trà của phương pháp này mà phần lớn các nghiên cứu về gen *CDH1* nói riêng và gen nói chung mà chúng vẫn là sự lựa chọn hàng đầu để phân tích phát hiện đột biến.

### ***1.3.3. Dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến gen CDH1 bằng phần mềm phân tích tin sinh học (in silico)***

Ngày nay, sự phát triển mạnh mẽ của các phần mềm phân tích tin sinh học (*in silico*) đã được sử dụng rộng rãi để hỗ trợ, phân tích, đánh giá và dự đoán khả năng gây bệnh trong các nghiên cứu di truyền ở người và đặc biệt là trong ung thư. Một cách tiếp cận đa ngành bao gồm các dữ liệu về phả hệ gia đình, xét nghiệm di truyền, phân tích *in vitro* và phân tích bằng tin sinh học (*in silico*) hiện đang được sử dụng để phân loại các biến thể mới tìm được là lành tính hay gây bệnh [109]. Dự đoán có thể cung cấp các thông tin về tác động có thể xảy ra của biến thể lên cấu trúc và/hoặc chức năng protein, cũng như dự đoán mức độ bảo tồn của một nucleotid cụ thể giữa các loài hay tính chất sinh hóa của sự thay thế acid amin [110], [111]. Việc sử dụng nhiều chương trình phần mềm để dự đoán khả năng gây bệnh cũng được khuyến cáo, vì các chương trình này sử dụng các thuật toán riêng biệt dẫn đến kết quả đưa ra khác nhau [112]. Trong các phần mềm phân tích *in silico*, thì SIFT, Polyphen 2 và Mutation Taster đã trở thành những công cụ tiêu chuẩn và được sử dụng nhiều nhất [98], [110], [111].

SIFT là một chương trình dự đoán ảnh hưởng của việc thay thế acid amin đến chức năng của protein dựa trên việc bảo tồn của trình tự acid amin trong quá trình tiến hóa [113]. Với những acid amin được bảo tồn cao có vai trò quan trọng đối với chức năng protein, ngược lại nếu acid amin có mức độ bảo tồn thấp thì sẽ có khả năng dung nạp một số chất thay thế mà không ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein. Điểm SIFT nằm trong khoảng từ 0 – 1, một sự thay thế acid amin được phân loại là không dung nạp hay có khả năng gây bệnh nếu giá trị điểm dưới 0,05 [110], [111].

Polyphen 2 là công cụ tự động để dự đoán tác động của sự thay thế acid amin lên cấu trúc và chức năng của protein, dựa trên sự thay đổi về cấu trúc và so sánh để đánh giá hiệu quả về tính ổn định và chức năng của protein [114]. Khả năng gây bệnh càng cao khi điểm đánh giá càng gần 1 (điểm từ 0 – 1).

Mutation Taster là một ứng dụng dựa trên phần mềm đánh giá khả năng gây bệnh của các biến đổi trên DNA. Dự đoán tác động của các biến đổi acid amin lên cấu trúc và/hoặc chức năng của protein [115].

Nghiên cứu của Yelskaya và cộng sự (2016), đã phát hiện một đột biến sai nghĩa c.1679C>G (p.T560R) ở một bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền. Khi phân tích đột biến theo phần mềm *in silico* bằng SIFT, Polyphen 2, Mutation Taster đã dự đoán đây là một đột biến có thể gây hại. Dựa trên kết quả *in silico*, nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu khả năng gây bệnh của đột biến trong *in vitro* thì cho thấy đột biến này tạo ra một vị trí nối mới dẫn đến việc xóa 32 nu ở đầu 3' của exon 11 dẫn đến việc tạo mã kết thúc sớm dẫn đến một đột biến gây bệnh. Nghiên cứu này cho thấy có sự tương đồng trong việc sử dụng *in silico* và *in vitro* trong xác định khả năng gây bệnh [102].

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Gồm 45 bệnh nhân được chẩn đoán xác định ung thư dạ dày lan tỏa di truyền thỏa mãn các tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân.

- 36 thành viên gia đình có cùng huyết thống với bệnh nhân mang đột biến gen *CDH1* trong vòng 3 thế hệ.

#### ❖ Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân trong nghiên cứu

Đối tượng trong nghiên cứu là những bệnh nhân thỏa mãn các tiêu chuẩn sau:

- Bệnh nhân được chẩn đoán xác định mô bệnh học là UTDD thể lan tỏa theo phân loại của Lauren [116] hoặc theo phân loại của WHO 2010 [58].

- Thỏa mãn một trong các tiêu chuẩn chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền của IGCLC (2015) [14]:

1) Gia đình có từ 2 người trở lên bị ung thư dạ dày có quan hệ họ hàng bậc 1 hoặc bậc 2 bất kể lứa tuổi, trong đó có ít nhất một trường hợp chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa.

2) Một trường hợp ung thư dạ dày lan tỏa chẩn đoán trước 40 tuổi.

3) Gia đình có trường hợp bị ung thư dạ dày lan tỏa và ung thư vú thùy, trong đó có ít nhất một trường hợp chẩn đoán trước 50 tuổi.

- Bệnh nhân được lựa chọn bao gồm cả bệnh nhân chưa điều trị cũng như những bệnh nhân đã được điều trị.

- Bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu.

#### ❖ Tiêu chuẩn chọn thành viên trong phả hệ gia đình

Các bệnh nhân tham gia nghiên cứu, nếu người nào phát hiện có đột biến gen *CDH1* sẽ tiến hành lập phả hệ và lấy mẫu của các thành viên cùng huyết thống trong phạm vi 3 thế hệ, để tiến hành phân tích gen *CDH1* tại vị trí đột biến tìm được ở bệnh nhân.

❖ **Tiêu chuẩn loại trừ**

- Bệnh nhân bị UTDD di căn từ cơ quan khác đến.
- Bệnh nhân bị UTDD không phải thể lan tỏa.
- Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu hoặc không có đầy đủ thông tin.
- Thành viên gia đình không đồng ý tham gia nghiên cứu.

**2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu**

❖ **Thời gian nghiên cứu:** Từ 10/2016 – 4/2020

❖ **Địa điểm nghiên cứu:**

- Địa điểm lấy mẫu: Bệnh viện K, bệnh viện Đại học Y Hà Nội, bệnh viện Việt Đức, bệnh viện Ung bướu Hà Nội, bệnh viện Lão khoa TW.

- Địa điểm phân tích mẫu:

Phân tích gen được thực hiện tại Trung tâm kiểm chuẩn và Đảm bảo chất lượng Xét nghiệm-Đại học Y Hà Nội 32/45 mẫu và 13/45 mẫu được phân tích tại Khoa sinh học ứng dụng Viện công nghệ Kyoto-Nhật Bản với cùng phương pháp.

- Địa điểm làm hóa mô miễn dịch: Khoa Giải phẫu bệnh – Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

- Địa điểm nội soi tiêu hóa các thành viên gia đình mang đột biến: Khoa Thăm dò chức năng bệnh viện Lão Khoa TW.

**2.3. Phương pháp nghiên cứu**

**2.3.1. Thiết kế nghiên cứu:** Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang

**2.3.2. Cỡ mẫu nghiên cứu**

Bệnh ung thư dạ dày lan tỏa di truyền là một bệnh hiếm gặp nên chúng tôi tiến hành lấy cỡ mẫu thuận tiện.

Trong quá trình nghiên cứu đã thu thập được 45 bệnh nhân đáp ứng các tiêu chuẩn lựa chọn và 36 thành viên trong 4 gia đình bệnh nhân phát hiện đột biến gen *CDHI* tham gia nghiên cứu.

### **2.3.3. Phương pháp thu thập mẫu**

- Lựa chọn bệnh nhân theo tiêu chuẩn nghiên cứu, thực hiện phỏng vấn theo bộ câu hỏi của bệnh án nghiên cứu. Sau đó thu thập thông tin chẩn đoán, các xét nghiệm cận lâm sàng, kết quả nội soi, mô bệnh học của bệnh nhân trong hồ sơ bệnh án. Tất cả thông tin trên được điền vào bệnh án nghiên cứu (mẫu bệnh án nghiên cứu ở phần phụ lục 2).

- Thu thập mẫu máu của bệnh nhân: Mỗi bệnh nhân được lấy 2ml máu tĩnh mạch vào ống chống đông EDTA.

- Vận chuyển mẫu tới phòng nghiên cứu, mẫu được mã hóa và lưu ở tủ -20° C đến khi phân tích.

- Các mẫu nghiên cứu được tiến hành phân tích, giải trình tự gen *CDHI* để xác định đột biến.

- Bệnh nhân nếu phát hiện có đột biến gen sẽ lập phả hệ và tiếp tục thu thập mẫu máu (2ml máu tĩnh mạch vào ống chống đông EDTA) của các thành viên gia đình trong vòng 3 thế hệ. Sau đó, tách chiết DNA và định vị vùng đột biến dựa vào kết quả phân tích gen *CDHI* trên bệnh nhân của mỗi gia đình, để tiến hành phân tích gen cho các thành viên.

- Thu thập mẫu mô dạ dày đã được đúc parafin của bệnh nhân mang đột biến gen để làm hóa mô miễn dịch E-cadherin.

- Tiến hành nội soi dạ dày và làm mô bệnh học các thành viên có đột biến gen trong gia đình bệnh nhân mang đột biến.

### 2.3.4. Các biến số nghiên cứu

❖ Đặc điểm chung: Phỏng vấn theo bộ câu hỏi nghiên cứu

- Tuổi
- Giới
- Tiền sử bệnh lý dạ dày của cá nhân.

- Tiền sử nhiễm *H.Pylori*: Đánh giá dựa trên khai thác tiền sử được chẩn đoán nhiễm *H.Pylori* của bệnh nhân, thông tin thu thập từ hồ sơ bệnh án. Bệnh nhân có tiền sử nhiễm *H.Pylori* nếu 1 trong 2 kết quả trên là dương tính. Bệnh nhân không có tiền sử nhiễm *H.Pylori* nếu cả 2 kết quả trên đều âm tính.

- Tiền sử gia đình về UTDD và ung thư khác: khi trong gia đình có thành viên bị UTDD với quan hệ họ hàng bậc 1 hoặc bậc 2 ( được chẩn đoán ở bệnh viện).

- Tình trạng hút thuốc lá: Tình trạng hút thuốc của đối tượng nghiên cứu được chia thành 2 nhóm là nhóm đối tượng có hút thuốc lá và nhóm đối tượng không hút thuốc lá. Theo khái niệm của Trung tâm y học dự phòng Hoa Kỳ CDC (Centers for Disease Control and Prevention), người hút thuốc lá là người đã từng hút ít nhất 100 điếu thuốc lá trong đời. Người không hút thuốc lá là người chưa từng hút thuốc lá hoặc hút ít hơn 100 điếu thuốc lá trong đời.

- Uống rượu: WHO đưa ra một đơn vị uống chứa 10 gam cồn. Một đơn vị chuẩn tương đương với 1 chén rượu mạnh (40 độ, 30ml), 1 ly rượu vang (13,5 độ, 120ml) hay 2/3 chai hoặc 1 lon bia.

Tình trạng sử dụng đồ uống có cồn (rượu, bia) được đánh giá bằng bộ câu hỏi AUDIT C (phụ lục 6) do Tổ chức Y tế thế giới xây dựng giúp sàng lọc nhanh tình trạng uống rượu [117] và được chia thành 2 nhóm:

Không sử dụng rượu hoặc sử dụng rượu hợp lý nếu tổng điểm AUDIT C:

- + Nam giới:  $\leq 4$  điểm.
- + Nữ giới:  $\leq 3$  điểm.

Sử dụng rượu ở mức độ có hại nếu tổng điểm AUDIT C:

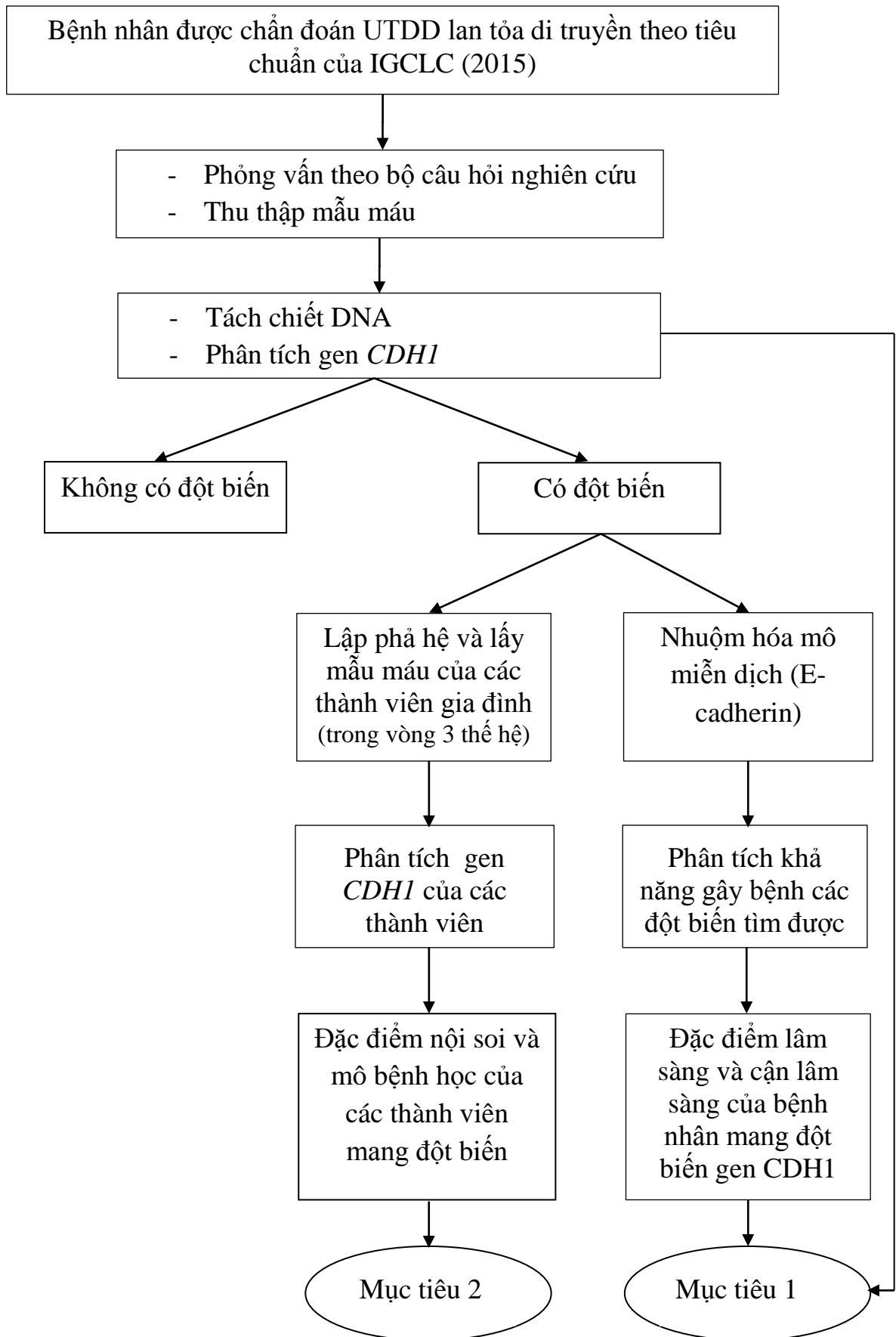
- + Nam giới:  $> 4$  điểm.
- + Nữ giới:  $> 3$  điểm.



Người uống rượu đến mức độ có hại trong nghiên cứu này chúng tôi gọi là có tiền sử uống rượu. Còn lại những bệnh nhân không uống rượu hoặc uống rượu ở mức hợp lý thì được gọi là không có tiền sử uống rượu.

- ❖ Đặc điểm lâm sàng: Sử dụng hồ sơ bệnh án và bộ câu hỏi nghiên cứu (phụ lục 2).
- ❖ Đặc điểm về nội soi: Sử dụng hồ sơ bệnh án
  - Vị trí tổn thương
  - Loại tổn thương
  - Kích thước tổn thương qua nội soi
- ❖ Kết quả mô bệnh học của dạ dày: Sử dụng hồ sơ bệnh án  
Ung thư thể lan tỏa bao gồm ung thư biểu mô tế bào nhẵn hoặc ung thư biểu mô kém biệt hóa, kém kết dính.
- ❖ Xếp loại TNM, giai đoạn theo AJCC 2017 (trang 20):
  - Xếp loại khối u nguyên phát (T) dựa vào độ xâm lấn vi thể.
  - Xếp loại hạch bạch huyết (N) theo tình trạng di căn hạch vi thể.
  - Đánh giá di căn xa (M) theo lâm sàng, cận lâm sàng.
- ❖ Kết quả phân tích gen *CDH1*: làm thí nghiệm phân tích 16 exon và vùng nối exon – intron của gen *CDH1*.
- ❖ Kết quả phân tích hóa mô miễn dịch E-cadherin của các bệnh nhân mang đột biến.
- ❖ Lập phả hệ: Phỏng vấn bệnh nhân mang đột biến (hoặc người thân) để lập ra phả hệ gia đình trong vòng 3 thế hệ. Tiến hành lấy 2ml máu tĩnh mạch vào ống chống đông EDTA của các thành viên gia đình, để phân tích gen *CDH1* tại vị trí đoạn gen mà bệnh nhân mang đột biến.
- ❖ Kết quả nội soi và kết quả sinh thiết mẫu dạ dày ngẫu nhiên của các thành viên gia đình mang đột biến, tình trạng nhiễm *H.Pylori* (kết quả xét nghiệm *H. Pylori* qua nội soi bằng phương pháp test urease).

### 2.3.5. Sơ đồ nghiên cứu



### 2.3.6. Phương tiện nghiên cứu

#### 2.3.6.1. Dụng cụ

- Ống lấy máu chống đông EDTA
- Pipet và đầu côn các loại thể tích
- Ống eppendorf thể tích 1,5 ml và 0,2 ml

#### 2.3.6.2. Trang thiết bị

- Tủ lạnh, tủ âm sâu (Sanyo), lò vi sóng, nồi hấp ước, tủ sấy, cân điện tử
- Máy ly tâm để bàn Eppendorf (Đức), máy Voltex-Genie 2, máy ủ Thermomixer comfort
- Máy quang phổ kế đo nồng độ DNA Nano drop 2000C
- Máy PCR Mastercycler pro S của hãng Eppendorf (Đức)
- Máy điện di Consort EV243
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động Gel Doc-It2 Imager
- Máy Ventana BenchMark XT của hãng Roche
- Máy nội soi PENTAX i7010, ống soi mềm PENTAX EG27-I10
- Kim sinh thiết Endoaccess để sinh thiết mẫu mô dạ dày

#### 2.3.6.3. Hóa chất và sinh phẩm

- ❖ Hóa chất tách chiết DNA
  - Bộ kit tách DNA từ máu toàn phần: Exgene<sup>TM</sup> Blood SV Kit (Gene All, Korea)
    - Cồn tuyệt đối
- ❖ Hóa chất dùng cho PCR
  - Nước free DNA
  - Taq polymerase Master Mix 2X
  - Môi phản ứng của 16 exon (trình tự môi trong phần phụ lục 3)
- ❖ Hóa chất dùng cho điện di
  - Agarose
  - Dung dịch đệm TAE 10X

- Blue Loading Dye 10X
- Ethidium bromide
- Thang chuẩn DNA 100bp

❖ Hóa chất giải trình tự: sử dụng BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

❖ Hóa chất dùng làm hóa mô miễn dịch: VENTANA anti-E-cadherin (36) Mouse Monoclonal Primary Antibody.

❖ Thiết kế mồi: Thiết kế mồi đóng vai trò quyết định thành công của nghiên cứu. Mục đích của thiết kế mồi nhằm khuếch đại được toàn bộ 16 exon gen *CDH1* và vùng lân cận. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng mồi tự thiết kế, trình tự mồi cho các đoạn exon trong nghiên cứu được thiết kế đặc hiệu với các vùng trình tự đích mong muốn. Việc thiết kế mồi được tuân thủ chặt chẽ theo nguyên tắc thiết kế mồi [118] , [119] .

Trình tự gen *CDH1* được lấy trực tiếp từ trình tự FASTA trên kho dữ liệu NCBI thông qua phiên bản giới hạn phần mềm CLC Main Workbench 8.1.2. của hãng QIAGEN [120] . Trên phần mềm hiển thị rõ các vùng exon, các vùng mã hóa protein (coding DNA sequence), intron...

Nhóm nghiên cứu tiến hành thiết kế các cặp mồi bao trùm cả exon và một phần intron liền kề để đảm bảo các yêu cầu về chiều dài đoạn DNA đích:

(1) Có thể kiểm tra các đột biến ghép nối splicing cận kề nếu có.

(2) Đảm bảo khi giải trình tự bằng phương pháp Sanger có thể hạn chế những vùng tín hiệu nhiễu ban đầu có thể ảnh hưởng tới đoạn exon và rìa intron mong muốn.

(3) Thực hiện GTT trên hệ thống 3730 có thể giải được đoạn 1000bp, do đó đoạn đích mong muốn chiều dài dưới 1000bp.

Các đoạn mồi gợi ý được kiểm tra ngược lại từng cặp trên BLAST của NCBI so sánh với toàn bộ hệ gen người để kiểm tra độ đặc hiệu [118] . Trình tự mồi thiết kế nằm trong phụ lục 3.

### **2.3.7. Quy trình kỹ thuật phân tích đột biến gen CDH1**

#### **2.3.7.1. Quy trình tách chiết DNA từ máu toàn phần**

Sử dụng bộ kit tách DNA từ máu toàn phần: Exgene<sup>TM</sup> Blood SV Kit.

Quy trình tách chiết DNA gồm 5 bước cơ bản sau:

- Bước 1: Ly giải tế bào và nhân bởi muối chaotropic.
- Bước 2: Gắn acid nucleic lên màng silica.
- Bước 3: Rửa bỏ muối chaotropic và thành phần khác như protein polysaccharid.
- Bước 4: Làm khô bằng ly tâm.
- Bước 5: Rửa để giải phóng DNA ra khỏi màng silica.

#### **2.3.7.2. Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA**

- Đo độ tinh sạch và nồng độ DNA bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nano Drop.

- Lấy 1µl DNA tổng số tách được để đo trên máy Nano Drop. Kết quả mẫu DNA tách từ máu đạt tiêu chuẩn khi nồng độ >10ng/µl và độ tinh sạch  $A_{260}/A_{280} = 1,7 - 2,0$ .

#### **2.3.7.3. Điện di DNA và sản phẩm PCR**

Ngoài mục đích để kiểm tra chất lượng và ước lượng nồng độ DNA tách chiết được thì điện di còn được dùng để đánh giá kết quả phản ứng PCR, xem đoạn gen đó có được khuếch đại đúng kích thước không, có đặc hiệu không.

Sử dụng gel agarose 1,5% để đánh giá. Chất lượng DNA tốt khi vạch điện di rõ nét, băng gọn. Trong kiểm tra sản phẩm PCR, vạch điện di rõ nét, băng gọn, đúng kích thước đoạn cần khuếch đại.

#### 2.3.7.4. Kỹ thuật PCR khuếch đại đoạn gen CDH1

Dùng phản ứng PCR để khuếch đại đoạn DNA. Thành phần của phản ứng PCR được thể hiện trong bảng 2.1, chu kỳ nhiệt của các phản ứng PCR trong bảng 2.2.

*Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR*

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích (<math>\mu</math>l)</b>
Taq Master 2X	12,5
Môi xuôi	0,5
Môi ngược	0,5
DNA	1
Water nuclear free	10,5
Tổng thể tích	25

*Bảng 2.2. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR*

<b>Thời gian</b>	<b>Nhiệt độ</b>
5 phút	94°C
30 giây	94°C
30 giây	Tm (tùy vào môi)
30 giây	72°C
5 phút	72°C
$\infty$	10°C
Số chu kỳ	35 chu kỳ

Sau đó tiến hành điện di kiểm tra sản phẩm PCR: Lấy 3 $\mu$ l sản phẩm PCR, 1 $\mu$ l Loading Dye đã pha theo tỷ lệ, 1 $\mu$ l Water nuclear free điện di trên gel agarose 1,5% ở hiệu điện thế 120V trong 20 phút, sản phẩm sau khi điện di sẽ được nhuộm bằng ethidium bromide.

Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose được chụp trên máy chụp gel GelDoc-It.

#### 2.3.7.5. Quy trình giải trình tự gen

- Sản phẩm PCR sẽ được tinh sạch và tiến hành giải trình tự gen trực tiếp để xác định đột biến trên gen *CDH1*.

- Sử dụng phương pháp Sanger trên hệ thống máy ABI 3730 XL (Thermo Fisher) chạy với hóa chất BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

- Thành phần mẫu giải trình tự:

*Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR cho giải trình tự*

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích</b>
Big dye Terminator v3.1	1,0 $\mu$ L
Buffer Big dye 5X	1,5 $\mu$ L
Mồi xuôi hoặc mồi ngược (10 pmol/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L
Water nuclear free	6,5 $\mu$ L
DNA tinh sạch	0,5 $\mu$ L
<b>Tổng thể tích</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

*Bảng 2.4. Chu trình nhiệt phản ứng PCR cho giải trình tự*

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C - 2 phút		
2 – 24	95°C - 10 giây	50°C - 10 giây	60°C - 10 giây
25			60°C - 4 phút
Bảo quản sản phẩm ở 10°C			

- Đọc kết quả: Kết quả giải trình tự gen được thu thập và xử lý bằng phần mềm BioEdit 7.2.6 và ApE-A plasmid Editor 2.0.3, phần

mềm CLC Workbenches 8.0. Trình tự được so sánh trên GeneBank để phát hiện đột biến.

- Trình tự các Nucleotid được đọc bằng các tín hiệu huỳnh quang dựa trên nguyên tắc: mỗi loại Nucleotid được biểu thị bằng một màu khác nhau A: màu xanh lá cây, T: màu đỏ, G: màu đen, C: màu xanh dương. Bình thường mỗi một vị trí Nucleotid chỉ có 1 đỉnh sóng 1 màu, khi có sự biến đổi về Nucleotid thì đỉnh sóng có thể bị thay đổi bằng đỉnh sóng của Nucleotid khác. Trong trường hợp dị hợp tử, đỉnh sóng này có thể thêm một đỉnh sóng của Nucleotid khác.

- Xác định đột biến mới và khả năng gây bệnh của đột biến bằng phần mềm phân tích tin sinh học. Để dự đoán giá trị thay đổi của acid amin lên cấu trúc và/hoặc chức năng protein, một phân tích *in silico* được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán SIFT, công cụ Polyphen 2 và Mutation Taster. Nếu điểm SIFT nhỏ hơn 0,05 thì được phân loại là có khả năng ảnh hưởng đến chức năng protein. Polyphen 2 cũng là một công cụ để dự đoán tác động của việc thay thế acid amin lên cấu trúc và chức năng của protein, khả năng gây bệnh càng cao khi điểm đánh giá càng gần 1 (điểm từ 0 đến 1).

### **2.3.8. Thử nghiệm Clo-Test (Test urease) trong chẩn đoán nhiễm *H. Pylori***

❖ Nguyên tắc: Nhằm phát hiện men urease của vi khuẩn *H. Pylori*, men này có trong mẫu mô dạ dày sẽ làm biến đổi urease thành amoniac ( $\text{NH}_3$ ),  $\text{NH}_3$  làm môi trường thuốc thử có pH kiềm vì vậy làm đổi màu chất chỉ thị.

❖ Tiến hành: Bệnh phẩm sinh thiết lấy ở vùng hang vị dạ dày, cho bệnh phẩm vào ống nghiệm. Nhỏ 0,5ml dung dịch A và nhỏ tiếp 0,1ml dung dịch B vào mảnh sinh thiết. Ngâm mảnh sinh thiết trong hỗn hợp trên và chờ 5 – 10 phút thì đọc kết quả.

❖ Nhận định kết quả: Dung dịch đổi sang màu hồng cánh sen là test *H. Pylori* dương tính.



### 2.3.9. Quy trình kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch

Kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch protein E-cadherin được thực hiện trên trên mẫu mô dạ dày đã được đúc parafin ở bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền có mang đột biến gen *CDH1*.

#### 2.3.9.1. Quy trình xử lý tiêu bản hóa mô

Quy trình xử lý tiêu bản hoá mô miễn dịch theo các bước sau: Sử dụng kỹ thuật Biotin - Avidin Complex (ABC).

*Bảng 2.5. Quy trình xử lý tiêu bản hóa mô miễn dịch*

1. Bệnh phẩm được cắt dày 4µm, dàn trên các lam kính phủ silane.	10. Rửa TBS 3 lần, mỗi lần 5 phút.
2. Ủ qua đêm ở nhiệt độ 56°C.	11. Ủ kháng thể thứ hai 30 phút.
3. Tẩy nến bằng toluen và còn như nhuộm thông thường.	12. Rửa TBS 3 lần, mỗi lần 5 phút.
4. Rửa nước trong 5 phút.	13. Phủ ABC trong 30 phút.
5. Bộc lộ kháng nguyên bằng nhiệt: đặt tiêu bản trong dung dịch citrate nồng độ 0,01mol/l, pH = 6,0, đun sôi trong nồi áp suất trong 5 phút.	14. Rửa TBS 3 lần trong 5 phút.
6. Rửa nước cất trong 5 phút.	15. Ủ với DAB trong 10 phút.
7. Khử peroxidase nội sinh bằng H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> trong 10 phút.	16. Rửa nước chảy x 5 phút.
8. Rửa nước cất trong 5 phút.	17. Nhuộm nhân với Hematoxylin x 30 giây.
9. Ủ kháng thể thứ nhất 1 giờ.	18. Tẩy nước, phủ lamen.

### 2.3.9.2. Nhận định kết quả

- Dương tính: có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên tế bào và mô, được hiển thị bằng màu vàng nâu. Phản ứng dương tính ở màng tế bào được chia làm 2 mức: Nếu biểu hiện nhuộm màng mạnh tương tự như các tế bào bình thường ở > 90% các tế bào khối u thì kết quả dương tính (++), nếu biểu hiện nhuộm màng giảm đáng kể so với các tế bào bình thường và/hoặc nhuộm không đồng nhất ở 10% - 90% tế bào khối u thì kết quả là dương tính yếu (+) [121] , [122] .

- Âm tính: Nếu biểu hiện nhuộm màng bị mất hoàn toàn hoặc dương tính trong < 10% tế bào khối u [121] , [122] .

- Nhân tế bào bắt màu xanh tím của Hematoxylin.

- Kết quả hóa mô miễn dịch được kiểm tra chéo bởi 2 bác sĩ chuyên ngành giải phẫu bệnh.

### 2.4. Xử lý và phân tích số liệu

- Số liệu được quản lý và xử lý bằng phần mềm SPSS16.0

- Sử dụng các test thống kê, mô tả bao gồm tần số, tỷ lệ phần trăm, kiểm định T-test, kiểm định Fisher's Exact-Test, kiểm định Chi-Square Test.

- Kết quả giải trình tự gen được xử lý bằng phần mềm BioEdit 7.2.6, ApE-A plasmid Editor 2.0.3 và phần mềm CLC Workbenches 8.0, sau đó trình tự được so sánh trên GeneBank để phát hiện đột biến.

- Xác định đột biến mới và khả năng gây bệnh của đột biến bằng phần mềm phân tích tin sinh học Polyphen-2, SIFT và Mutation Taster.

- Áp dụng phương pháp lập phả hệ và sử dụng các ký hiệu lập phả hệ theo đúng quy định.

### 2.5. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

- Nghiên cứu được thông qua Hội đồng đạo đức của trường Đại học Y Hà Nội theo quyết định số 198/HĐĐĐĐHYHN ngày 21 tháng 9 năm 2016.

- Nghiên cứu lấy mẫu ở các cơ sở y tế đều được sự đồng ý của Phòng Kế hoạch tổng hợp Bệnh viện.

- Các bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều được giải thích rõ ràng về lợi ích, quyền lợi cũng như rủi ro nếu có. Các đối tượng tham gia nghiên cứu là hoàn toàn tự nguyện và có quyền rút khỏi nghiên cứu. Các thông tin liên quan đến bệnh nhân được đảm bảo bí mật.

- Việc tiến hành nghiên cứu được thực hiện theo đúng mục tiêu nghiên cứu, phục vụ cho sự nghiệp khoa học và chăm sóc sức khỏe nhân dân.

## Chương 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong thời gian làm nghiên cứu từ 2016 đến 2020 chúng tôi đã tiến hành phỏng vấn, lấy mẫu và phân tích gen *CDH1* của 45 bệnh nhân được chẩn đoán ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, và lấy được mẫu của 36 thành viên trong gia đình 4 bệnh nhân mang đột biến để thực hiện phân tích gen. Kết quả thu được như sau:

#### 3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

##### 3.1.1. Đặc điểm về tuổi, giới, tiền sử bệnh và yếu tố nguy cơ

*Bảng 3.1. Phân loại đối tượng nghiên cứu theo tiêu chuẩn IGCLC 2015*

Tiêu chuẩn chẩn đoán IGCLC 2015	n (%)	Tuổi phát hiện bệnh trung bình (phạm vi)	Số bệnh nhân phát hiện đột biến gen <i>CDH1</i> (%)
1. Gia đình có từ 2 người trở lên bị UTDD có quan hệ họ hàng bậc 1 hoặc bậc 2 bất kể lứa tuổi, trong đó có ít nhất một trường hợp chẩn đoán UTDD lan tỏa.	8 (17,8%)	39,6 (23 – 52)	1 (12,5%)
2. Một trường hợp UTDD lan tỏa chẩn đoán trước 40 tuổi.	37 (82,2%)	33,9 (21 – 40)	3 (8,1%)
3. Gia đình có trường hợp bị UTDD lan tỏa và ung thư vú thùy, trong đó có một trường hợp chẩn đoán trước 50 tuổi.	0 (0%)	0	0 (0%)

Dựa trên tiêu chuẩn chẩn đoán của Hiệp hội liên kết ung thư dạ dày thế giới (IGCLC) 2015, cho thấy trong 45 bệnh nhân tham gia nghiên cứu có 8 bệnh nhân chiếm 17,8% thỏa mãn tiêu chí 1, với tuổi trung bình phát hiện

bệnh 39,6 tuổi và 1 bệnh nhân phát hiện đột biến gen *CDH1*. Có 37 bệnh nhân chiếm 82,2% thỏa mãn tiêu chí 2, với tuổi trung bình 33,9 tuổi và 3 bệnh nhân trong nhóm này phát hiện mang đột biến gen *CDH1*. Không có bệnh nhân nào thỏa mãn tiêu chí 3 trong 45 bệnh nhân nghiên cứu.

*Bảng 3.2. Phân bố tuổi và giới của bệnh nhân tham gia nghiên cứu*

Nhóm tuổi	Nam		Nữ		Tổng		p*
	n	%	n	%	n	%	
≤ 40	19	42,2	21	46,7	40	88,9	0,35
> 40	4	8,9	1	2,2	5	11,1	
<b>Tổng</b>	23	51,1	22	48,9	45	100	

\* Fisher's Exact-Test

Theo tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh của IGCLC năm 2015 và theo tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân trong nghiên cứu, tuổi được phân ra 2 nhóm là: đối tượng bị bệnh ≤ 40 tuổi và đối tượng bị bệnh > 40 tuổi với tiền sử gia đình có người mắc bệnh UTDD. Phân bố 2 nhóm tuổi này ở bảng 3.2 cho thấy nhóm tuổi thường gặp nhất ở cả 2 giới là ≤ 40 tuổi chiếm 88,9%, trong đó nam chiếm 42,2%, nữ 46,7%. Tỷ lệ nhóm tuổi ≤ 40 ở nam và nữ khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,35$ . Về phân bố theo giới trong nghiên cứu cho thấy có 23 nam và 22 nữ, tỷ lệ nam/nữ  $\approx 1/1$ .

*Bảng 3.3. Mối liên quan giữa tuổi phát hiện bệnh với giới tính*

Tuổi	Giới tính		p*
	Nam (n=23)	Nữ (n=22)	
$\bar{X} \pm SD$ (Min – Max)	36,74 ± 6,58 (21 – 52)	32,86 ± 5,52 (23 – 41)	0,04
	34,89 ± 6,37 (n=45) (21 – 52)		

*\*Phân phối chuẩn, kiểm định T-test*

Kết quả bảng trên cho thấy tuổi trung bình phát hiện bệnh của các bệnh nhân bị ung thư dạ dày lan tỏa di truyền trong nghiên cứu là  $34,89 \pm 6,37$ . Trong đó thấp nhất là 21 tuổi, cao nhất là 52 tuổi. Tuổi phát hiện bệnh trung bình ở nam là  $36,74 \pm 6,58$  cao hơn ở nữ là  $32,86 \pm 5,52$  tuổi. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,04$ .

*Bảng 3.4. Tiền sử cá nhân, gia đình và một số yếu tố nguy cơ*

<b>Đặc điểm</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Tiền sử đau thượng vị</b>		
Có	28	62,2
Không	17	37,8
<b>Tiền sử HP dương tính</b>		
Có	17	37,8
Không	28	62,2
<b>Tiền sử gia đình</b>		
Có người bị UTDD	8	17,8
Có người bị ung thư khác	7	15,6
Không có ai bị ung thư	30	66,7
<b>Tiền sử uống rượu</b>		
Có	8	17,8%
Không	37	82,2%
<b>Hút thuốc lá</b>		
Có	12	26,7%
Không	33	73,3%
<b>Kết hợp cả 2 đặc điểm có uống rượu và hút thuốc lá</b>		
Có sử dụng rượu và có hút thuốc lá	4	8,9%

Bảng 3.4 mô tả về tiền sử cá nhân và gia đình của các bệnh nhân tham gia nghiên cứu. Các bệnh nhân có tiền sử đau thượng vị chiếm 62,2%, tiền sử nhiễm *H. pylori* dương tính chiếm 37,8%. Về tiền sử gia đình có 17,8% người nhà bị ung thư dạ dày và 15,6% bị ung thư khác. Số bệnh nhân có tiền sử uống rượu chiếm 17,8%, có hút thuốc lá chiếm 26,7%. Tuy nhiên chỉ có 4/45 bệnh nhân có cả 2 yếu tố nguy cơ là có tiền sử uống rượu và hút thuốc lá chiếm 8,9%.

### 3.1.2. Đặc điểm lâm sàng

Các triệu chứng trong UTDD lan tỏa di truyền cũng giống như UTDD, biểu hiện lâm sàng trong giai đoạn sớm thường mơ hồ và không đặc hiệu.

*Bảng 3.5. Lý do vào viện của đối tượng nghiên cứu*

<b>Triệu chứng</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Đau thượng vị</b>	36	80
<b>Gầy sút cân</b>	17	37,8
<b>Buồn nôn/nôn</b>	17	37,8
<b>Chán ăn</b>	7	15,6
<b>Nuốt nghẹn</b>	2	4,4
<b>Thiếu máu</b>	3	6,7
<b>Xuất huyết tiêu hóa</b>	13	28,9
<b>Bụng chướng</b>	5	11,1
<b>Hạch thượng đòn</b>	2	4,4

Triệu chứng lâm sàng hay gặp nhất khiến bệnh nhân vào viện là đau thượng vị xuất hiện ở 36/45 bệnh nhân chiếm 80%, tiếp đến là triệu chứng buồn nôn/nôn chiếm 37,8%. Các triệu chứng như nuốt nghẹn, thiếu máu chiếm tỷ lệ thấp lần lượt là 4,4% và 6,7%. Có 13/45 trường hợp xuất huyết tiêu hóa chiếm 28,9%, chán ăn chiếm 15,6%. Trong khi đó các biểu hiện ở

giai đoạn muộn ảnh hưởng đến toàn thân như gầy sút cân chiếm 37,8%, hạch thượng đòn chiếm 4,4%.

*Bảng 3.6. Thời gian xuất hiện triệu chứng đầu tiên đến khi vào viện*

<b>Thời gian xuất hiện</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p*</b>
<b>&lt; 6 tháng</b>	38	84,4	0,00
<b>6 – 12 tháng</b>	7	15,6	
<b>&gt; 12 tháng</b>	0	0	
<b>Tổng</b>	45	100	

\* *Chi-Square Test*

Bảng 3.6 mô tả thời gian từ khi xuất hiện triệu chứng đầu tiên đến khi bệnh nhân vào viện. Thời gian trung bình là 3,5 tháng, trong đó thời gian sớm nhất mà bệnh nhân vào viện là < 1 tháng và muộn nhất là 12 tháng. Nhóm bệnh nhân có thời gian từ khi xuất hiện triệu chứng trong vòng 6 tháng chiếm đa số (84,1%). Không có bệnh nhân nào có thời gian xuất hiện triệu chứng trên 12 tháng. Tỷ lệ những bệnh nhân vào viện từ khi xuất hiện triệu chứng < 6 tháng và > 6 tháng là có sự khác nhau với  $p < 0,05$ .



### 3.1.3. Đặc điểm tổn thương dạ dày qua nội soi

Bảng 3.7. Đặc điểm tổn thương dạ dày qua nội soi

Đặc điểm tổn thương	n	%
<b>Vị trí</b>		
Tâm vị	2	4,4
Thân vị	18	40,0
Hang – môn vị	25	55,6
Tổng	45	100
<b>Kích thước (cm)</b>		
< 1	3	6,8
1 – 2	11	24,4
2 – 3	11	24,4
>3	20	44,4
Tổng	45	100
<b>Tính chất đại thể</b>		
Loét	26	57,8
Sùi	9	20,0
Thâm nhiễm	5	11,1
Loét thâm nhiễm	5	11,1
Tổng	45	100

Bảng 3.7 mô tả về đặc điểm tổn thương dạ dày qua nội soi cho thấy vị trí tổn thương hay gặp nhất là vùng hang – môn vị (chiếm 55,6%), tiếp đến là thân vị (40,0%), vùng tâm vị chiếm tỷ lệ thấp nhất 4,4%. Về kích thước tổn thương chủ yếu gặp trong nhóm nghiên cứu là >3cm chiếm 44,4%, kích thước từ 1 – 2cm và 2 – 3cm chiếm tỷ lệ như nhau là 24,4% và chỉ có 3 trường hợp có kích thước <1cm chiếm 6,8%. Tổn thương đại thể dạng loét chiếm tỷ lệ cao nhất

với 57,8%, thể sùi là 20,0%, tổn thương thâm nhiễm và loét thâm nhiễm chiếm tỷ lệ như nhau là 11,1%.

### 3.1.4. Phân loại giai đoạn bệnh theo TNM (UICC 2018)

Bảng 3.8. Phân loại giai đoạn bệnh theo TNM

Giai đoạn	n	%
I	8	17,8
II	16	35,5
III	12	26,7
IV	9	20,0
Tổng	45	100

Phân tích kết quả mô bệnh học của đối tượng nghiên cứu áp dụng theo phân loại TNM cho thấy, số bệnh nhân giai đoạn II có tỷ lệ cao nhất với 35,5%, giai đoạn III là 26,7%, giai đoạn IV di căn xa có tỷ lệ là 20%. Trong đó số bệnh nhân ở giai đoạn I chiếm tỷ lệ thấp nhất là 17,8%.

## 3.2. Kết quả phân tích gen *CDH1* của đối tượng nghiên cứu

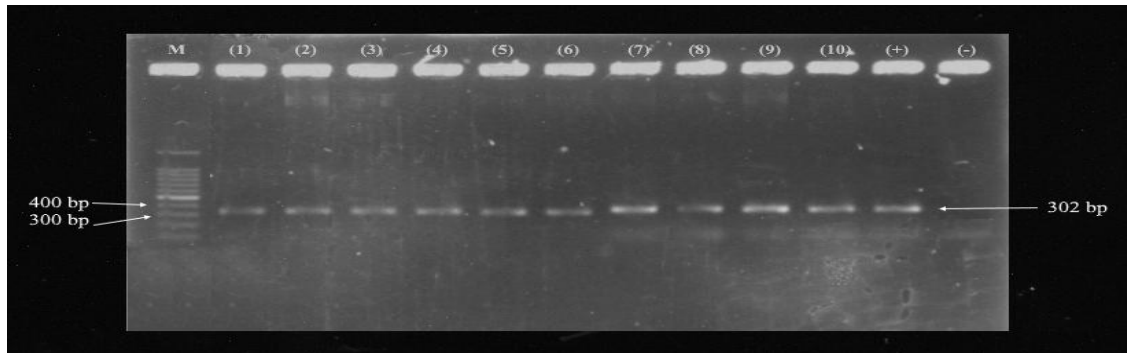
### 3.2.1. Kết quả tách chiết DNA và phản ứng PCR khuếch đại các exon của gen *CDH1*

Mẫu DNA của 45 bệnh nhân được tách chiết bằng bộ kit tách DNA từ máu toàn phần. Sau khi tách chiết, các mẫu DNA được kiểm tra nồng độ, độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nanodrop. Kết quả cho thấy, các mẫu DNA đều có độ tinh sạch cao với tỷ số đo mật độ quang ở bước sóng 260/280nm đều nằm trong khoảng 1,7 – 2,0 và nồng độ DNA sau khi tách chiết đều đạt yêu cầu để tiến hành các bước tiếp theo (phụ lục 1).

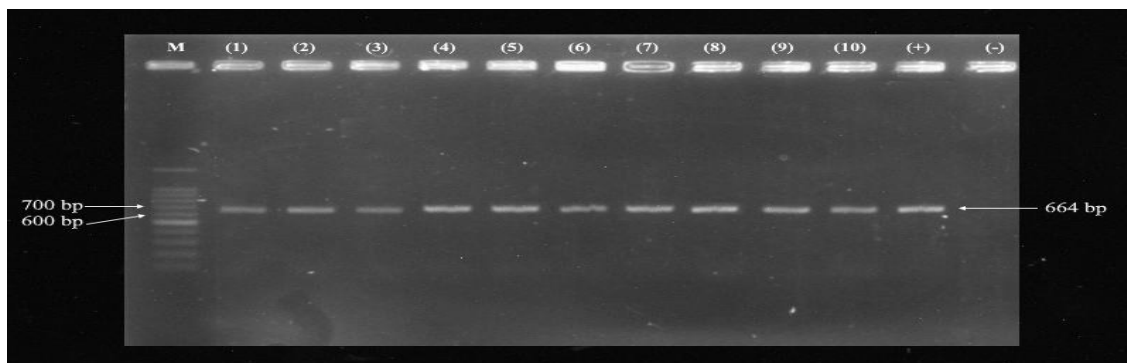
Sử dụng 16 cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại toàn bộ 16 exon của gen *CDH1*. Kích thước của các sản phẩm PCR trong khoảng 242 – 840 bp. Sản phẩm sau khi khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,5% để kiểm tra. Hình

3.1 là hình ảnh minh họa kết quả PCR khuếch đại exon 9 và exon 13 của gen *CDH1*.

A



B



**Hình 3.1. Kết quả PCR exon 9 (A) và exon 13 (B) của gen *CDH1*, (-): chứng âm, (+): chứng dương, M: ladder thang chuẩn 100 bp.**

Sản phẩm PCR thu được chỉ có 1 băng đặc hiệu, rõ nét, không có sản phẩm phụ. Mẫu đối chứng âm không có sản phẩm khuếch đại chứng tỏ trong quá trình làm không bị nhiễm sản phẩm ngoại lai. Các mẫu cần khuếch đại có kích thước tương ứng với chứng dương. Sản phẩm khuếch đại PCR đảm bảo cho phản ứng giải trình tự tiếp theo để phát hiện đột biến điểm.

### 3.2.2. Kết quả phát hiện đột biến và SNP của gen *CDH1*

Sau khi được khuếch đại, sản phẩm PCR tiếp tục được giải trình tự để phát hiện đột biến và SNP trên gen *CDH1*. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng các phần mềm và so sánh với trình tự trên GeneBank để phát hiện đột biến. Kết quả có 4 đột biến điểm và 11 SNP tìm thấy trong nghiên cứu lần lượt được trình bày chi tiết trong các bảng sau đây.

### 3.2.2.1. Các SNP của gen *CDH1* được tìm thấy trong nghiên cứu

Bảng 3.9. Các SNP được tìm thấy trong nghiên cứu

STT	Exon/ Intron	Thay đổi Nucleotid	Thay đổi acid amin	SNP	n (%)
1	Intron 1	c.48+6C>T	-	rs3743674	39 (86,67%)
2	Intron 7	c.1008+131delGins ATC	-	Mới	6 (13,33%)
3	Exon 8	c.1020G>A	T340T	rs61747632	1 (2,22%)
4	Intron 11	c.1711+47G>A	-	rs35667437	6 (13,33%)
5	Intron 11	c.1712-54dupT	-	Mới	1 (2,22%)
6	Exon 13	c.2076T>C	A692A	rs1801552	37 (82,22%)
7	Exon 13	c.2103C>T	V701V	rs730881656	1 (2,22%)
8	Intron 13	c.2164+17dupA	-	rs34939176	1 (2,22%)
9	Intron 13	c.2165-15C>A	-	rs552874184	1 (2,22%)
10	Exon 14	c.2253C>T	N751N	rs33964119	4 (8,89%)
11	Exon 16	c.2649+54C>T	-	rs1801026	6 (13,33%)

Bảng 3.9 trình bày các SNP của gen *CDH1* được tìm thấy trong 45 bệnh nhân tham gia nghiên cứu, có 39/45 (86,67%) bệnh nhân mang SNP c.48+6C>T (rs3743674) tại intron 1. Tiếp đó là SNP c.2076T>C (rs1801552) tại exon 13 xuất hiện ở 82,22% số bệnh nhân. SNP c.2253C>T (rs33964119) và c.2649+54C>T (rs1801026) xuất hiện ở 13,33% số bệnh nhân. Tất cả các bệnh nhân đều có ít nhất 1 SNP trên gen *CDH1*. Hơn 80% số bệnh nhân mang từ 2 SNP trở lên.

Trong 11 SNP xuất hiện trong nghiên cứu thì có 2 SNP là c.1008+131delGinsATC (intron 7) và c.1712-54dupT (intron 11) chưa được công bố ở các nghiên cứu trước đó trên thế giới. Có 6 bệnh nhân xuất hiện SNP mới c.1008+131delGinsATC và 1 bệnh nhân xuất hiện SNP mới c.1712-54dupT.

### 3.2.2.2. Các đột biến gen *CDH1* được tìm thấy trong nghiên cứu

Kết quả giải trình tự gen *CDH1* đã phát hiện ra 4 bệnh nhân mang đột biến trên gen *CDH1* lần lượt gồm: c.639 G>A (p.W213\*) nằm trên exon 5, c.1990 A>C (p.K664Q) nằm trên exon 13, c.1298 A>G (p.D433G) nằm trên exon 9 và c.1937-13 T>C nằm trên intron 12. Ngoài ra 4 bệnh nhân mang đột biến này đều kèm theo các SNP trên gen *CDH1*.

*Bảng 3.10. Đột biến và SNP của gen CDH1 tìm được ở 4 bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền*

Mã BN	Vị trí	Thay đổi nucleotid	Thay đổi acid amin	SNP	Loại đột biến	Đồng hợp/Dị hợp	Ghi chú
B4	Intron 1	c.48+6 C>T	-	rs3743674	-	Đồng hợp	Đã công bố
	<b>Exon 5</b>	<b>c.639 G&gt;A</b>	<b>W213*</b>	-	<b>Vô nghĩa</b>	<b>Dị hợp</b>	<b>Mới</b>
	Exon 13	c.2076 T>C	A692A	rs1801552	-	Dị hợp	Đã công bố
B151	Intron 1	c.48+6 C>T	-	rs3743674	-	Đồng hợp	Đã công bố
	<b>Exon 13</b>	<b>c.1990 A&gt;C</b>	<b>K664Q</b>	-	<b>Sai nghĩa</b>	<b>Dị hợp</b>	<b>Mới</b>
	Exon 13	c.2076 T>C	A692A	rs1801552	-	Đồng hợp	Đã công bố
B532	Intron 1	c.48+6 C>T	-	rs3743674	-	Đồng hợp	Đã công bố
	Intron 7	c.1008+131delGinsATC	-	-	-	-	Mới
	<b>Exon 9</b>	<b>c.1298A&gt;G</b>	<b>D433G</b>	-	<b>Sai nghĩa</b>	<b>Dị hợp</b>	<b>Mới</b>
	Intron 11	c.1711+47G>A	-	rs35667437	-	Dị hợp	Đã công bố
	Exon 13	c.2076 T>C	A692A	rs1801552	-	Dị hợp	Đã công bố
B732	Intron 1	c.48+6 C>T	-	rs3743674	-	Đồng hợp	Đã công bố
	Intron 7	c.1008+131delGinsATC	-	-	-	-	Mới
	<b>Intron 12</b>	<b>c.1937-13T&gt;C</b>	-	-	<b>Mới nổi</b>	<b>Dị hợp</b>	<b>Đã công bố</b>
	Exon 13	c.2076 T>C	A692A	rs1801552	-	Đồng hợp	Đã công bố

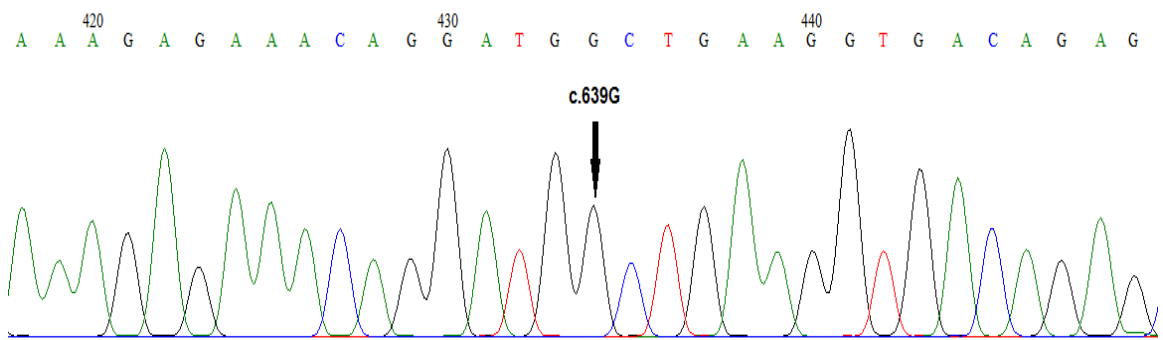
*Phân in đậm thể hiện các đột biến được phát hiện trong nghiên cứu  
SNP: đa hình đơn*

Nghiên cứu phát hiện được 4/45 bệnh nhân bị ung thư dạ dày lan tỏa di truyền có đột biến trên gen *CDH1*, gồm một đột biến vô nghĩa, hai đột biến sai nghĩa và một đột biến tại vị trí nối giữa intron với exon. Các đột biến này

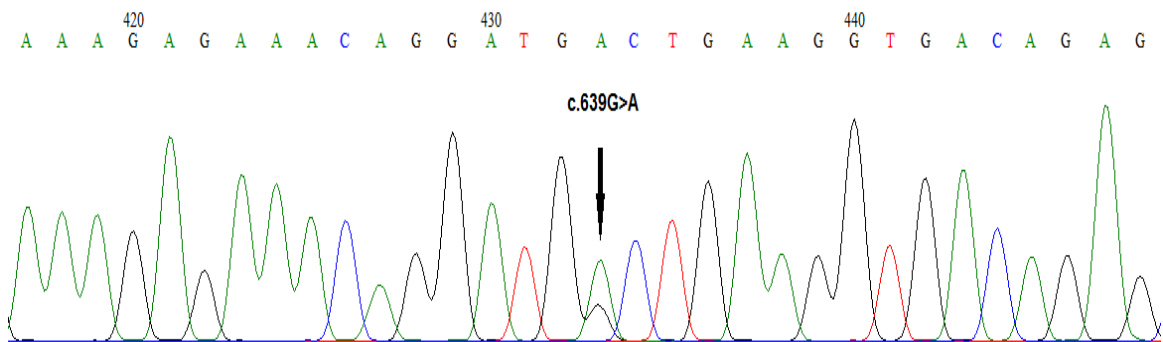
đều ở dạng dị hợp tử. Có 3 đột biến mới chưa từng được công bố, chỉ có đột biến c.1937-13T>C đã công bố và là đột biến gây bệnh.

Bảng 3.10 cho thấy 4 bệnh nhân ngoài mang đột biến gen thì kèm theo có cả một số SNP của gen *CDHI*. Trong đó, bệnh nhân B532 mang đột biến c.1298 A>G và SNP c.1008+131delGinsATC đều chưa được công bố trước đó. Bệnh nhân B732 mang đột biến c.1937-13 T>C đã được công bố là đột biến gây bệnh với 3 SNP đi kèm trong đó có 1 SNP chưa được công bố là c.1008+131delGinsATC. Hình ảnh giải trình tự của các SNP nằm trong phụ lục 5.

❖ **Đột biến vô nghĩa c.639G>A (p.W213\*)**



A. Bình thường

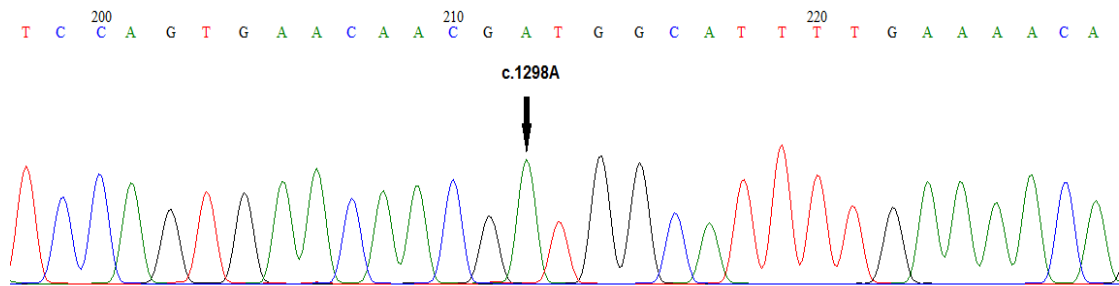


B. Bệnh nhân B4

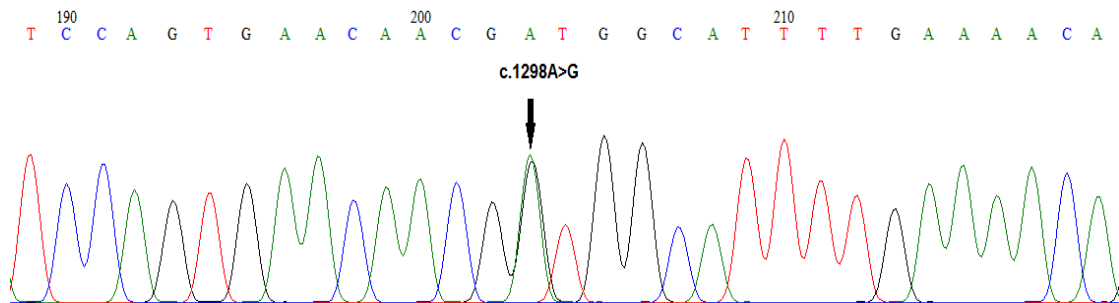
**Hình 3.2. Kết quả giải trình tự đoạn gen mang đột biến c.639G>A của bệnh nhân B4. Hình (A) là hình ảnh GTT đoạn gen bình thường. Hình (B) là hình ảnh GTT đoạn gen mang đột biến của bệnh nhân.**

Hình ảnh giải trình tự rõ nét, các đỉnh tương ứng với các nucleotid rõ ràng, không có tín hiệu nhiễu. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự trên Genebank cho thấy bệnh nhân mang mã số B4 có sự biến đổi ở vị trí c.639 từ nucleotid G thành A, khi tại vị trí c.639 xuất hiện 2 đỉnh sóng là màu xanh lá cây (A) và đỉnh màu đen (G). Sự biến đổi nucleotid G thành A tại vị trí c.639 trên DNA làm thay đổi bộ ba mã hóa từ TGG thành TGA tạo nên mã kết thúc sớm UGA tại vị trí p.213, đây là một đột biến vô nghĩa tạo mã kết thúc sớm nằm trên vùng mã hóa exon 5 của gen *CDH1*.

❖ **Đột biến sai nghĩa c.1298A>G (p.D433G)**



A. Bình thường



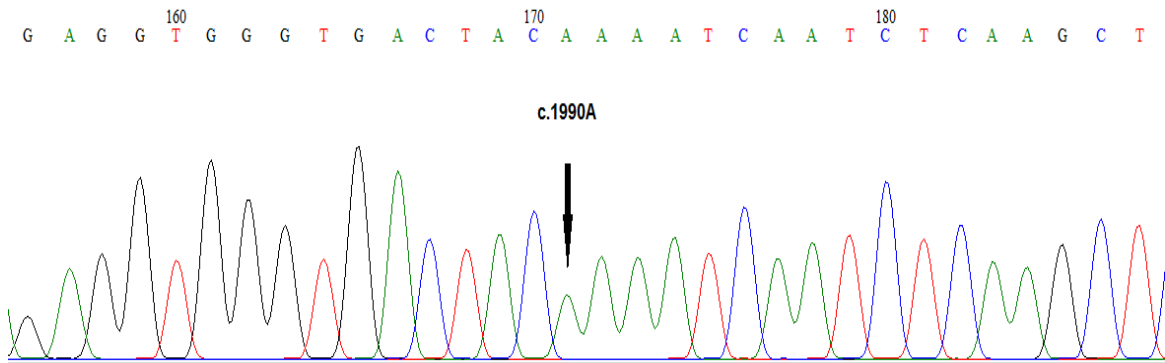
B. Bệnh nhân B532

**Hình 3.3. Kết quả giải trình tự đoạn gen mang đột biến c.1298A>G của bệnh nhân B532. Hình (A) là hình ảnh GTT đoạn gen bình thường. Hình (B) là hình ảnh GTT đoạn gen mang đột biến của bệnh nhân.**

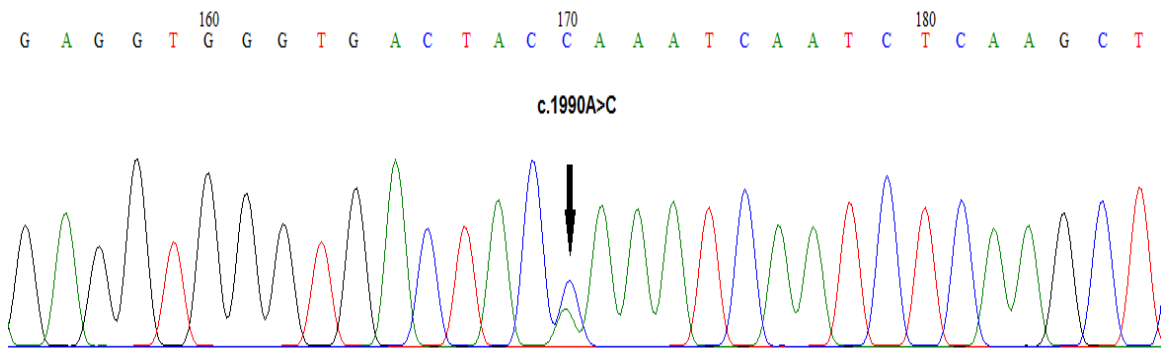
Hình ảnh giải trình tự rõ nét, các đỉnh tương ứng với các nucleotid rõ ràng, không có tín hiệu nhiễu. Kết quả giải trình tự được đối chiếu trên Genebank cho thấy bệnh nhân B532 có biến đổi ở vị trí c.1298 trên DNA từ nucleotid A thành G, khi tại vị trí c.1298 nằm trên exon 9 của bệnh nhân có 2

đỉnh sóng là màu xanh lá cây (A) và đỉnh sóng màu đen (G). Sự biến đổi này dẫn đến sự thay đổi acid amin từ aspartic (D) thành glycine (G) ở vị trí p.433 (p.D433G), đây là một đột biến sai nghĩa nằm trong vùng mã hóa exon 9 của gen *CDH1*.

❖ **Đột biến sai nghĩa c.1990A>C (p.K664Q)**



A. Bình thường



B. Bệnh nhân B151

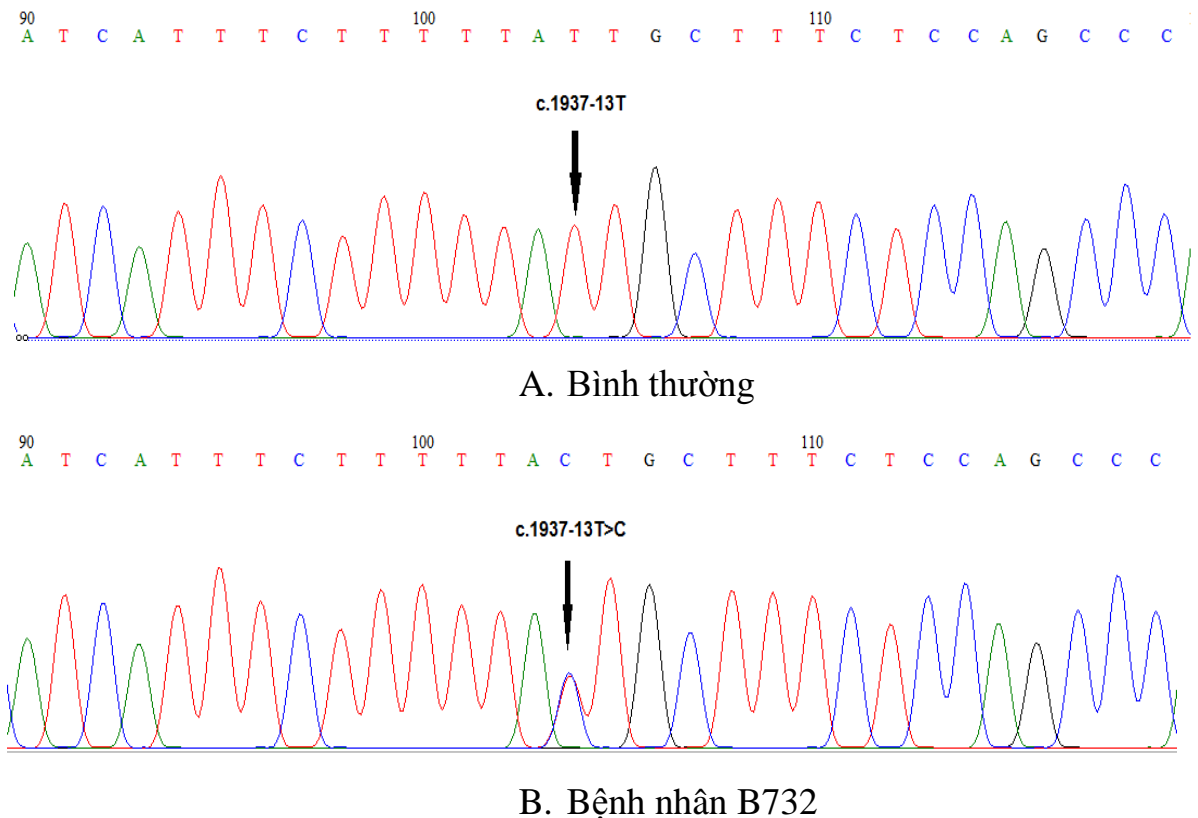
**Hình 3.4. Kết quả giải trình tự đoạn gen mang đột biến c.1990A>C của bệnh nhân B151. Hình (A) là hình ảnh GTT đoạn gen bình thường. Hình (B) là hình ảnh GTT đoạn gen mang đột biến của bệnh nhân.**

Hình ảnh giải trình tự gen trên bệnh nhân B151 rõ nét, không có tín hiệu nhiễu. Kết quả giải trình tự được đối chiếu với trình tự của Genbank cho thấy bệnh nhân B151 có biến đổi ở vị trí c.1990 trên DNA từ nucleotid A thành C, khi tại vị trí c.1990 nằm trên exon 13 có hai đỉnh sóng là đỉnh màu xanh dương (C) và đỉnh màu xanh lá cây (A). Sự biến



đôi này dẫn đến sự thay đổi acid amin ở vị trí p.664 từ lysine (K) thành glutamin (Q), đây là một đột biến sai nghĩa nằm trong vùng mã hóa exon 13 của gen *CDH1*.

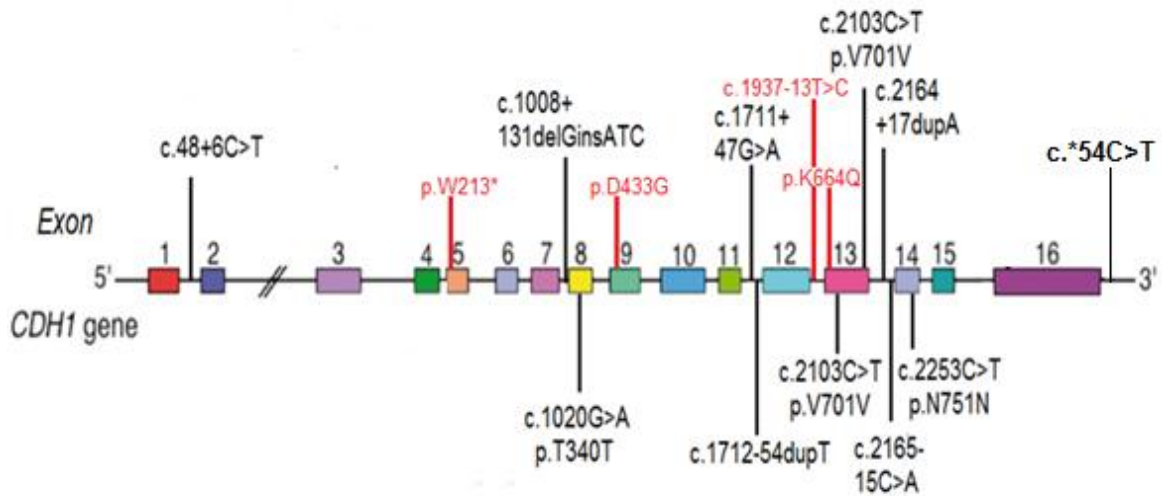
❖ **Đột biến vị trí nối c.1937-13T>C**



**Hình 3.5. Kết quả giải trình tự đoạn gen mang đột biến c.1937-13T>C của bệnh nhân B732. Hình (A) là hình ảnh GTT đoạn gen bình thường. Hình (B) là hình ảnh GTT đoạn gen mang đột biến của bệnh nhân.**

Hình ảnh giải trình tự gen của bệnh nhân B732 rõ nét, không có tín hiệu nhiễu. Kết quả giải trình tự gen được đối chiếu với trình tự trên Genbank cho thấy bệnh nhân B732 có biến đổi tại vị trí c.1937-13 nằm trên intron 12, từ nucleotid T chuyển thành C, khi hình ảnh giải trình tự tại vị trí c.1937-13 có hai đỉnh sóng là đỉnh màu xanh dương (C) và đỉnh màu đỏ (T). Sự biến đổi này nằm tại vị trí nối giữa intron 12 và exon 13. Đây là một đột biến đã được công bố và là đột biến gây bệnh.

### ❖ Phân bố đột biến và SNP tìm được trong nghiên cứu



**Hình 3.6. Phân bố đột biến và SNP trên gen CDH1**

*Các chữ và số màu đỏ biểu thị các đột biến, màu đen biểu thị SNP*

Hình 3.6 là sơ đồ biểu diễn sự phân bố các đột biến và SNP của gen *CDH1* được phát hiện trong nghiên cứu này. Sơ đồ đã chỉ rõ: Các đột biến và SNP tìm được trải dài trên toàn bộ chiều dài gen *CDH1* gồm 16 exon. Trong đó khu vực exon 13 và intron 13 tập trung nhiều SNP và đột biến nhất, tiếp đến là ở intron 11 (với 2 SNP). Các khu vực khác như intron 1, intron 7, exon 8, exon 14 hay intron 16 đều chỉ có 1 SNP.

#### 3.2.2.3. Dự đoán khả năng gây bệnh của các đột biến mới tìm được trong nghiên cứu

Các đột biến được phát hiện trong nghiên cứu sẽ được tra cứu trên hệ thống dữ liệu đột biến có sẵn ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/CDH1>), để xác định đột biến đã công bố và khả năng gây bệnh. Đối với các đột biến mới, chúng tôi sử dụng các phần mềm dự đoán tin sinh học (*in silico*) để dự đoán khả năng gây bệnh.

Ba đột biến tìm được trong nghiên cứu là những đột biến chưa được công bố, trong đó có 2 đột biến sai nghĩa là c.1298A>G và c.1990A>C. Những đột biến này làm thay đổi trình tự acid amin nhưng không làm ảnh

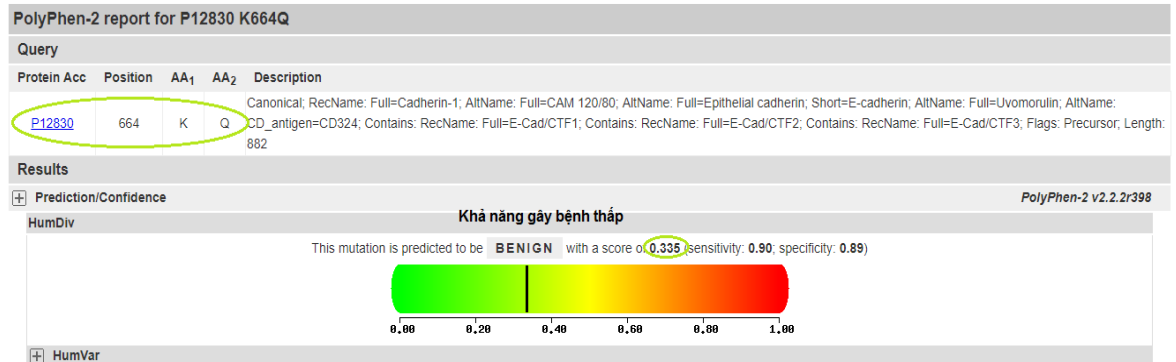
hưởng đến chiều dài của phân tử protein. Do đó, để dự đoán khả năng gây bệnh của 2 đột biến sai nghĩa này chúng tôi đã sử dụng các công cụ phân tích *in silico* bằng cách dùng phần mềm Mutation Taster, SIFT và công cụ Polyphen 2.

*Bảng 3.11. Dự đoán khả năng gây bệnh của các đột biến sai nghĩa*

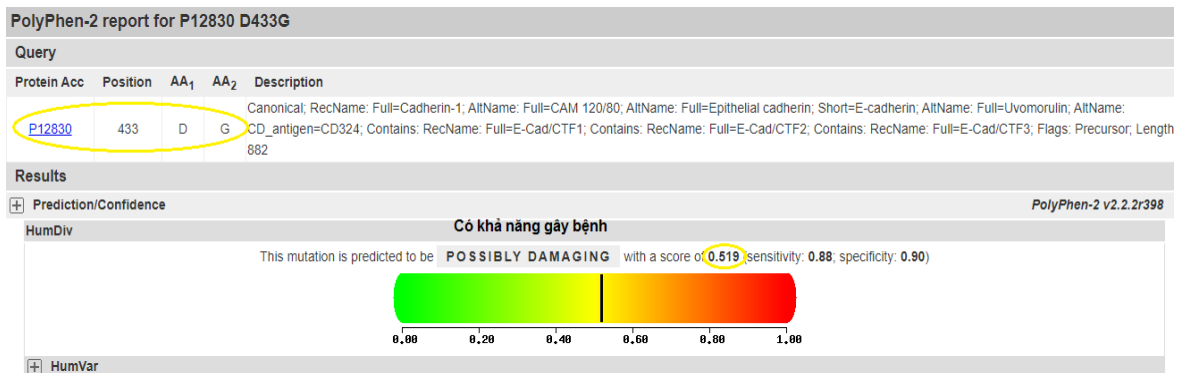
Mã BN	Thay đổi Nucleotid (c.)	Thay đổi acid amin(p.)	SIFT		PolyPhen 2		Mutation Taster
			Điểm	Dự đoán	Điểm	Dự đoán	Dự đoán
B151	c.1990 A>C	K664Q	0,08	Khả năng gây bệnh mức độ thấp	0,335	Khả năng gây bệnh mức độ thấp	Gây bệnh
B532	c.1298 A>G	D433G	0,04	Có khả năng gây bệnh	0,519	Có khả năng gây bệnh	Có thể lành tính

Kết quả khi sử dụng ba phần mềm dự đoán khả năng gây bệnh của 2 đột biến sai nghĩa mới trên gen *CDH1*, cho thấy đột biến c.1990A>C (p.K664Q) được dự đoán là khả năng gây bệnh ở mức độ thấp khi được phân tích bởi SIFT và PolyPhen 2, nhưng kết quả ở phần mềm Mutation Taster là có khả năng gây bệnh. Đột biến c.1298A>G (p.D433G) được dự đoán là có khả năng gây bệnh ở cả SIFT và PolyPhen 2, tuy nhiên phần mềm Mutation Taster cho kết quả dự đoán có thể lành tính.

A

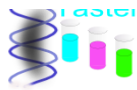


B



**Hình 3.7. Hình ảnh minh họa sử dụng công cụ Polyphen 2 trong dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến sai nghĩa. (A) kết quả của đột biến c.1990A>C ở bệnh nhân B151, (B) kết quả của đột biến c.1298A>G ở bệnh nhân B532**

Hình 3.7 mô tả kết quả dự đoán khả năng gây bệnh bằng công cụ Polyphen 2 với hai đột biến sai nghĩa được phát hiện trong nghiên cứu. Đột biến c.1990A>C làm thay đổi acid amin p.K664Q có khả năng gây bệnh thấp với điểm 0,335 (hình A). Đột biến c.1298A>G làm thay đổi acid amin p.D433G có khả năng gây bệnh với điểm 0,519 (hình B).



## mutation t@sting

Gây bệnh

**Prediction disease causing**

Model: complex\_aae, prob: 1 (classification due to NMD, [real probability](#) is shown anyway)

Summary

- NMD
- amino acid sequence changed
- protein features (might be) affected
- splice site changes

[hyperlink](#)

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr16:68842703G>A <a href="#">show variant in all transcripts</a> <a href="#">IGV</a>
HGNC symbol	<a href="#">CDH1</a>
Ensembl transcript ID	<a href="#">ENST00000261769</a>
Genbank transcript ID	<a href="#">NM_004360</a>
UniProt peptide	<a href="#">P12830</a>
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.639G>A cDNA_830G>A g.71576G>A
AA changes	W213* Score: 100 <a href="#">explain score(s)</a>

**Hình 3.8. Hình ảnh minh họa sử dụng công cụ Mutation Taster xác định khả năng gây bệnh của đột biến c.639G>A ở bệnh nhân B4**

Một đột biến chưa công bố được phát hiện trong nghiên cứu là c.639G>A (W213\*) tạo nên mã kết thúc sớm tại vị trí p.213 nằm trên exon 5, những đột biến tạo mã kết thúc sớm là đột biến gây bệnh. Hình 3.8 mô tả khả năng gây bệnh của đột biến c.639G>A bằng phần mềm Mutation Taster.

### **3.2.3. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu mang đột biến và SNP trên gen CDH1**

Trong số 45 bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền được tiến hành phân tích gen, chúng tôi đã phát hiện 4 bệnh nhân mang đột biến gen *CDH1*. Các đột biến này đều ở dạng dị hợp tử. Các bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều mang ít nhất 1 SNP, trên 80% mang từ 2 SNP trở lên. Về đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của các đối tượng nghiên cứu mang đột biến và SNP sẽ được chúng tôi trình bày chi tiết trong các bảng sau đây:

### 3.2.3.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân mang đột biến gen CDH1

Bảng 3.12. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân mang đột biến gen CDH1

Mã BN	Tuổi mắc bệnh	Giới	Số người bị UTDD trong gia đình	Tiền sử cá nhân		Yếu tố nguy cơ		Lý do vào viện	Thời gian xuất hiện triệu chứng	Thời gian sống* (tháng)
				Đau thượng vị	Tiền sử <i>H.Pylori</i> (+)	Rượu	Thuốc lá			
B4	28	Nam	0	Có	Có	Có	Có	- Đau thượng vị - Gầy sút cân - Hạch thượng đòn	4 tháng	4
B732	34	Nữ	0	Có	Có	Không	Không	- Đau thượng vị - Nôn	1 tháng	2
B151	35	Nữ	1	Không	Không	Không	Không	Thiếu máu	1 tháng	36 <sup>+</sup>
B532	27	Nam	0	Không	Không	Có	Có	Đau thượng vị	1 tháng	30 <sup>+</sup>

\*: Thời gian sống là thời gian tính từ lúc bệnh nhân được chẩn đoán bệnh đến khi tử vong.

+: Biểu thị bệnh nhân vẫn sống kể từ lúc chẩn đoán bệnh đến hết thời gian nghiên cứu.

Bảng 3.12 mô tả đặc điểm lâm sàng của 4 bệnh nhân tham gia nghiên cứu mang đột biến gen *CDH1*, cả 4 bệnh nhân đều có độ tuổi mắc bệnh < 40.

Bệnh nhân nam B4 với đột biến vô nghĩa tạo mã kết thúc sớm, không có tiền sử gia đình, mang đầy đủ các yếu tố nguy cơ và tiền sử cá nhân. Vào viện với các triệu chứng bệnh nặng và tử vong nhanh sau 4 tháng phát hiện bệnh.

Bệnh nhân nữ B732 mang đột biến gây bệnh đã được công bố, không có tiền sử gia đình mắc UTDD, tiền sử cá nhân có đau thượng vị và nhiễm *H.pylori*, không sử dụng rượu và thuốc lá, biểu hiện bệnh nặng khi vào viện, tử vong nhanh sau 2 tháng phát hiện bệnh.

Bệnh nhân nữ B151 mang đột biến sai nghĩa mới, có bố đẻ bị UTDD, bệnh nhân không có tiền sử bệnh cũng không có các yếu tố nguy cơ. Bệnh

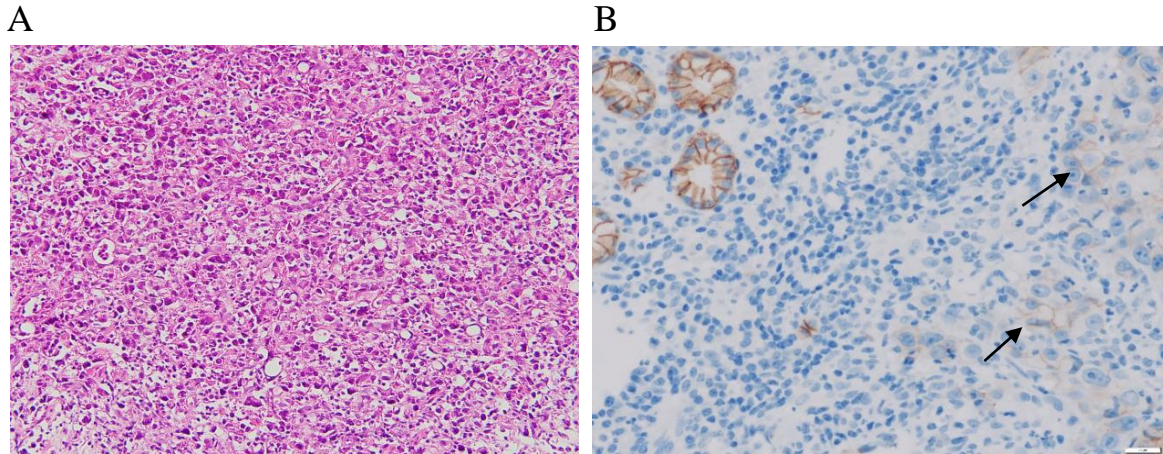
nhân nam B532 mang đột biến sai nghĩa mới, không có tiền sử gia đình, không có tiền sử cá nhân, có sử dụng rượu và thuốc lá. Hai bệnh nhân này vào viện với triệu chứng không đặc hiệu của UTDD đã được điều trị bệnh và hiện tại cả 2 bệnh nhân này vẫn sống.

*Bảng 3.13. Đặc điểm nội soi và mô bệnh học của bệnh nhân mang đột biến*

Mã BN	Hình ảnh nội soi			Phân loại TNM				HMMD E-cadherin
	Vị trí	Kích thước (cm)	Tính chất đại thể	T	N	M	Giai đoạn	
B4	Thân vị	>3	Sùi	T <sub>4</sub>	N <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	IV	Giảm biểu hiện
B732	Hang-môn vị	>3	Thâm nhiễm	T <sub>4</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	IV	Giảm biểu hiện rõ rệt
B151	Hang-môn vị	1-2	Loét	T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>	II	Biểu hiện bình thường
B532	Thân vị	2- 3	Sùi	T <sub>4a</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>	II	Giảm nhẹ biểu hiện

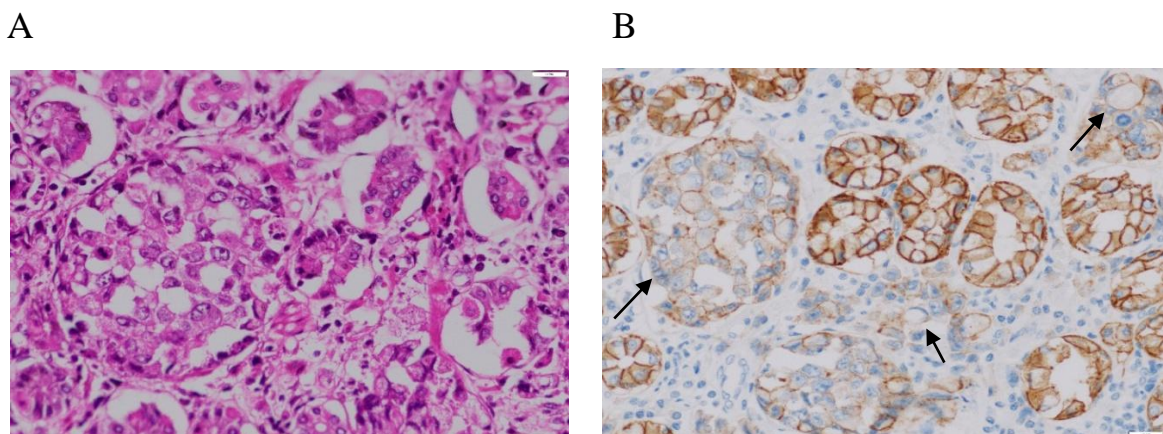
Về hình ảnh nội soi của 4 bệnh nhân mang đột biến, vị trí tổn thương ở thân vị có 2 bệnh nhân, ở vùng hang – môn vị có 2 bệnh nhân. Kích thước tổn thương > 3cm ở 2 bệnh nhân B732 và B4, cả 2 người này bệnh đã ở giai đoạn IV có di căn xa. Hai bệnh nhân còn lại có kích thước tổn thương < 3cm và được chẩn đoán bệnh khi ở giai đoạn II. Kết quả nhuộm HMMD protein E-cadherin có giảm biểu hiện ở 3 bệnh nhân, trong đó bệnh nhân B732 có giảm biểu hiện rõ rệt.

❖ *Hình ảnh vi thể nhuộm HE và nhuộm HMMD protein E-cadherin của các bệnh nhân mang đột biến gen CDH1*



**Hình 3.9.** Ảnh vi thể UTDD thể lan tỏa của bệnh nhân B4, (A) nhuộm HE x200, (B) nhuộm HMMD x400 với giảm biểu hiện E-cadherin ở tế bào u (mũi tên).

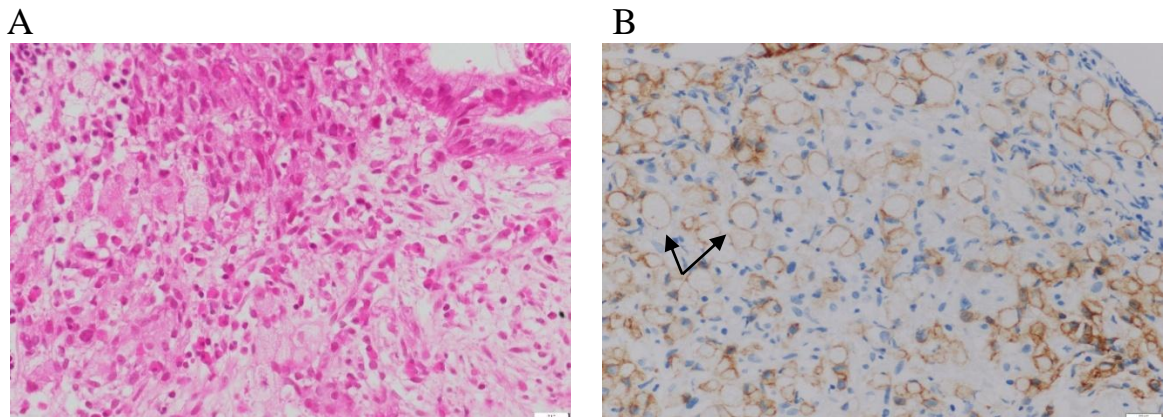
Bệnh nhân B4 mang đột biến tạo mã kết thúc sớm c.639G>A (p.W213\*), với kết quả mô bệnh học nhuộm HE là ung thư dạ dày thể lan tỏa. Nhuộm HMMD cho thấy sự giảm biểu hiện của protein E-cadherin ở các tế bào u, trong khi các tế bào ống tuyến bình thường cường độ biểu hiện E-cadherin vẫn giữ nguyên.



**Hình 3.10.** Ảnh vi thể UTDD thể lan tỏa của bệnh nhân B732, (A) nhuộm HE x400, (B) nhuộm HMMD x400 với biểu hiện E-cadherin giảm mạnh ở các tế bào u (mũi tên).

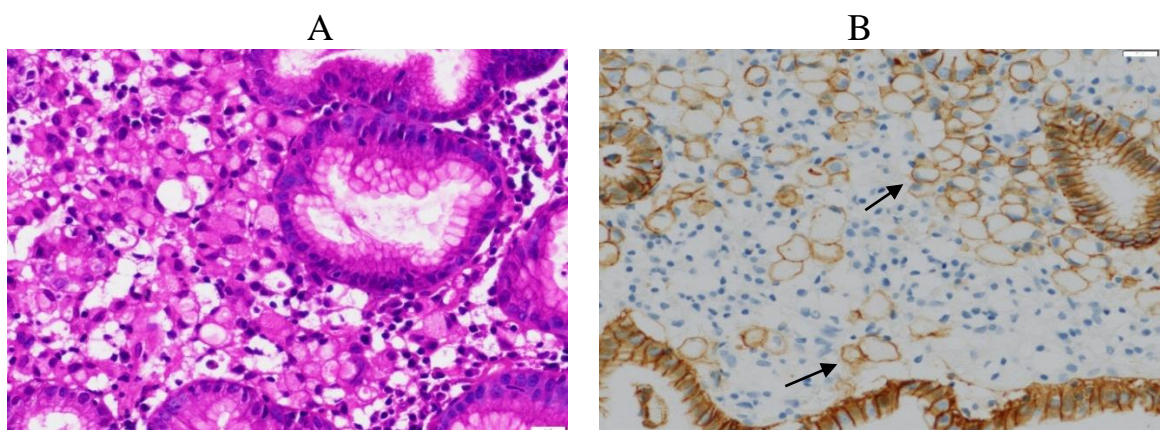


Bệnh nhân B732 mang đột biến gây bệnh c.1937-13T>C, kết quả mô bệnh học nhuộm HE là UTDD thể lan tỏa (UTBM tế bào nhẵn). Nhuộm HMMD có kết quả dương tính yếu (+), cho thấy có sự giảm mạnh biểu hiện của protein E-cadherin trên màng tế bào khối u.



**Hình 3.11. Ảnh vi thể UTDD thể lan tỏa bệnh nhân B532, (A) nhuộm HE x400, (B) nhuộm HMMD x400 với sự giảm biểu hiện E-cadherin ở các tế bào u (mũi tên).**

Bệnh nhân B532 mang đột biến sai nghĩa c.1298A>G (p.D433G), có kết quả mô bệnh học nhuộm HE là UTDD thể lan tỏa (UTBM tế bào nhẵn). Nhuộm HMMD cho kết quả dương tính (+), với cường độ biểu hiện E-cadherin giảm nhẹ biểu hiện bằng việc bắt màu nhạt hơn ở các tế bào u.



**Hình 3.12. Ảnh vi thể UTDD thể lan tỏa của bệnh nhân B151, (A) nhuộm HE x400, (B) nhuộm HMMD x400 với biểu hiện E-cadherin bình thường ở các tế bào u (mũi tên).**

Bệnh nhân B151 mang đột biến sai nghĩa c.1990A>C (p.K664Q), kết quả mô bệnh học nhuộm HE là UTDD thể lan tỏa (UTBM tế bào nhẵn), nhuộm HMMD cho kết quả dương tính (++), với sự bắt màu ở tế bào khối u đậm, rõ nét.

### 3.2.3.2. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân mang SNP

*Bảng 3.14. Phân bố SNP trên các bệnh nhân tham gia nghiên cứu*

Số lượng SNP		n	%
≤ 2	1	8	17,8
	2	21	46,6
>2	3	11	24,5
	4	5	11,1
<b>Tổng</b>		45	100

Bảng 3.14 mô tả sự phân bố SNP của các bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền trong nghiên cứu. Bệnh nhân mang 2 SNP có số lượng nhiều nhất là 21 bệnh nhân chiếm 46,6%. Có 5 bệnh nhân mang 4 SNP chiếm 11,1%. Khi chia số lượng SNP ra thành 2 nhóm thì nhóm có số SNP ≤ 2 có 29 bệnh nhân (64,4%), nhóm có số SNP >2 có 16 bệnh nhân (35,6%).

*Bảng 3.15. Đặc điểm lâm sàng và một số yếu tố nguy cơ*

Đặc điểm	≤ 2SNP (n=29)	> 2SNP (n=16)	p
<b>Tuổi</b>			
$\bar{X} \pm SD$	35,28 ± 5,48	34,19 ± 7,88	0,63*
<b>Giới</b>			
Nam	15 (51,7%)	8 (50%)	1,0**
Nữ	14 (48,3%)	8 (50%)	

<b>Tiền sử gia đình</b>			
Có người bị UTDD	5 (17,2%)	3 (18,8%)	0,90 <sup>***</sup>
Có người bị ung thư khác	4 (13,8%)	3 (18,8%)	
Không có ai bị ung thư	20 (69,0%)	10 (62,4%)	
<b>Tiền sử uống rượu</b>			
Có	6 (20,7%)	2 (12,5%)	0,69 <sup>***</sup>
Không	23 (79,3%)	14 (87,5%)	
<b>Hút thuốc lá</b>			
Có	8 (27,6%)	4 (25%)	1,0 <sup>***</sup>
Không	21 (72,4%)	12 (75%)	
<b>Tiền sử nhiễm <i>H.Pylori</i></b>			
Có	13 (44,8%)	4 (25,0%)	0,22 <sup>***</sup>
Không	16 (55,2%)	12 (75,0%)	
<b>Thời gian xuất hiện triệu chứng</b>			
< 6 tháng	25(86,2%)	13(81,2%)	0,68 <sup>***</sup>
6 – 12 tháng	4(13,8%)	3(18,8%)	
> 12 tháng	0(0%)	0(0%)	

\* Kiểm định T-test, \*\* Kiểm định  $\chi^2$  test, \*\*\* Fisher's Exact-test

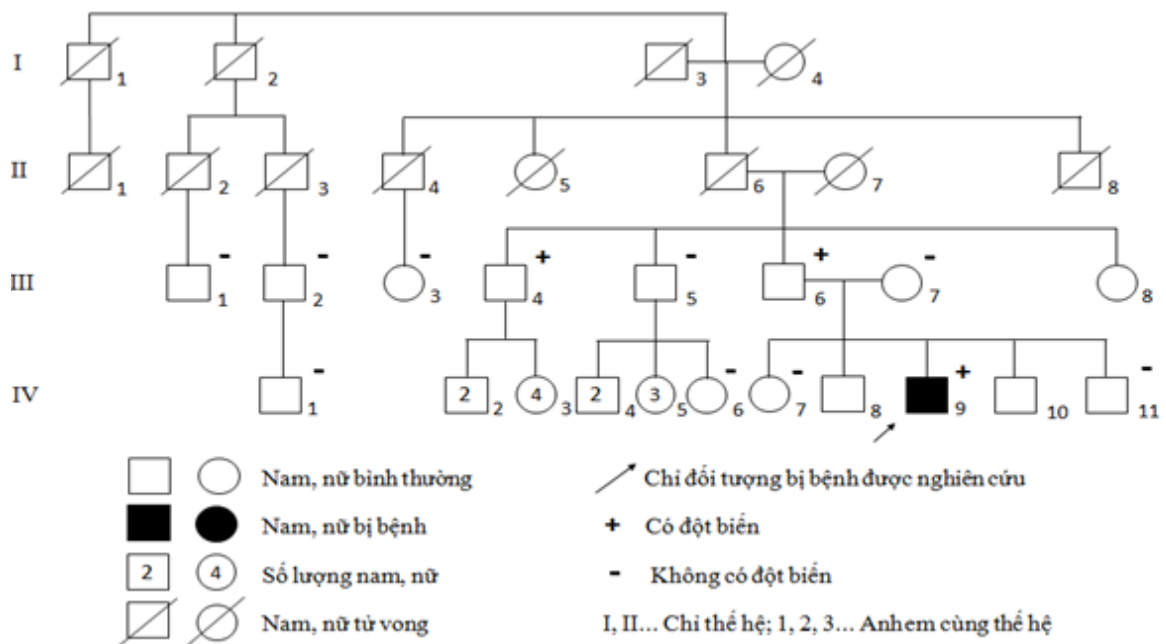
Kết quả bảng 3.15 mô tả một số đặc điểm về lâm sàng, tiền sử cá nhân, tiền sử gia đình và một số yếu tố nguy cơ gây bệnh của nhóm mang từ 2 SNP trở xuống và nhóm mang trên 2 SNP của gen *CDHI*. Bảng trên cũng cho thấy không có mối liên quan giữa các đặc điểm trên giữa nhóm  $\leq 2$ SNP và nhóm  $> 2$ SNP.

### 3.3. Xác định đột biến gen *CDH1* ở các thành viên trong gia đình bệnh nhân mang đột biến gen *CDH1*.

UTDD lan tỏa di truyền là một bệnh di truyền hiếm gặp, nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện ra 4/45 (8,89%) trường hợp bị bệnh mang đột biến gen *CDH1*. Nghiên cứu cũng lấy được 36 mẫu máu của các thành viên trong gia đình 4 bệnh nhân mang đột biến gen. Gia đình bệnh nhân B4, B732, B151, B532 lấy được số thành viên trong gia đình lần lượt là 11, 4, 10 và 11. Kết quả trong 4 gia đình đều có thành viên mang đột biến gen giống bệnh nhân.

#### 3.3.1. Phả hệ và kết quả phát hiện đột biến gen *CDH1* ở các thành viên trong gia đình.

##### ❖ Phả hệ gia đình bệnh nhân B4



Đối tượng bị bệnh được nghiên cứu IV-9 (bệnh nhân B4) hiện đã tử vong.

#### Hình 3.13. Phả hệ và kết quả phân tích gen *CDH1* của gia đình bệnh nhân B4

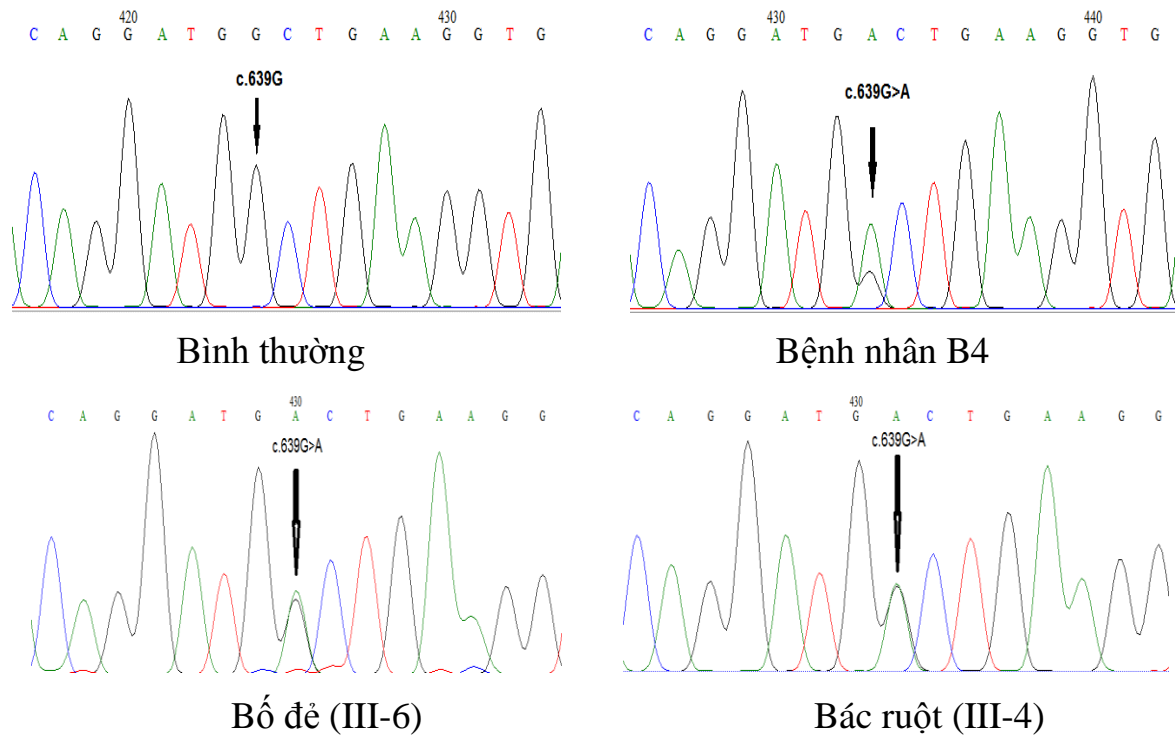
- Bệnh nhân B4 (IV-9) mang đột biến dị hợp tử c.639G>A, dẫn đến tạo một mã kết thúc sớm UGA tại vị trí p.213 nằm trên vùng mã hóa exon 5.

- Có 11 thành viên gia đình tham gia vào nghiên cứu gồm: 3 người bác họ (III-1, III-2, III-3), 2 người bác ruột (III-4, III-5), bố đẻ (III-6), mẹ đẻ (III-7),

anh họ (IV-1), chị họ (IV-6), chị ruột (IV-7) và em ruột (IV-11). Trong gia đình không có tiền sử mắc bệnh UTDD. Tại thời điểm nghiên cứu, các thành viên tham gia đều chưa phát hiện có bệnh lý UTDD.

- Kết quả phân tích gen *CDH1* tại vị trí exon 5 đã phát hiện ra 2 thành viên mang đột biến (c.639G>A, p.W213\*) giống bệnh nhân là bố đẻ (III-6) và bác ruột (III-4). Các thành viên mang đột biến đều ở thể dị hợp tử.

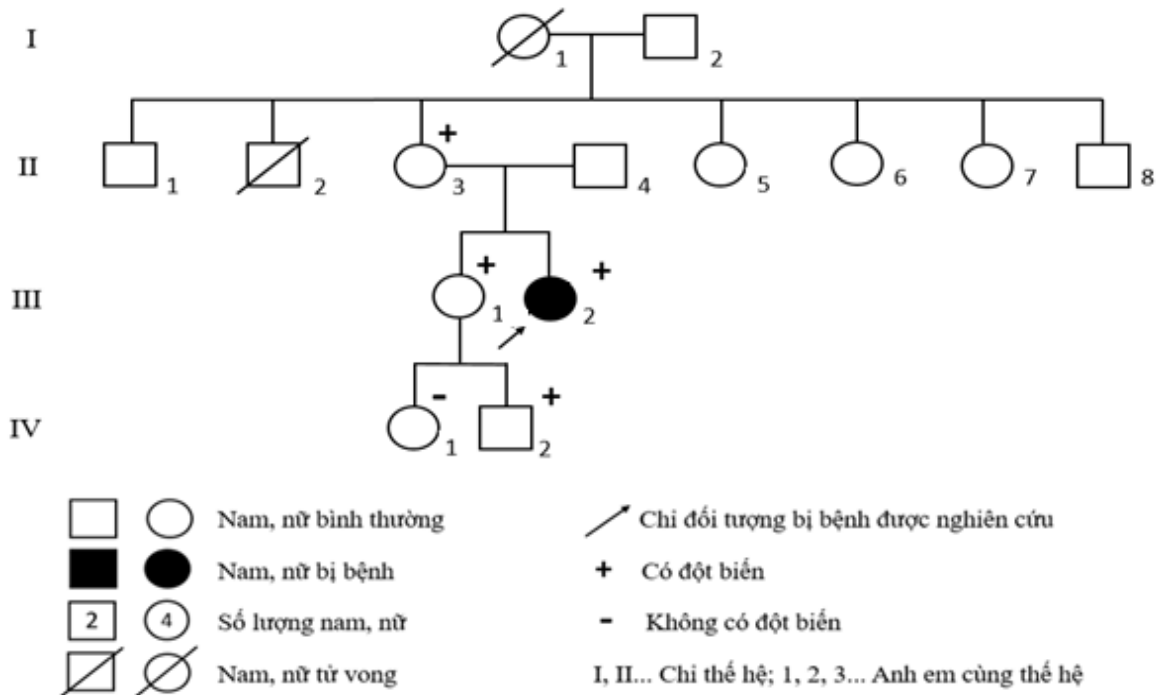
- Đột biến c.639G>A xuất hiện ở bố đã di truyền cho người con trai là bệnh nhân B4. Tuy nhiên, bố đẻ và bác ruột mang đột biến gen nhưng chưa biểu hiện bệnh.



**Hình 3.14. Hình ảnh giải trình tự gen *CDH1* tại vị trí mang đột biến của thành viên gia đình B4.**

Phân tích kết quả giải trình tự exon 5 của gen *CDH1* trên các thành viên gia đình B4, chúng tôi phát hiện ra một biến đổi dị hợp thay thế nucleotid G thành A ở vị trí c.639, biến đổi này tạo ra một codon dừng sớm ở 2 thành viên gia đình là bố đẻ và bác ruột. Đây là một đột biến vô nghĩa giống bệnh nhân.

❖ **Phả hệ gia đình bệnh nhân B732**



Đối tượng bị bệnh được nghiên cứu III-2 (bệnh nhân B732) hiện đã tử vong.

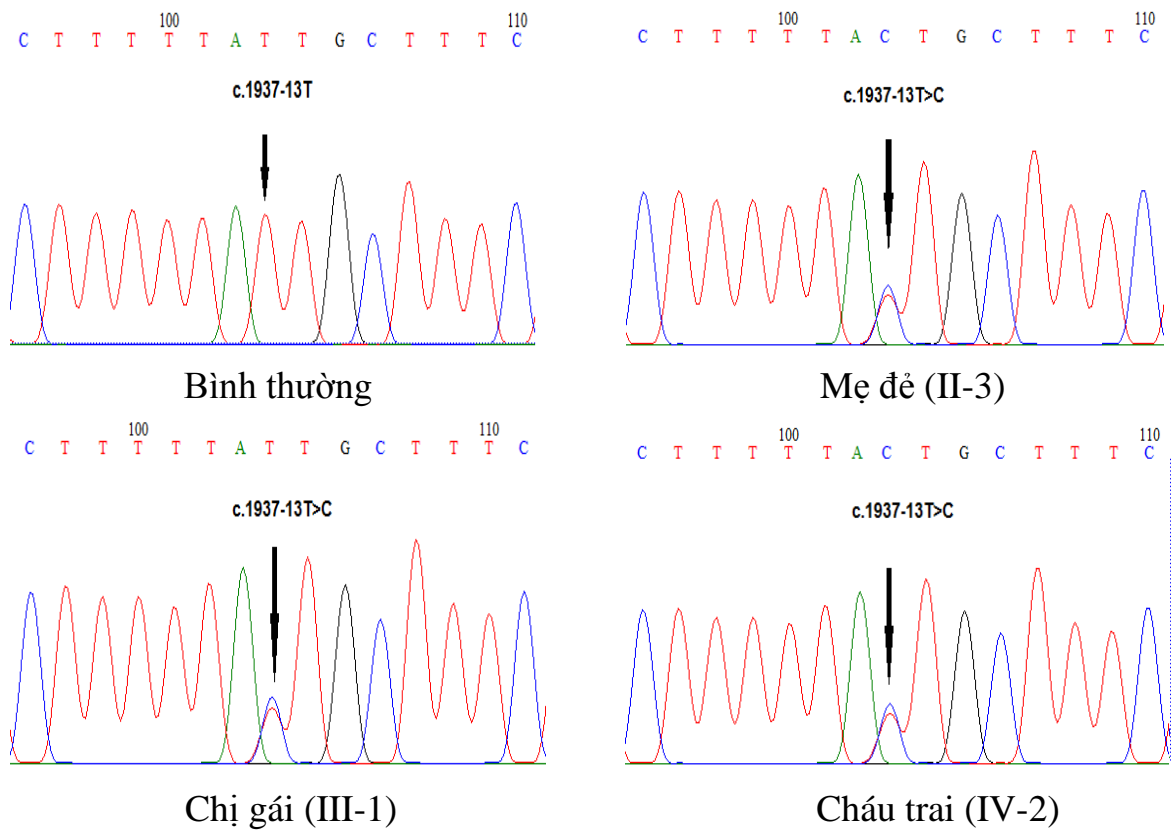
**Hình 3.15. Phả hệ và kết quả phân tích gen *CDH1* của gia đình bệnh nhân B732**

- Bệnh nhân B732 (III-2) mang đột biến dị hợp tử ở vị trí c.1937-13T>C nằm trên intron 12, đột biến này đã được công bố và là đột biến gây bệnh.

- Gia đình có 4 thành viên được tiến hành phân tích gen *CDH1* gồm: mẹ đẻ (II-3), chị ruột (III-1) và 2 người cháu là con của chị ruột (IV-1, IV-2). Tiền sử gia đình không có ai bị UTDD, có 1 bác ruột (II-2) bị chết vì ung thư phổi. Tại thời điểm nghiên cứu, các thành viên tham gia đều chưa phát hiện bệnh lý UTDD.

- Kết quả phân tích gen *CDH1* tại vị trí intron 12 đã phát hiện có 3 thành viên gia đình mang đột biến (c.1937-13T>C) giống bệnh nhân là mẹ đẻ (II-3), chị ruột (III-1) và 1 người cháu trai (IV-2). Các bệnh nhân mang đột biến đều ở thể dị hợp tử.

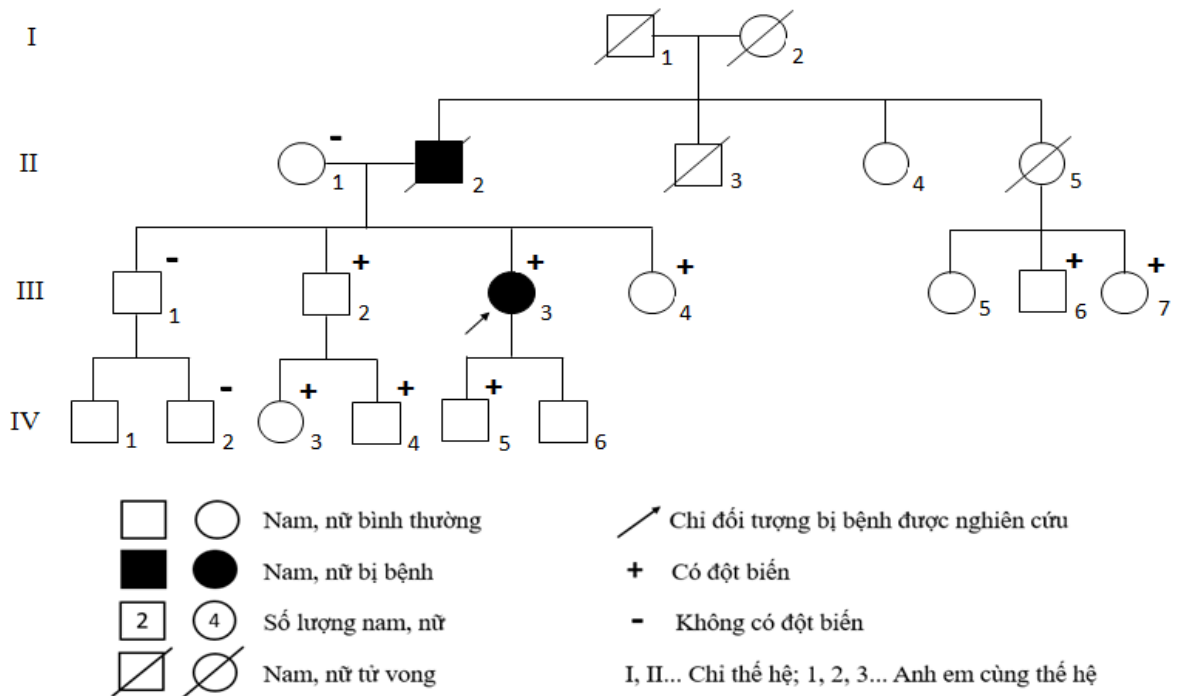
- Đột biến c.1937-13T>C xuất hiện ở người mẹ (II-3) đã di truyền cho 2 người con gái là bệnh nhân (III-2) và chị gái (III-1). Người chị gái lại tiếp tục di truyền đột biến cho con trai (IV-2) của mình. Như vậy, đột biến c.1937-13T>C trên gen *CDH1* đã xuất hiện ở ba thế hệ trong gia đình bệnh nhân B732. Tuy nhiên, cả ba thành viên mang đột biến giống bệnh nhân đều chưa biểu hiện bệnh.



**Hình 3.16. Hình ảnh giải trình tự gen *CDH1* của thành viên gia đình B732 mang đột biến.**

Một biến đổi dị hợp thay thế nucleotid T thành C ở vị trí c.1937-13 nằm trên intron 12 của gen *CDH1* được tìm thấy ở 3 thành viên trong gia đình bệnh nhân B732, biến đổi này là đột biến vị trí nối đã được công bố và là đột biến gây bệnh.

❖ **Phả hệ gia đình bệnh nhân B151**



**Hình 3.17. Phả hệ và kết quả phân tích gen *CDH1* của gia đình bệnh nhân B151**

- Bệnh nhân B151 (III-3) mang đột biến dị hợp tử c.1990 A>C, dẫn đến sự thay đổi acid amin ở vị trí 664 từ lysine (K) thành glutamin (Q), nằm trên vùng mã hóa exon 13 của gen *CDH1*.

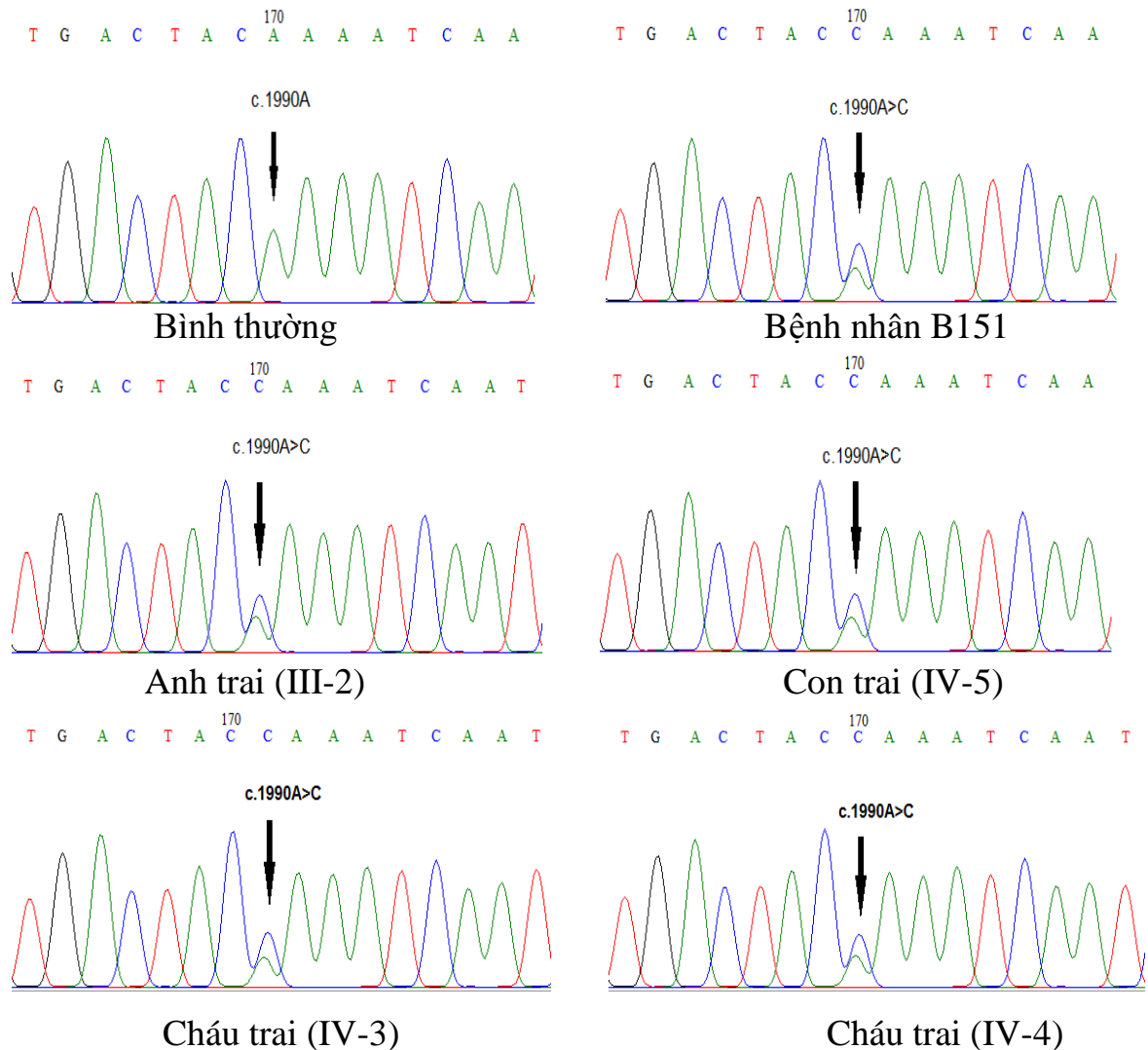
- Gia đình có 10 thành viên được phân tích gen *CDH1* gồm: mẹ đẻ (II-1), 2 người anh trai (III-1 và III-2), 1 người em gái (III-4), 2 người em họ bên đăng nội (III-6, III-7), 3 người cháu (IV-2, IV-3, IV-4) và con trai (IV-5). Trong gia đình có bố đẻ bệnh nhân (II-2) đã chết vì UTDD, mẹ đẻ (II-1) không có biểu hiện bệnh lý dạ dày. Tại thời điểm nghiên cứu, các thành viên tham gia chưa có ai mắc bệnh lý UTDD.

- Kết quả phân tích gen *CDH1* tại vị trí exon 13 đã phát hiện có 7 thành viên mang đột biến (c.1990A>C, p.K664Q) giống bệnh nhân là người anh trai thứ 2 (III-2), em gái (III-4), 2 người em họ con của cô ruột (III-6 và III-7), 2



cháu trai (IV-3 và IV-4) và con trai của bệnh nhân (IV-5). Các thành viên mang đột biến đều ở thể dị hợp tử.

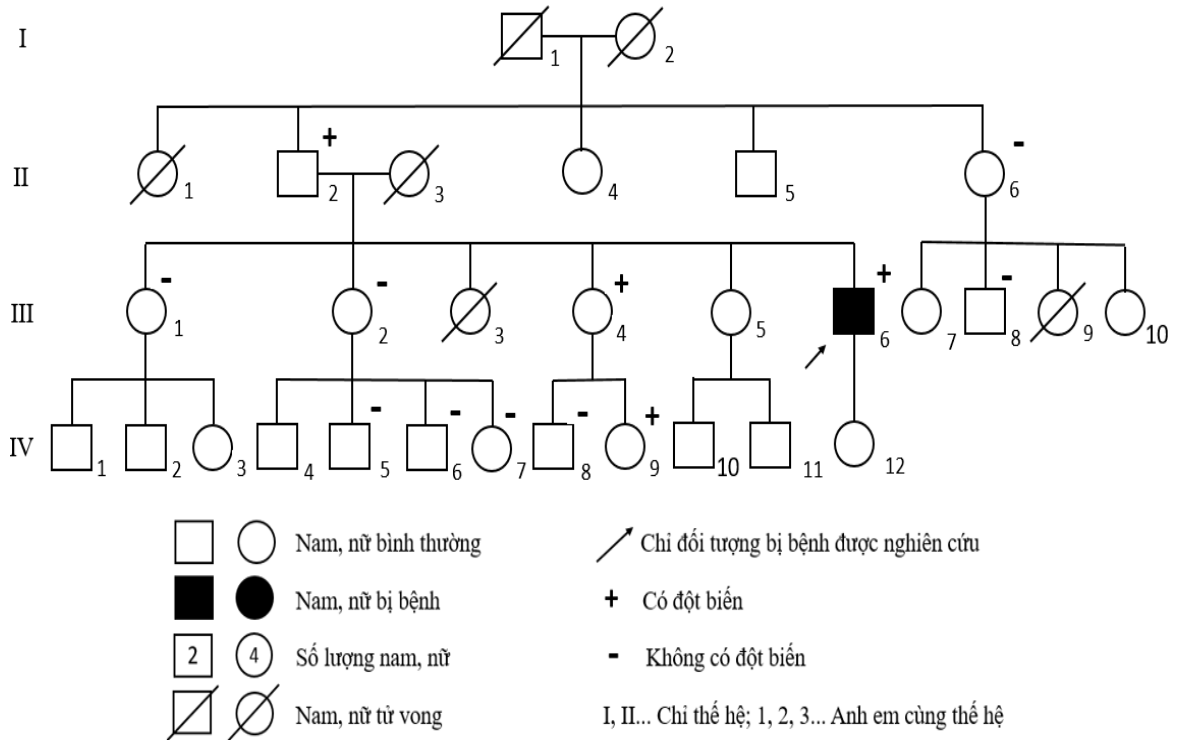
- Do người bố của bệnh nhân đã chết vì UTDD, nên chúng tôi không phân tích được đột biến, mẹ của bệnh nhân có kết quả âm tính với đột biến. Tuy nhiên qua phân tích phả hệ và dựa vào kết quả phân tích gen *CDH1* của các thành viên gia đình thì có 2 người em họ là con của người cô (em bố) cũng mang đột biến gen *CDH1* giống bệnh nhân, do đó có thể xác định đột biến gen ở bệnh nhân (III-3) là do di truyền từ người bố (II-2) đã chết vì UTDD.



**Hình 3.18. Hình ảnh giải trình tự gen *CDH1* của thành viên gia đình B151 mang đột biến**

Phân tích giải trình tự exon 13 của gen *CDH1* chúng tôi phát hiện ra một biến đổi dị hợp tử làm thay thế nucleotid A thành C ở vị trí c.1990, dẫn đến sự thay đổi trình tự acid amin ở vị trí 664 từ lysine thành glutamin ở 7 thành viên gia đình bệnh nhân B151.

❖ **Phả hệ gia đình bệnh nhân B532**



**Hình 3.19. Phả hệ và kết quả phân tích gen *CDH1* của gia đình bệnh nhân B532**

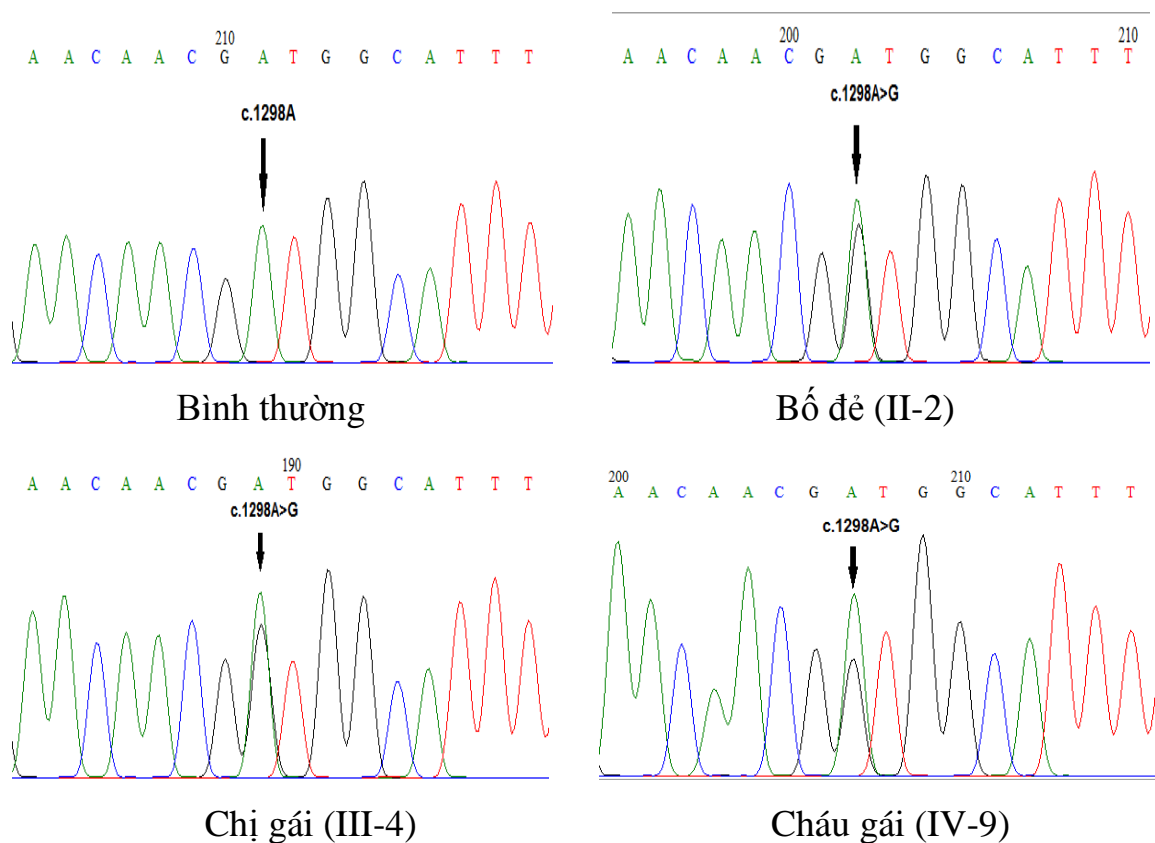
- Bệnh nhân B532 (III-6) mang đột biến dị hợp tử c.1298 A>G làm thay đổi acid amin từ aspartic (D) thành glycine (G) tại vị trí 433, nằm trên vùng mã hóa exon 9 của gen *CDH1*.

- Gia đình có 11 thành viên tham gia vào nghiên cứu gồm: bố đẻ (II-2), cô ruột (II-6), 3 người chị gái (III-1, III-2, III-4), 1 em họ (III-8) và 3 người cháu con của chị thứ 2 (IV-5, IV-6, IV-7) và 2 người cháu con chị thứ 3 (IV-8, IV-9). Tiền sử gia đình không có ai bị UTDD, có mẹ bệnh nhân đã chết vì suy tim, một người chị gái (III-3) chết lúc 31 tuổi vì tai biến mạch não, một người em họ (III-9) chết

vì ung thư buồng trứng ở tuổi 17. Các thành viên tham gia tại thời điểm nghiên cứu đều chưa phát hiện có bệnh lý UTDD.

- Kết quả phân tích gen *CDH1* tại vị trí exon 9 đã phát hiện có 3 thành viên mang đột biến (c.1298 A>G, p.D433G) giống bệnh nhân là bố đẻ (II-1), chị gái (III-4) và cháu gái (IV-5) là con của chị gái (III-4). Các thành viên mang đột biến đều ở thể dị hợp tử.

- Đột biến gen *CDH1* c.1298A>G xuất hiện ở người bố đã di truyền cho người con trai là bệnh nhân B532 và người chị gái của bệnh nhân (III-4). Người chị gái này lại di truyền đột biến cho con gái mình (IV-9). Như vậy đột biến c.1298A>G trên gen *CDH1* đã xuất hiện ở 3 thế hệ trong gia đình bệnh nhân B532. Cả 3 thành viên mang đột biến giống bệnh nhân nhưng đều chưa biểu hiện ra bệnh.



**Hình 3.20. Hình ảnh giải trình tự gen *CDH1* của thành viên gia đình B532 mang đột biến**

Phân tích kết quả giải trình tự exon 9 của gen *CDH1* các thành viên gia đình, chúng tôi phát hiện ra một biến đổi dị hợp tử thay thế nucleotid A thành G ở vị trí c.1298, dẫn đến sự thay đổi acid amin từ aspartic thành glycine trong 3 thành viên gia đình bệnh nhân B532.

### 3.3.2. Đặc điểm về phả hệ và các thành viên gia đình mang đột biến gen *CDH1*.

Tổng số đối tượng nghiên cứu trong 4 phả hệ gia đình gồm 36 thành viên gia đình và 4 bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến gen (n=40). Trong đó phả hệ gia đình B4, B732, B151 và B532 gồm lần lượt số người tham gia nghiên cứu là: 12, 5, 11 và 12 người.

*Bảng 3.16. Đặc điểm của phả hệ mang đột biến gen trong nghiên cứu*

<b>Gia đình</b>	<b>Tuổi trung bình mang đột biến (Min-Max)</b>	<b>Tỷ lệ Nam/Nữ mang đột biến</b>	<b>Tiền sử gia đình có người bị UTDD</b>	<b>Số người mang đột biến bị UTDD</b>
Gia đình B4	50,6 (28 – 65)	3/0	Không	1
Gia đình B732	38,7 (10 – 74)	1/3	Không	1
Gia đình B151	30,4 (15 – 44)	5/3	Có	1
Gia đình B532	36,7 (12 – 71)	2/2	Không	1

- Độ tuổi trung bình của các thành viên mang đột biến ở 4 gia đình không giống nhau, gia đình B4 có tuổi trung bình cao nhất là 50,6 tuổi, thấp nhất là gia đình B151 với 30,4 tuổi. Thành viên mang đột biến gen cao tuổi nhất là 74 tuổi và nhỏ tuổi nhất là 10 tuổi đều ở gia đình B732.

- Chỉ có gia đình B151 là có thành viên trong gia đình bị UTDD.
- Tỷ lệ nam/nữ mang đột biến gen ở các thành viên tham gia nghiên cứu là 1,4: 1.
- Ngoài 4 bệnh nhân mang đột biến gen *CDH1* bị UTDD lan tỏa di truyền, thì các thành viên khác mang đột biến gen trong 4 gia đình chưa ai phát hiện mắc bệnh UTDD tại thời điểm nghiên cứu.

*Bảng 3.17. Tỷ lệ mang đột biến gen CDH1 trong phả hệ gia đình*

<b>Gia đình</b>	<b>Tỷ lệ mang đột biến (%)</b>	<b>Tỷ lệ mang đột biến ở họ hàng bậc 1</b>	<b>Tỷ lệ mang đột biến ở họ hàng bậc 2</b>	<b>Tỷ lệ mang đột biến ở họ hàng bậc 3</b>
B4	3/11 (27%)	2/4 (50%)	1/3 (33,3%)	0 (0%)
B732	4/5 (80%)	3/3 (100%)	1/2 (50%)	0 (0%)
B151	8/10 (80%)	4/5 (75%)	2/3 (67%)	2/2 (100%)
B532	4/12 (33%)	3/5 (60%)	1/6 (17%)	0/1 (0%)

*Ghi chú: Tỷ lệ mang đột biến ở họ hàng bậc 1,2,3 chỉ tính thành viên trong cùng huyết thống.*

- Tỷ lệ mang đột biến gen *CDH1* ở gia đình B732 và B151 đều chiếm tỷ lệ cao là 80%, trong đó ở gia đình B4 là 27% và gia đình B532 là 33%.
- Tỷ lệ mang đột biến gen ở họ hàng bậc 1 tương đối cao ở cả 4 gia đình tỷ lệ từ 50 – 100%.
- Tỷ lệ mang đột biến gen ở họ hàng bậc 2 giảm dần chỉ còn từ 17 – 67%.
- Tỷ lệ mang đột biến gen ở họ hàng bậc 3 trong 3 gia đình B4, B732 và B532 đều không có thành viên nào, riêng trong gia đình B151 tỷ lệ mang đột biến gen ở họ hàng bậc 3 là 100%.

Nghiên cứu của chúng tôi đã lấy được 36 mẫu máu của các thành viên trong gia đình 4 bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến gen *CDH1*, sau khi phân tích gen *CDH1* ở các thành viên gia đình đã phát hiện ra có 15 người trong 4 gia đình mang đột biến tương ứng với bệnh nhân. Có 8 thành viên mang đột biến trong 3 gia đình gồm: 1 thành viên gia đình B4, 2 thành viên gia đình B532 và 5 thành viên gia đình B151 đồng ý tham gia nội soi và sinh thiết dạ dày ngẫu nhiên làm mô bệnh học.

*Bảng 3.18. Đặc điểm nội soi và mô bệnh học của các thành viên gia đình mang đột biến gen CDH1*

Gia đình	Thành viên	Hình ảnh nội soi		Kết quả mô bệnh học	Test <i>H.Pylori</i>
		Hình thái tổn thương	Vị trí		
Gia đình B4	III-6	Niêm mạc xung huyết, 2 ổ loét nông	Thân vị Bờ cong nhỏ	Viêm niêm mạc, dị sản ruột, loạn sản mức thấp	Dương tính
Gia đình B532	II-2	Trợt nông, xung huyết	Thân vị Hang vị	Viêm niêm mạc, dị sản ruột, loạn sản mức thấp	Dương tính
	III-4	Niêm mạc xung huyết	Thân vị Hang vị	Viêm niêm mạc mạn	Dương tính
Gia đình B151	III-2	Trợt nông, xung huyết	Hang vị	Viêm niêm mạc, dị sản ruột, loạn sản mức thấp	Âm tính
	III-6	Viêm teo, trợt lồi	Hang vị	Viêm niêm mạc dạ dày, dị sản ruột, loạn sản mức độ thấp	Dương tính
	III-7	Niêm mạc xung huyết	Hang vị	Viêm niêm mạc dạ dày mạn	Dương tính
	IV-3	Niêm mạc xung huyết	Thân vị	Viêm niêm mạc dạ dày	Dương tính
	VI-4	Niêm mạc xung huyết	Hang vị	Viêm niêm mạc dạ dày	Dương tính

- Bảng 3.18 mô tả đặc điểm về nội soi dạ dày và mô bệnh học của các thành viên mang đột biến của ba gia đình. Có 4 thành viên gồm 1 người trong gia đình B4, 1 người trong gia đình B532 và 2 người trong gia đình B151 có biểu hiện dị sản và loạn sản mức độ thấp.

- Vị trí tổn thương chủ yếu ở vùng thân vị và hang vị.
- Hầu hết các thành viên đều có xét nghiệm test *H.Pylori* dương tính.
- Chưa có ai trong số các thành viên gia đình tham gia nghiên cứu mang đột biến gen *CDH1* biểu hiện bệnh lý UTDD.

## Chương 4

### BÀN LUẬN

Ung thư dạ dày là một trong những bệnh lý ác tính phổ biến và là nguyên nhân dẫn đến tử vong do ung thư cao nhất trên toàn thế giới, chỉ sau ung thư phổi và ung thư đại trực tràng. Tỷ lệ mắc và tỷ lệ tử vong do ung thư dạ dày rất khác nhau theo khu vực và phụ thuộc nhiều vào các yếu tố môi trường như chế độ sinh hoạt, ăn uống, tình trạng nhiễm *Helicobacter pylori* (*H.Pylori*). Hiểu rõ hơn về nguyên nhân, cơ chế và các yếu tố nguy cơ gây bệnh có thể giúp đạt được sự đồng thuận trong việc phòng và điều trị bệnh. Thay đổi chế độ ăn uống, lối sống cũng như ngăn ngừa và điều trị *H.Pylori* hứa hẹn trong việc giảm tỷ lệ mắc UTDD, trong khi đó xét nghiệm di truyền cho phép chẩn đoán sớm do đó khả năng sống sót cao hơn.

Yếu tố di truyền là một trong những nguyên nhân quan trọng gây ra UTDD, nhiều gen gây UTDD đã được phát hiện nhưng gen gây bệnh thường gặp nhất là *CDH1*, chiếm 25 – 30% các trường hợp UTDD lan tỏa di truyền. Việc xác định đột biến gen *CDH1* có một ý nghĩa rất quan trọng trong việc quản lý, theo dõi, tiên lượng, điều trị dự phòng sớm cho những cá nhân hay gia đình có nguy cơ cao mắc UTDD lan tỏa di truyền. Do đó, chúng tôi đã tiến hành phân tích toàn bộ 16 exon của gen *CDH1* trên 45 bệnh nhân được chẩn đoán là UTDD lan tỏa di truyền để xác định đột biến, lập phả hệ và xác định đột biến gen *CDH1* ở các thành viên gia đình của bệnh nhân mang đột biến. Từ kết quả thu được chúng tôi đưa ra một số bàn luận như sau:

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

Các nghiên cứu về UTDD ở trong nước cũng như trên thế giới đều cho thấy độ tuổi mắc bệnh dao động ở 60 tuổi. Tại một số nước châu Á như Nhật Bản, Hàn Quốc là những nơi có tỷ lệ mắc UTDD cao nhất thì độ tuổi chẩn đoán trung bình sớm hơn so với các nước phương Tây, nguyên nhân là tại các



nước này có chương trình sàng lọc UTDD sớm, rộng rãi và áp dụng các phân loại UTDD sớm. Đối với UTDD lan tỏa di truyền, trong tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh của IGCLC đồng thuận năm 2015, có một tiêu chuẩn quy định về tuổi mắc bệnh là trước 40 tuổi. Vì thế, đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi tương đối trẻ với tuổi trung bình lúc phát hiện bệnh là  $34,89 \pm 6,37$ , thấp nhất là 21 tuổi, cao nhất là 52 tuổi. Đa số các đối tượng trong nghiên cứu ở độ tuổi dưới 40. Tuổi phát hiện bệnh trong các đối tượng nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với tuổi trung bình khởi phát trong UTDD lan tỏa di truyền trên thế giới là 38 tuổi (14 – 69 tuổi). Phần lớn các bệnh nhân UTDD lan tỏa mang đột biến xảy ra trước tuổi 40 [9].

Trong một nghiên cứu của Pharoah và cộng sự (2001), nghiên cứu về tỷ lệ mắc UTDD ở người mang đột biến gen *CDHI* trong các gia đình bị UTDD lan tỏa di truyền, trong 80 trường hợp bị UTDD lan tỏa với độ tuổi chẩn đoán trung bình là 40, tuổi trung bình chẩn đoán ở nữ có xu hướng sớm hơn (39 tuổi) so với nam (42 tuổi) [123].

Một nghiên cứu tại Hàn Quốc của tác giả Kim trên 23 bệnh nhân mắc UTDD lan tỏa di truyền thì có 18 bệnh nhân ở độ tuổi dưới 40 và 5 bệnh nhân trên 40 tuổi, độ tuổi chẩn đoán bệnh cũng dưới 40 tuổi [65].

Nghiên cứu của Emma và cộng sự (2018) về giám sát nội soi trong UTDD lan tỏa di truyền theo tình trạng đột biến, có 85 bệnh nhân trong đó độ tuổi trung bình là 38 tuổi, nhóm mang đột biến gen *CDHI* độ tuổi trung bình 33,5 (26 – 46) tuổi và nhóm không có đột biến là 45 (32 – 57) tuổi [124].

Một nghiên cứu ở Trung Quốc (2013) với 107 trường hợp UTDD thể lan tỏa và 60 trường hợp thể ruột. Tuổi trung bình khi phát hiện bệnh của các trường hợp thể lan tỏa là  $66,87 \pm 13,81$  (27 – 90) tuổi, trong đó ở các trường hợp thể ruột là  $73,82 \pm 9,76$  (48 – 88) tuổi. Tuổi trung bình của các trường hợp lan tỏa trẻ hơn so với các trường hợp thể ruột [41]. Trong nghiên cứu này mặc dù tuổi trung bình phát hiện bệnh cao hơn các nghiên cứu khác

nhưng nó vẫn cho thấy sự khác biệt về tuổi phát hiện bệnh giữa 2 nhóm UTDD thể lan tỏa và thể ruột.

Như vậy nhóm tuổi mắc UTDD lan tỏa di truyền được phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng so với các nghiên cứu khác trên thế giới. Nguyên nhân gây bệnh do đột biến gen nên tuổi mắc bệnh ở những trường hợp này thường là trẻ tuổi. Ngoài ra, tuổi mắc bệnh trong UTDD lan tỏa di truyền cũng là một trong những tiêu chuẩn chẩn đoán và là đặc điểm lâm sàng nổi bật của bệnh.

UTDD là một bệnh lý ác tính có liên quan đến giới tính, thường gặp ở nam giới hơn là nữ giới. Ở các nước phát triển, UTDD được chẩn đoán ở nam giới cao gấp 2,2 lần so với nữ. Ở các nước đang phát triển thì tỷ lệ này là 1,83 [125]. Hàn Quốc là quốc gia có tỷ lệ mắc bệnh cao nhất với tỷ lệ mắc hàng năm ở nam giới là 60/100.000 người, trong khi tỷ lệ ở nữ giới là 25/100.000 người [125]. Hiện tượng này có thể được lý giải do UTDD là một bệnh đa nhân tố, sự thay đổi về địa lý, xu hướng thời gian đối với tỷ lệ mắc UTDD đã cho thấy các yếu tố môi trường, lối sống, chế độ ăn uống là yếu tố chính gây ra UTDD.

Trong UTDD thì thể ruột gặp phổ biến ở nam giới và nhóm tuổi lớn hơn, trong khi thể lan tỏa thì có tỷ lệ cao hơn ở nữ và thường gặp ở người trẻ tuổi [116]. Một nghiên cứu ở Nhật Bản về đặc điểm mô bệnh học trong UTDD đã cho thấy thể ruột thường xảy ra ở nam giới và người già, trong khi đó thể lan tỏa xảy ra nhiều hơn ở phụ nữ trẻ ( $p < 0,05$ ) [126]. Nghiên cứu của Emma và cộng sự (2018) cũng cho thấy tỷ lệ mắc UTDD lan tỏa di truyền ở nam và nữ trong nhóm mang đột biến và không mang đột biến xấp xỉ 1:1 [124]. Nghiên cứu của Kim và cộng sự cũng cho thấy tỷ lệ giữa nam và nữ là như nhau trong nhóm UTDD lan tỏa di truyền [65]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng đưa ra tỷ lệ giữa nam và nữ mắc bệnh xấp xỉ 1:1, nhưng tuổi phát hiện bệnh ở nam giới trung bình là  $36,74 \pm 6,58$  cao hơn ở nữ là  $32,86 \pm 5,52$ . Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tuổi phát hiện bệnh trung bình ở 2 nhóm nam và nữ tham gia

nghiên cứu với  $p = 0,04$  (T – test), kết quả này cũng tương tự như các nghiên cứu nêu trên. Trong UTDD thể lan tỏa việc phụ nữ với độ tuổi tương đối trẻ dễ mắc bệnh hơn có thể cho thấy sự đóng góp của các yếu tố di truyền cao hơn các yếu tố môi trường trong loại ung thư này. Điều này cho thấy sự phân bố về giới tính và tuổi trong hai loại ung thư biểu mô có ý nghĩa lớn trong sàng lọc và phòng bệnh UTDD.

**Một số yếu tố nguy cơ ảnh hưởng đến bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền trong nghiên cứu:** Hút thuốc lá là một yếu tố nguy cơ về hành vi quan trọng đối với sự phát triển UTDD. Thuốc lá có liên quan đến sự gia tăng của UTDD ngoài tâm vị. Một phân tích tổng hợp ở 42 nghiên cứu ước tính rằng ở những người hút thuốc có nguy cơ mắc UTDD tăng khoảng 1,62 ở nam và 1,20 ở nữ so với những người không hút thuốc, tăng từ 1,3 lên 1,7 lần đối với việc hút khoảng 30 điếu thuốc mỗi ngày [18] . Nghiên cứu của Sasazuki cho thấy hút thuốc lá làm tăng nguy cơ mắc UTDD thể ruột cao hơn thể lan tỏa [21] . Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về tác động của hút thuốc lá với UTDD thể lan tỏa.

Sử dụng rượu được chứng minh là làm tăng nguy cơ mắc UTDD, nhưng vẫn còn nhiều tranh cãi về lượng rượu tiêu thụ với nguy cơ mắc bệnh. Dựa trên phân tích tổng hợp của 10 nghiên cứu thì việc sử dụng rượu ở mức độ trung bình được chứng minh là làm tăng 39% nguy cơ mắc UTDD. Một nghiên cứu tổng hợp khác của 44 nghiên cứu bệnh chứng và 15 nghiên cứu thuần tập lại chỉ ra nguy cơ mắc UTDD không liên quan với việc tiêu thụ rượu ở mức trung bình, nhưng lại có mối liên quan với việc tiêu thụ rượu mức độ nặng [127] .

Trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ các đối tượng sử dụng thuốc lá chiếm 26,7% và tỷ lệ sử dụng rượu ở mức độ nguy cơ trong đối tượng nghiên cứu là 17,8%, điều này cho thấy rằng UTDD là một bệnh đa nhân tố, kết quả của sự kết hợp giữa yếu tố môi trường và biến đổi di truyền. Trong đó các yếu tố môi trường có liên quan đến UTDD thể ruột, còn yếu tố

di truyền lại liên quan nhiều đến UTDD thể lan tỏa, đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi là các bệnh nhân mắc UTDD lan tỏa di truyền do đó không bị tác động nhiều bởi các yếu tố nguy cơ môi trường hay lối sống.

**Tiền sử bệnh tật cá nhân và gia đình:** Ở phần này bàn luận về tiền sử cá nhân của đối tượng nghiên cứu chúng tôi tập trung vào 2 phần là tiền sử mắc bệnh lý về dạ dày hay tiền sử đau vùng thượng vị và tiền sử nhiễm *H. pylori*. Như chúng ta đã biết, yếu tố nguy cơ chính gây UTDD là nhiễm vi khuẩn *H. pylori*. Trước khi phát hiện ra vai trò của *H. pylori*, thì lối sống và tình trạng căng thẳng được đưa ra giả thuyết là yếu tố nguy cơ chính trong bệnh lý viêm loét dạ dày. Sau khi được Marshall và Warren phân lập ra trực khuẩn *H. pylori* thì giờ đây chúng ta đã biết rằng có tới 80% các vết loét dạ dày là do *H. pylori* [57]. *H. pylori* có thể gây ra một chuỗi các bệnh lý dạ dày như tổn thương niêm mạc, viêm niêm mạc dạ dày sau đó gây dị sản, loạn sản và cuối cùng là ung thư. Do đó những bệnh nhân có tiền sử nhiễm *H. pylori* và tiền sử mắc bệnh lý về dạ dày có nguy cơ mắc UTDD cao hơn.

Trong nghiên cứu của chúng tôi đối tượng nghiên cứu có 62,2% có tiền sử đau thượng vị và có 37,8% có tiền sử nhiễm *H. pylori* dương tính. Tuy nhiên tiền sử đau bụng vùng thượng vị được chúng tôi đánh giá dựa trên phỏng vấn, do đó có thể có các sai số do bệnh nhân quên, nhớ không rõ hoặc triệu chứng biểu hiện mơ hồ. Trong UTDD lan tỏa di truyền thì vai trò của *H. pylori* vẫn còn nhiều tranh cãi, vì từ khi có phác đồ điều trị *H. pylori* thì tỷ lệ mắc UTDD đã giảm, đặc biệt là thể ruột, nhưng tỷ lệ này đang có xu hướng gia tăng ở những người trẻ tuổi, liên quan đến sự gia tăng của UTDD thể lan tỏa. Tỷ lệ mắc UTDD thể lan tỏa tăng gấp 10 lần từ năm 1970 đến năm 2000 [35]. Enrique (2019) đã đưa ra tỷ lệ tiền sử nhiễm *H. pylori* là 42% trong một nghiên cứu ở 36 bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền [128]. Trong một nghiên cứu của Carpinteyro và cộng sự (2019) cho thấy tỷ lệ nhiễm *H. pylori* ở nhóm bệnh nhân UTDD thể lan tỏa là 58,3%, tuy nhiên cỡ mẫu trong nghiên cứu nhỏ với

$n=13$  do đó kết quả trên cũng chưa phản ánh chính xác tình trạng nhiễm *H. pylori* ở đối tượng nghiên cứu này [129]. Vì vậy, vai trò của các yếu tố nguy cơ trong UTDD mà đặc biệt là vai trò của *H. pylori* cần phải được nghiên cứu thêm trong bệnh lý UTDD lan tỏa di truyền. Mặc dù mối liên quan giữa nhiễm *H. pylori* với UTDD lan tỏa di truyền chưa được chứng minh, nhưng việc kiểm tra tình trạng nhiễm *H. pylori* là điều quan trọng vì *H. pylori* được coi là tác nhân gây UTDD loại 1 của WHO.

Nguy cơ bị UTDD đối với gia đình là một dấu hiệu của sự nhạy cảm di truyền. Dhillon và cộng sự (2001), nghiên cứu trong 695 trường hợp mắc bệnh với 629 trường hợp nhóm chứng cho thấy nguy cơ tương đối của tiền sử gia đình với UTDD là 2,2 (95% CI 1,5 – 3,3), nguy cơ cao đối với những trường hợp có từ hai người thân trở lên bị UTDD (OR = 12,1) [130]. Một nghiên cứu ở Tây Ban Nha cũng cho thấy nguy cơ đối với bệnh là 3,4 (OR = 3,4; 95% CI 1,9 – 6,0) [107]. Đã có rất nhiều các nghiên cứu đã đưa ra tiền sử gia đình mắc UTDD là yếu tố nguy cơ cao mắc bệnh UTDD.

Khoảng 10 – 30% các trường hợp UTDD cho thấy có tính chất di truyền, nhưng chỉ 1 – 3% gây ra bởi hội chứng UTDD lan tỏa di truyền [2]. Năm 1998, Guilford và cộng sự đã phát hiện ra đột biến gen *CDH1* là nguyên nhân chính gây ra UTDD lan tỏa di truyền. Đến năm 1999, những định nghĩa về UTDD lan tỏa di truyền được đưa ra bởi Hiệp hội liên kết Ung thư dạ dày thế giới (IGCLC), tại đây cũng đã đưa ra các tiêu chí trong sàng lọc UTDD lan tỏa di truyền do đột biến gen *CDH1*. Trong các tiêu chí đưa ra để chẩn đoán bệnh thì tiền sử gia đình có người mắc UTDD ở thế hệ thứ nhất hoặc thế hệ thứ hai là một trong những tiêu chuẩn quan trọng để chẩn đoán bệnh và để sàng lọc đột biến gen *CDH1*. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ các đối tượng có tiền sử gia đình mắc UTDD là chiếm 17,8%. Kết quả này cũng tương ứng với một số kết quả nghiên cứu như trong nghiên cứu của Brenner (2000) tại Đức cho tỷ lệ nhóm UTDD có họ hàng bậc 1 và 2 mắc bệnh là 15%

[131] . Tại Tây Ban Nha, nghiên cứu của tác giả Garcia-Gonzalez cũng có tỷ lệ 18% đối tượng bị UTDD có tiền sử gia đình [107] . Do khai thác tiền sử bằng hình thức phỏng vấn, do bệnh nhân quên hoặc nhớ không rõ, do không có bằng chứng rõ ràng về bệnh tật, do nhận thông tin về tình trạng bệnh không đầy đủ nên có thể có những sai số trong việc khai thác về tiền sử bệnh tật của các gia đình trong nhóm đối tượng nghiên cứu.

**Lý do vào viện và thời gian xuất hiện triệu chứng:** Các biểu hiện lâm sàng trong bệnh UTDD lan tỏa di truyền cũng tương tự như trong UTDD, với biểu hiện lâm sàng mơ hồ, không rõ ràng và đôi lúc khó phân biệt với các bệnh lý khác. Bệnh nhân thường đến viện khi các triệu chứng lâm sàng rõ ràng, lúc đó bệnh đã ở giai đoạn muộn. Tuy nhiên do đặc điểm mô bệnh học giữa UTDD thể lan tỏa và UTDD thể ruột khác nhau nên biểu hiện tuổi mắc bệnh, thời gian phát hiện, tiến triển bệnh cũng như tiên lượng bệnh sẽ khác nhau. Trong UTDD thể lan tỏa, đặc điểm quan trọng nhất là dạng ung thư xâm lấn nhiều ổ, xuất hiện rải rác, không có tổn thương hàng loạt phát triển ở lớp dưới niêm mạc, do đó khi nội soi khó phát hiện được ở giai đoạn sớm và sờ nắn cũng không phát hiện được do không có khối tổn thương. Do đó, ở những bệnh nhân bị UTDD thể lan tỏa thường đến viện khi bệnh ở giai đoạn muộn, các triệu chứng lâm sàng lúc này khá điển hình và rầm rộ. Trong nghiên cứu của chúng tôi triệu chứng đau thượng vị có tỷ lệ cao nhất chiếm 80%, đây cũng là lý do chính khiến người bệnh đi khám.

Có nhiều các nghiên cứu trong và ngoài nước đều cho thấy đau thượng vị là biểu hiện lâm sàng chính trong UTDD nói chung. Nghiên cứu của tác giả Trịnh Thị Hoa (2009) đau bụng vùng thượng vị chiếm 91,5%, nghiên cứu của Lê Thành Trung là 80,3%, của Nguyễn Quang Thái gặp biểu hiện này là 87,3% [132] , [133] , [134] .

Triệu chứng gầy sút cân trong nghiên cứu chiếm 37,8%, đây cũng là triệu chứng hay gặp trong UTDD, đây là một biểu hiện muộn khi bệnh đã ảnh

hưởng đến toàn thân. Tùy thuộc vào thời điểm và giai đoạn bệnh mà có tỷ lệ khác nhau. Tỷ lệ của chúng tôi cũng gần tương tự với một số nghiên cứu khác như của Bùi Ánh Tuyết (38,5%), Lê Thành Trung (46,5%) [135] , [133] , nhưng biểu hiện này lại thấp hơn so với một số nghiên cứu khác như của tác giả Trịnh Hồng Sơn (92,2%), Phạm Duy Hiên (89,1%) [52] , [136] .

Nôn và buồn nôn cũng là một triệu chứng hay gặp, trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ bệnh nhân có triệu chứng này là 37,8%. Xuất huyết tiêu hóa có 28,9% trường hợp với biểu hiện là nôn ra máu và/hoặc đi ngoài phân đen. Các nghiên cứu khác trong nước cũng thường gặp triệu chứng này như nghiên cứu của Bùi Ánh Tuyết với biểu hiện xuất huyết tiêu hóa (10,4%), của Lê Thành Trung có 32,5% là nôn/buồn nôn và 18,3% là xuất huyết tiêu hóa [132] , [133] , [135] . Các triệu chứng này cũng thường gặp với tỷ lệ gần tương đương với kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi.

Ngoài ra có một số triệu chứng khác đến vào giai đoạn muộn chiếm tỷ lệ thấp như nuốt nghẹn (4,4%), hạnh thương đờn (4,4%), thiếu máu (6,7%) đây là những triệu chứng biểu hiện bệnh ở giai đoạn muộn, ảnh hưởng đến toàn thân.

Như vậy, qua khai thác bệnh sử và các biểu hiện lâm sàng khi bệnh nhân vào viện cho thấy các triệu chứng rất đa dạng, hầu hết biểu hiện chính để bệnh nhân đến viện khám là đau bụng vùng thượng vị, nhưng triệu chứng này cũng khó phân biệt với một số bệnh lý khác mà đặc biệt là bệnh viêm loét dạ dày. Trong UTDD thể lan tỏa lại khó phát hiện sớm trên lâm sàng cũng như nội soi nên bệnh nhân hay đến viện khi biểu hiện bệnh đã nặng.

Về thời gian từ khi xuất hiện triệu chứng đến khi bệnh nhân vào viện, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy thời gian trung bình là 3,5 tháng. Nhóm bệnh nhân khởi phát triệu chứng dưới 6 tháng chiếm tỷ lệ cao nhất 84,4% và không có bệnh nhân nào chẩn đoán bệnh sau 12 tháng từ khi có triệu chứng đầu tiên. Nghiên cứu của chúng tôi cho thời gian trung bình ngắn

hơn và thời gian biểu hiện bệnh dưới 6 tháng cao hơn một số nghiên cứu khác như nghiên cứu của Lê Thành Trung là 4,6 tháng với thời gian từ khi biểu hiện bệnh đến khi vào viện dưới 6 tháng chiếm 50,1% [133]. Nghiên cứu của Trịnh Hồng Sơn đưa ra thời gian trung bình là 5,7 tháng, nhóm bệnh nhân biểu hiện bệnh dưới 6 tháng chiếm 56,9% [136]. Có thể nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trong thời gian gần đây, khi mà ý thức về sức khỏe của người dân được nâng cao và kỹ thuật nội soi bằng ống mềm được sử dụng rộng rãi hơn. Cũng như hầu hết các nghiên cứu, thời gian từ khi xuất hiện triệu chứng đến khi vào viện chưa phản ánh đúng thời gian thực đã mắc và chúng thường không tương ứng với giai đoạn bệnh. Do các triệu chứng mơ hồ, bệnh diễn biến âm ỉ một thời gian dài mà bệnh nhân không biết hoặc không được khám và chẩn đoán đúng. Vì vậy, thời gian từ khi biểu hiện bệnh đến khi vào viện khám và điều trị phụ thuộc nhiều vào cảm giác chủ quan của mỗi người và ý thức phòng bệnh, kiểm tra sức khỏe của người bệnh. Cho nên có nhiều trường hợp đi khám ngay khi có biểu hiện bệnh hoặc biểu hiện một triệu chứng bất thường ở vị trí khác nhưng bệnh đã ở giai đoạn muộn.

**Đặc điểm tổn thương qua nội soi của các bệnh nhân:** Trong nghiên cứu của chúng tôi vị trí tổn thương gặp nhiều nhất là vùng hang-môn vị (55,6%), tiếp đến là thân vị (40%), tổn thương ở vùng tâm vị chỉ chiếm 4,4%. Các nghiên cứu tại Việt Nam cũng cho kết quả giống của chúng tôi. Nghiên cứu của Trịnh Thị Hoa cho thấy tỷ lệ gặp tổn thương ở vùng hang – môn vị là cao nhất (64,2%), Lê Thành Trung (63,3%), Trịnh Hồng Sơn (55,9%), Bùi Ánh Tuyết (51%) [132], [133], [135], [136].

Tác giả Bang (2010) khi nghiên cứu trên một nhóm bệnh nhân UTDD châu Á cũng đưa ra vị trí tổn thương hay gặp nhất là vùng hang – môn vị với tỷ lệ 52%, vùng tâm vị chiếm tỷ lệ thấp 3% [137]. Các nghiên cứu ở châu Âu hay tại Mỹ lại cho thấy vị trí tổn thương trong UTDD hay gặp nhiều ở vùng tâm vị. Tại Mỹ, theo các nghiên cứu về dịch tễ học cho thấy UTDD vùng tâm vị chiếm tỷ lệ



khoảng 47% và ở các nước châu Âu cũng cho tỷ lệ tương tự [138] . Theo các nghiên cứu về dịch tễ UTDD thì vị trí tổn thương có sự khác biệt giữa các khu vực trên thế giới và xu hướng thời gian của UTDD. Ở một số nước châu Âu và Mỹ thì tỷ lệ mắc UTDD vùng tâm vị lại tăng lên và được cho là có liên quan đến sự gia tăng của bệnh trào ngược dạ dày – thực quản và tình trạng béo phì. Còn ở các nước khu vực châu Á thì tổn thương chủ yếu là vùng hang – môn vị, do bị tác động nhiều bởi nhiễm *H. pylori*, tình trạng kinh tế xã hội và chế độ ăn uống sinh hoạt.

Hình thái tổn thương qua nội soi của các đối tượng trong nghiên cứu cho thấy tổn thương dạng loét chiếm tỷ lệ cao nhất 57,8%, tiếp theo là thể sùi với 20%, thể thâm nhiễm và loét thâm nhiễm đều cho tỷ lệ là 11,1%. Kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu trong nước như nghiên cứu của Trịnh Thị Hoa với hình thái tổn thương thể loét chiếm cao nhất là 45,3%, thể sùi chiếm 38,7% [132] . Lê Thành Trung cũng đưa ra tỷ lệ với thể loét chiếm nhiều nhất 52,1%, thể sùi 36,6% và thể thâm nhiễm là 4,3% [133] . Nghiên cứu của Trịnh Hồng Sơn cũng cho thấy chủ yếu là thể loét chiếm 75,6%, thể sùi chiếm 21,34%, thể thâm nhiễm 3,27% [136] .

Đánh giá kích thước tổn thương qua nội soi cho thấy kích thước tổn thương từ 1 – 3 cm chiếm tỷ lệ 48,8%, nhóm có kích thước > 3cm chiếm 44,4% và nhóm < 1cm chiếm tỷ lệ thấp nhất là 6,8%. Nghiên cứu của Bùi Ánh Tuyết, đánh giá kích thước tổn thương qua nội soi ở bệnh nhân UTDD qua các giai đoạn thì kích thước tổn thương từ 3 – 5cm là chủ yếu với 48,9%, nhóm kích thước > 5cm chiếm 16,7% [135] . Về đánh giá kích thước của tổn thương sở dĩ có sự khác biệt về tỷ lệ giữa các nghiên cứu là do mục đích của nghiên cứu ở bệnh nhân UTDD giai đoạn sớm hay giai đoạn muộn, do cách phân loại kích thước của từng tác giả.

Theo phân loại TNM, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy bệnh nhân ở giai đoạn II chiếm tỷ lệ cao nhất (35,5%), giai đoạn III

(26,7%), giai đoạn IV (20%), tỷ lệ phát hiện bệnh ở giai đoạn I là thấp nhất với 17,8%. Nghiên cứu của tác giả Chu với 107 trường hợp UTDD thể lan tỏa và 60 trường hợp UTDD thể ruột, phân loại TNM giữa 2 nhóm UTDD cho thấy UTDD thể lan tỏa có số trường hợp phân loại bệnh ở giai đoạn III và IV cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm UTDD thể ruột [41]. Fang và cộng sự, trong một nghiên cứu về sự khác nhau giữa UTDD có tính chất gia đình với UTDD lẻ tẻ ở thể lan tỏa và thể ruột, phân loại theo TNM cho thấy nhóm UTDD thể lan tỏa có tỷ lệ phát hiện bệnh ở giai đoạn I thấp hơn so với UTDD thể ruột, tỷ lệ phát hiện tương đương nhau ở giai đoạn IV [139]. Đặc điểm bệnh lý và phân loại giai đoạn bệnh theo TNM ở hai nhóm UTDD thể lan tỏa và UTDD thể ruột được mô tả trong nghiên cứu của Lee và cộng sự (2017), cho thấy sự di căn hạch và di căn xa ở thể lan tỏa chiếm tỷ lệ cao hơn so với thể ruột [140].

Qua đây ta có thể thấy, áp dụng phân loại mô bệnh học UTDD của Lauren được chia làm 2 thể là: thể lan tỏa và thể ruột. Hai thể mô bệnh học này có sự khác nhau rõ rệt về dịch tễ, bệnh nguyên và đặc biệt là tiên lượng [116]. Những tổn thương mô bệnh học trong UTDD lan tỏa thường rất khó phát hiện ở giai đoạn đầu, do nằm rải rác ở lớp dưới niêm mạc và tiến triển âm thầm trong thời gian dài mà không xuất hiện khối u, cùng với các triệu chứng lâm sàng mơ hồ không rõ ràng nên bệnh nhân khi phát hiện ra bệnh thường muộn. Vì thế so với UTDD thể ruột thì thể lan tỏa được phát hiện muộn hơn với tỷ lệ giai đoạn IV tăng cao hơn.

#### **4.2. Đột biến gen *CDHI* trên bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền.**

Đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi gồm 45 bệnh nhân được chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền và 36 thành viên trong gia đình các bệnh nhân mang đột biến. Các bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều được thực hiện phỏng vấn, lấy mẫu và xử lý số liệu để phát hiện các biến đổi trên gen *CDHI* cũng như các đặc điểm về lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân theo sơ đồ nghiên

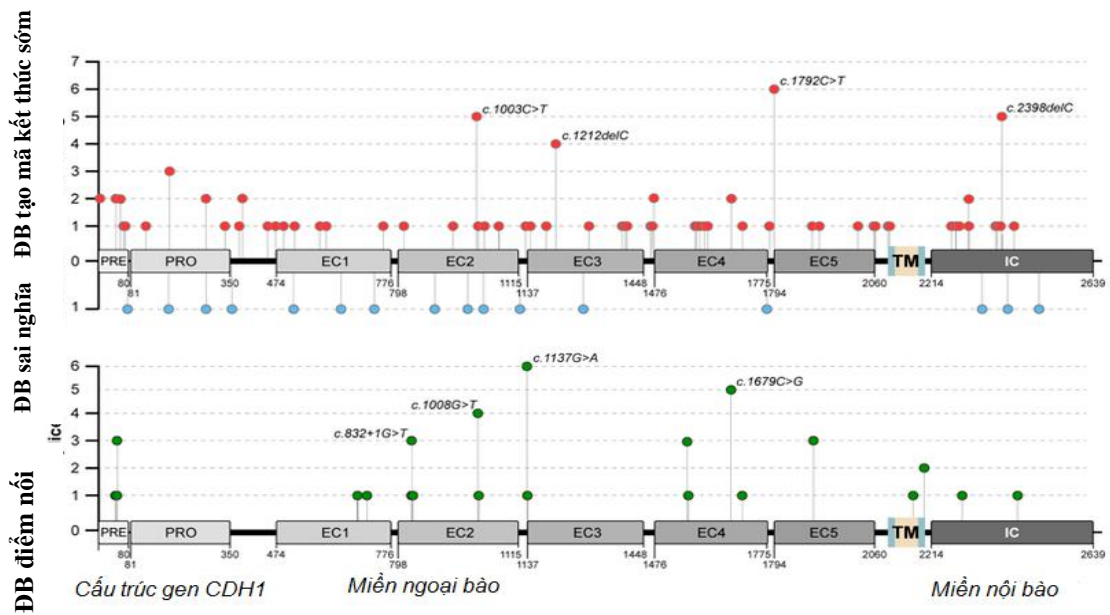
cứu (trang 45). Toàn bộ các quá trình trên đều được tuân thủ tuyệt đối theo quy trình đã được chuẩn hóa. Trong quá trình thực hiện, giai đoạn tách chiết DNA từ máu toàn phần là khâu đầu tiên, nhằm cung cấp nguyên liệu để thực hiện các bước tiếp theo. Chính vì thế, số lượng và chất lượng của DNA sau tách chiết là rất quan trọng. Nghiên cứu của chúng tôi đã sử dụng bộ kit tách chiết của hãng Gene All (Hàn Quốc). Ưu điểm của việc sử dụng bộ kit này là quy trình đơn giản, dễ thực hiện, thu được kết quả DNA khá đồng đều và có độ tinh sạch cao. Bước tiếp theo là khuếch đại đoạn DNA đích với các cặp mồi đặc hiệu. Nhưng cặp mồi này được thiết kế tuân thủ theo nguyên tắc thiết kế mồi và được đối chiếu trên GeneBank. Sản phẩm PCR sau khi được khuếch đại sẽ tiến hành điện di sản phẩm, việc đánh giá các cặp mồi được thiết kế đặc hiệu thông qua hình ảnh điện di trên gel agarose. Các vạch điện di rõ nét, đúng kích thước sản phẩm theo chứng dương, không có sản phẩm phụ.

Đột biến hay gặp nhất liên quan đến gen *CDH1* là dạng đột biến điểm (trên 90%) và chỉ có khoảng 4% là đột biến mất đoạn lớn. Do đó, kỹ thuật chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu là giải trình tự gen theo phương pháp Sanger. Ưu điểm của phương pháp này là cho phép phát hiện các đột biến điểm, giá thành rẻ, dễ thực hiện. Kết quả giải trình tự gen được phân tích trực tiếp trên các phần mềm hỗ trợ và so sánh với trình tự gốc trên GeneBank. Trong nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện 2/13 mẫu được thực hiện tại Viện công nghệ Kyoto (Nhật Bản) là có đột biến, 2 mẫu này đã được chúng tôi phân tích lại tại Trung tâm Kiểm chuẩn chất lượng Xét nghiệm (Đại học Y Hà Nội) và cho kết quả tương tự. Các đột biến được phát hiện trong nghiên cứu sẽ được tra cứu trực tiếp trên các hệ thống dữ liệu sẵn có để xác định đột biến đã được công bố và tiềm năng gây bệnh của đột biến.

Cho đến nay thì đột biến gen *CDH1* được tìm thấy như là một trong những nguyên nhân chính gây bệnh UTDD lan tỏa di truyền. Theo tiêu chuẩn lâm sàng để chọn bệnh nhân đủ điều kiện cho phân tích đột biến gen *CDH1*

của Hiệp hội liên kết ung thư dạ dày thế giới (IGCLC) năm 1999, tỷ lệ đột biến được báo cáo là 30 – 40% [6] . Khi sử dụng tiêu chuẩn mới được cập nhật và sửa đổi năm 2015 thì tỷ lệ phát hiện đột biến giảm xuống còn 10 – 18% [14] . Tỷ lệ phát hiện này không giống nhau giữa các vùng địa lý, Corso và cộng sự (2012), khi so sánh tỷ lệ mắc UTDD lan tỏa di truyền do đột biến gen *CDH1* giữa các quốc gia có tỷ lệ mắc UTDD trung bình và cao với khu vực có tỷ lệ mắc thấp. Kết quả cho thấy tỷ lệ mang đột biến ở khu vực có tỷ lệ mắc UTDD trung bình và cao thấp hơn so với khu vực có tỷ lệ mắc thấp (tương ứng là 13,1% so với 77%,  $p < 0,001$ ) [141] . Một vài nghiên cứu ở các nước có tỷ lệ UTDD cao như Hàn Quốc, Nhật Bản và Bồ Đào Nha, tỷ lệ phát hiện đột biến trong UTDD lan tỏa di truyền từ 8 – 15% [57] . Điều đó cho thấy khu vực có tỷ lệ mắc UTDD trung bình và cao có liên quan với các yếu tố nguy cơ về môi trường (lối sống, chế độ ăn uống) hay tỷ lệ nhiễm *H. pylori*, còn yếu tố di truyền đóng góp một phần nhỏ. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng tiêu chuẩn chẩn đoán mới năm 2015, nên tỷ lệ phát hiện đột biến gen *CDH1* là 8,89% (4/45), kết quả này khá thấp so với tỷ lệ đột biến trong các nghiên cứu trên thế giới, do cỡ mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi nhỏ và tiêu chuẩn chẩn đoán mới làm mở rộng thêm đối tượng nghiên cứu cũng dẫn đến làm giảm tỷ lệ mang đột biến gen.

Gen *CDH1* mã hóa protein E-cadherin, nằm trên NST 16, tại vị trí 16q22.1, gồm 16 exon và 15 intron. Đã có hơn 155 đột biến gây bệnh được mô tả trong bệnh UTDD lan tỏa di truyền [14] và các đột biến này nằm rải rác trên toàn bộ chiều dài gen *CDH1*, bao gồm cả exon và intron [141] , [142] , tuy nhiên có một số ít các đột biến gây bệnh được báo cáo ở các gia đình khác nhau, có thể do có tổ tiên chung hoặc đột biến ở các điểm nóng [14] , [142] . Một nghiên cứu tổng hợp của Lo và cộng sự (2019) về mối liên quan giữa vị trí phân bố các đột biến trên gen với biểu hiện kiểu hình trong các gia đình bị UTDD lan tỏa:



**Hình 4.1. Bản đồ phân bố các đột biến trên gen *CDH1* [142]**

Hình 4.1 cho thấy phân bố các đột biến trên gen *CDH1* trong nghiên cứu của Lo và cộng sự, các đột biến này phân bố trải đều trên các vùng khác nhau của gen bao gồm miền propeptid tín hiệu ở đầu chuỗi, rồi đến miền ngoại bào (từ EC1 – EC5), miền xuyên màng và miền nội bào. Đối với các đột biến tạo mã kết thúc sớm thì miền EC5 ít bị ảnh hưởng nhất, miền propeptid bị ảnh hưởng nhiều nhất. Trong đột biến tại vị trí nối thì đột biến tập trung ở miền EC2 và EC4. Mặc dù phần lớn các đột biến trong nghiên cứu này được tìm thấy ở các gia đình khác nhau, nhưng nghiên cứu cho thấy có các đột biến tái phát ở các gia đình khác nhau, được báo cáo liên quan đến ít nhất bốn gia đình bao gồm: các đột biến tạo mã kết thúc sớm như c.1003C>T, c.1212delC, c.1792C>T, c.2398delC và các đột biến tại vị trí nối c.1008G>T, c.1137G>A và c.1679C>G [142].

Nghiên cứu của chúng tôi tiến hành trên 45 bệnh nhân được chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền, thực hiện giải trình tự trên 16 exon (mỗi được thiết kế cho 16 exon bao trùm cả vùng mã hóa và vùng nối intron với exon) của gen *CDH1*, với 4 đột biến được tìm thấy ở exon 5, exon 9, intron 12 và exon 13. Cả 3 exon và 1 intron này đều nằm ở vùng ngoại bào lần lượt là

EC1, EC3 và EC5. Mặc dù số lượng bệnh nhân và tỷ lệ phát hiện đột biến không cao nhưng nó cũng phù hợp với các báo cáo về sự phân bố đột biến trên gen *CDH1*.

### **Đột biến vô nghĩa c.639 G>A (W213\*)**

Đột biến gây mất chức năng của gen *CDH1* là nguyên nhân di truyền gây bệnh duy nhất được mô tả khoảng 30% trong bệnh UTDD lan tỏa di truyền [9] , [15] , trong đó các đột biến vô nghĩa chiếm 19,7%, dẫn đến mất hoàn toàn biểu hiện E-cadherin do sự xuất hiện của các mã kết thúc sớm [100] , [143] . Sự thiếu hụt E-cadherin làm suy yếu hiệu quả của các quá trình khác nhau và khả năng sống sót của tế bào [144] . Mất E-cadherin gây mất kết dính tế bào - tế bào, cho phép các tế bào tách khỏi khối u chính, xâm nhập vào các mô xung quanh và di chuyển đến các tổ chức ở xa. Cấu trúc của E-cadherin có miền ngoại bào gồm 5 tiểu phần (EC1 – EC5) được mã hóa bởi exon 4 đến exon 13, một miền xuyên màng và miền nội bào được mã hóa bởi exon 15 và 16. Miền ngoại bào lớn chịu trách nhiệm cho việc liên kết  $Ca^{2+}$  là yếu tố quan trọng đối với sự kết dính tế bào [145] . Đột biến vô nghĩa được phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi là c.639 G>A (W213\*), đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid G thành A ở vị trí c.639, dẫn đến tạo một mã kết thúc sớm UGA ở vị trí p.213 nằm trên vùng mã hóa của exon 5, tương ứng với vị trí EC1 trong miền ngoại bào, có chứa liên kết  $Ca^{2+}$  rất cần thiết đối với sự kết dính tế bào. Như vậy toàn bộ cấu trúc của protein từ sau tiểu phần EC1 vùng ngoại bào sẽ không được tổng hợp dẫn tới giảm hoặc mất chức năng của protein E-cadherin.

Bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến vô nghĩa c.639 G>A (W213\*), tạo mã kết thúc sớm trong nghiên cứu của chúng tôi là một bệnh nhân nam 28 tuổi, có tiền sử viêm dạ dày, sử dụng rượu và hút thuốc lá, không có tiền sử gia đình mắc UTDD. Cách ngày vào viện khoảng 4 tháng bệnh nhân có xuất hiện đau vùng thượng vị, ăn uống kém, hay buồn

nôn, bệnh nhân sút 4 – 5kg trong vòng 4 tháng. Vào viện vì đau thượng vị, gầy sút cân và nổi hạch thượng đòn, bệnh nhân được nội soi, sinh thiết dạ dày. Kết quả nội soi có tổn thương sùi, kích thước > 3cm ở vị trí thân vị, với test *H. Pylori* dương tính và kết quả mô bệnh học của dạ dày là ung thư biểu mô tế bào nhẵn. Bệnh nhân được chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền giai đoạn IV, di căn hạch thượng đòn và tử vong sau 4 tháng phát hiện ra bệnh. Phân tích gen *CDH1* phát hiện ra đột biến dị hợp tử c.639G>A (p.W213\*). Kết quả hóa mô miễn dịch ở bệnh nhân cho thấy có sự giảm biểu hiện protein E-cadherin. Bên cạnh việc mang đột biến gen *CDH1* thì bệnh nhân cũng có các yếu tố nguy cơ gây bệnh như tiền sử sử dụng rượu, hút thuốc lá và tình trạng nhiễm *H. pylori* dương tính, những yếu tố này mặc dù mối liên quan với UTDD lan tỏa di truyền chưa rõ ràng, nhưng lại là những yếu tố nguy cơ chính gây UTDD nói chung đặc biệt là tình trạng nhiễm *H. Pylori*.

Đột biến gen *CDH1* được phát hiện đầu tiên bởi Guilford vào năm 1998 thông qua phân tích đột biến trong 3 gia đình người Maori bị UTDD lan tỏa khởi phát sớm ở New Zealand [9] . Trong 3 gia đình trên có 2 gia đình mang đột biến vô nghĩa là c.2095C>T (p.Q699\*) nằm trên vùng mã hóa của exon 13, tạo mã kết thúc sớm tại vị trí p.699 và đột biến c.70G>T (p.E24\*) nằm trên vùng mã hóa của exon 2 tạo mã kết thúc sớm tại vị trí p.24 [9] . Các đột biến này đều ở thể dị hợp tử và là đột biến gây bệnh.

Nghiên cứu của Ghaffari (2010) trong một gia đình người Iran mắc UTDD lan tỏa di truyền, đã phát hiện ra một đột biến vô nghĩa tại exon 14 là c.2275G>T tạo ra một mã kết thúc sớm ở vị trí p.758, làm cho protein E-cadherin bị cắt ngắn thiếu hẳn miền nội bào. Và đây cũng là gia đình Iran đầu tiên được phát hiện bị UTDD lan tỏa mang đột biến gen *CDH1* [146] . Trong nghiên cứu của Enrique (2019), phát hiện ra một đột biến vô nghĩa mới ở thể dị hợp tử nằm trên exon 10 là c.1531C>T (p.Q511\*) trên một bệnh nhân 22 tuổi bị UTDD thể lan tỏa không có tiền sử gia đình. Đột biến vô nghĩa này

dẫn đến mã kết thúc sớm ở EC3 thuộc miền ngoại bào. Đột biến này được mô tả là gây bệnh khi trong gia đình có 5 thành viên được xác định có mang đột biến giống bệnh nhân, trong đó có em gái trải qua cuộc cắt dạ dày dự phòng và làm mô bệnh học phát hiện ra ung thư biểu mô tế bào nhẵn. Tuy nhiên UTDD xuất hiện ở các thành viên trẻ tuổi trong khi các thành viên lớn tuổi không có biểu hiện bệnh, và việc nhiễm vi khuẩn *H. pylori* hay tác động của yếu tố môi trường có thể liên quan đến sự tiến triển này [128]. Nghiên cứu này nhấn mạnh mối liên quan giữa việc xác định người mang đột biến trong những gia đình bị UTDD lan tỏa di truyền có biểu hiện khởi phát bệnh sớm.

Nghiên cứu của Jeffrey và cộng sự (2007), đăng trên tạp chí Ngoại khoa về cắt dạ dày dự phòng ở một số thành viên gia đình có người bị UTDD lan tỏa mang đột biến vô nghĩa tạo mã kết thúc sớm c.1003C>T (R335\*) ở exon 7, nằm ở khu vực ngoại bào. Đột biến tạo ra một mã kết thúc sớm ở vị trí p.335, tạo ra các peptide bị cắt ngắn làm thiếu các miền liên kết  $\beta$ -catenin cần thiết cho sự kết dính tế bào chặt chẽ. Có 6 thành viên trong gia đình mang đột biến tham gia cắt dạ dày dự phòng, không có bệnh nhân nào bị bệnh lý liên quan đến dạ dày trước đó. Phân tích bệnh lý của từng mẫu dạ dày sau khi phẫu thuật cho thấy có ung thư biểu mô tế bào nhẵn vẫn giới hạn ở lớp niêm mạc (T1). Tiến hành làm hóa mô miễn dịch đối với protein E-cadherin đã cho thấy ở các bệnh phẩm ung thư biểu mô tế bào nhẵn trong các thành viên mang đột biến gen không có biểu hiện protein E-cadherin [106]. Điều đó cho thấy khả năng gây bệnh của đột biến vô nghĩa tạo mã kết thúc sớm ở gen *CDH1*.

Với các triệu chứng lâm sàng rầm rộ, tuổi khởi phát sớm và tử vong nhanh ở bệnh nhân mang đột biến vô nghĩa tạo mã kết thúc sớm trong nghiên cứu của chúng tôi, cũng tương tự với một số nghiên cứu trên thế giới. Một nghiên cứu tổng hợp của Van Der Post (2015), ở những bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến gây bệnh của gen *CDH1* có tỷ lệ sống sót thấp hơn ở 1 và 5 năm (tương ứng 36% và 4%) so với những bệnh



nhân UTDD lan tỏa di truyền không có đột biến gen *CDHI* (tương ứng 48% và 13%) [7] . Nghiên cứu của Enrique và cộng sự, đưa ra một trường hợp bệnh nhân nam 22 tuổi được chẩn đoán UTDD lan tỏa di truyền giai đoạn IV, mang một đột biến dị hợp c.1531C>T (p.Gln511\*) tạo mã kết thúc sớm, bệnh nhân được hóa trị liệu nhằm giảm nhẹ bệnh nhưng chết sau 3 tháng kể từ khi phát hiện. Tại thời điểm chẩn đoán bệnh nhân không có tiền sử gia đình mắc UTDD [128] . Caggiari và cộng sự (2017) đã phát hiện ra một đột biến mới của gen *CDHI* ở một bệnh nhân nam 41 tuổi được chẩn đoán là UTDD lan tỏa di truyền. Đột biến c.1612delG dẫn đến tạo mã kết thúc sớm ở codon 556 (p.Asp538Thrfs\*19) nằm trên EC4 thuộc miền ngoại bào. Bệnh nhân được điều trị bằng hóa chất nhưng sau 3 tháng điều trị tình trạng bệnh nhanh chóng xấu đi với sự di căn rõ rệt phúc mạc, gan và tụy [62] . Các nghiên cứu trên đều cho thấy ở những bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến tạo mã kết thúc sớm đều có tình trạng bệnh nặng nề, tiên lượng xấu với tuổi khởi phát bệnh sớm và tỷ lệ tử vong cao.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, bệnh nhân B4 ngoài mang một đột biến gây bệnh còn phát hiện thêm 2 SNP trên gen *CDHI* là c.48+6C>T nằm ở intron 1 và c.2076T>C (A692A) nằm ở exon 13. Tuy nhiên, 2 SNP này đều lành tính và chưa tìm thấy mối liên hệ nào giữa 2 SNP này với tình trạng bệnh UTDD lan tỏa di truyền.

#### **Đột biến tại vị trí nối exon – intron (c.1937-13T>C)**

Trong các loại đột biến gen *CDHI* thì đột biến tại vị trí nối chiếm khoảng 16% [14] . Kết quả giải trình tự gen *CDHI* trong nghiên cứu của chúng tôi phát hiện bệnh nhân mang mã số B732 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid T thành C tại vị trí c.1937-13 ở vùng intron 12, trước bộ ba đầu tiên mã hóa exon 13 là 13 nucleotid. Đây là đột biến thay thế nucleotid tại vị trí nối giữa intron và exon, có thể làm ảnh hưởng đến sự tạo thành sợi mRNA hoàn chỉnh, từ đó làm thay đổi cấu trúc và chức năng của protein.

Đột biến c.1937-13T>C nằm ở intron 12 của gen *CDH1*, lần đầu tiên được phát hiện bởi Oliveira và cộng sự (2002) [147]. Sau đó được tìm thấy trong một nghiên cứu về đột biến gen *CDH1* ở bệnh nhân UTDD khởi phát sớm của tác giả Bacani (2006) [148]. Tuy nhiên cả hai nghiên cứu trên đều chưa chứng minh được cơ chế gây bệnh của đột biến này. Đến năm 2013, Garziera và cộng sự đã chứng minh đột biến c.1937-13T>C dẫn đến một bản phiên mã bất thường với việc xóa bỏ exon 11 mã hóa cho miền EC4 trong cấu trúc gen *CDH1*, hình thành mã kết thúc sớm trong EC4 của miền ngoại bào. Việc hình thành mã kết thúc sớm ở vị trí EC4 làm cho protein E-cadherin thiếu miền xuyên màng và miền tế bào chất làm mất hoặc giảm chức năng của protein E-cadherin. Đột biến này trong nghiên cứu của Garziera được tìm thấy ở 2 bệnh nhân nữ bị UTDD thể lan tỏa, không có tiền sử gia đình mắc UTDD, tuổi mắc bệnh là 58 và 61 tuổi, cả hai đều bị nhiễm *H. Pylori*. Giả thuyết của nghiên cứu này đưa ra rằng có thể có liên quan giữa đột biến với yếu tố giới tính (nữ giới có nguy cơ mắc UTDD thể lan tỏa cao hơn nam giới [116]) và tình trạng nhiễm *H. Pylori* [149].

Bệnh nhân nữ mang đột biến c.1937-13T>C trong nghiên cứu của chúng tôi là một bệnh nhân nữ 34 tuổi, có tiền sử đau bụng vùng thượng vị, không có tiền sử gia đình mắc UTDD, không có tiền sử sử dụng rượu và hút thuốc lá, bệnh nhân có tiền sử nhiễm *H. Pylori*. Cách ngày vào viện 1 tháng bệnh nhân có xuất hiện đau thượng vị và nôn nhiều. Vào viện khám và làm nội soi dạ dày có tổn thương thâm nhiễm vùng hang vị, kích thước > 3cm với test *H. Pylori* dương tính, kết quả mô bệnh học cho hình ảnh ung thư biểu mô tế bào nhẵn, sau phẫu thuật cắt dạ dày toàn bộ được 1 tháng bệnh nhân xuất hiện đau nhức xương và khó đi lại. Bệnh nhân được chụp PET-CT để kiểm tra thì phát hiện có di căn xương (giai đoạn IV), bệnh nhân xin về và tử vong sau đó 1 tháng. Qua phân tích hóa mô miễn dịch cho thấy sự giảm rõ rệt biểu hiện của protein E-cadherin. Đặc điểm của bệnh nhân trong nghiên cứu này cũng

phù hợp với đặc điểm bệnh nhân mang cùng đột biến trong nghiên cứu của Garziera [149] . Đột biến gây bệnh c.1937-13T>C được phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi cũng đã được công bố trước đây bởi 3 tác giả khác nhau [149] , [147] , [148] . Điều này cho thấy các đột biến trên gen *CDH1* được phân bố khắp chiều dài của gen, tuy nhiên có một số ít (27%) các đột biến gây bệnh cũng được báo cáo ở các gia đình khác nhau khả năng có thể do đột biến xảy ra ở các điểm nóng trên gen *CDH1* [14] .

Những diễn biến lâm sàng rầm rộ, nặng nề cũng như tiên lượng xấu, tử vong nhanh ở bệnh nhân đều phù hợp với tình trạng đột biến gây bệnh của gen *CDH1*, đột biến tạo mã kết thúc sớm nằm trên EC4 thuộc miền ngoại bào, do đó protein E-cadherin bị cắt ngắn không thực hiện được chức năng kết dính tế bào ở miền ngoại bào. Một số nghiên cứu cho thấy khả năng sống sót thấp hơn ở những người bị UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến gây bệnh ở gen *CDH1* so với những người bị UTDD lan tỏa di truyền không có đột biến gen [7] . Ngoài ra, khi phân tích gen *CDH1* ở bệnh nhân B732 chúng tôi phát hiện ra có thêm 3 SNP đi kèm: c.48+6C>T, c.1008+131delGinsATC và c.2076T>C, có 2 SNP đã được công bố và không có khả năng gây bệnh, c.1008+131 delGinsATC chưa được công bố và khả năng gây bệnh cũng chưa rõ ràng, không tìm thấy mối liên quan giữa các SNP này với tình trạng bệnh cũng như đặc điểm về lâm sàng.

#### **Các đột biến sai nghĩa phát hiện trong nghiên cứu**

Khoảng 80% các trường hợp mang đột biến gen *CDH1* là đột biến tạo mã kết thúc sớm gây mất biểu hiện E-cadherin. Còn lại khoảng 20% bệnh nhân mang đột biến sai nghĩa dẫn đến chiều dài của E-cadherin giữ nguyên với sự thay thế một acid amin này bằng một acid amin khác [96] , [143] . Vì vậy, việc xác định khả năng gây bệnh của dạng đột biến sai nghĩa cần được làm sáng tỏ, với những dữ liệu về phá hệ, đặc điểm về lâm sàng và dữ liệu về chức năng đều phải được đưa ra để dự đoán khả năng gây bệnh [97]

. Đột biến loại này đại diện cho một vấn đề về tư vấn di truyền, giám sát lâm sàng đối với người mang đột biến và gia đình họ vì việc xác định khả năng gây bệnh không đơn giản [90] . Do đó, việc đánh giá tác động của các đột biến sai nghĩa với sự điều hòa, hình dạng, chức năng của protein E-cadherin phải được thực hiện trong phòng thí nghiệm và là một thách thức.

Trong những năm gần đây, đã có nhiều nghiên cứu đi sâu vào việc phân loại, xác định khả năng gây bệnh của các đột biến sai nghĩa của protein E-cadherin [96] , [110] , [150] . Một cách tiếp cận đa ngành khi kết hợp các dữ liệu về dân số, phá hệ gia đình, phân tích *in silico* và các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm [151] , [96] .

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát hiện ra 2 đột biến sai nghĩa gồm: c.1298A>G (p.D433G) và c.1990A>C (p.K664Q), 2 đột biến này chưa từng được báo cáo trước đó.

#### ***Đột biến c.1298A>G (p.D433G)***

Kết quả giải trình tự gen *CDH1* đã phát hiện ra bệnh nhân mã số B532 có đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid A thành G ở vị trí c.1298 trên chuỗi c.DNA, dẫn đến sự thay đổi acid amin từ aspartic (là một acid amin có tính chất acid) thành glycin (một acid amin không phân cực) ở vị trí p.433, đây là đột biến chưa được công bố trước đó. Đột biến này nằm trên vùng mã hóa của exon 9, thuộc EC3 của miền ngoại bào, đây là miền có chức năng quan trọng trong việc kết nối tế bào phụ thuộc  $Ca^{2+}$  và là vùng được bảo tồn cao [152] . Đột biến này được đưa vào phân tích *in silico* để dự đoán giá trị thay đổi của acid amin lên cấu trúc và/hoặc chức năng của protein. Phân tích bằng công cụ Polyphen 2 cho thấy đột biến này có khả năng gây bệnh (0,519) với độ nhạy là 0,88 và độ đặc hiệu là 0,9 (bảng 3.10). Khi sử dụng thuật toán SIFT điểm số của đột biến này là 0,04 và được phân loại là đột biến có khả năng gây bệnh. Tuy nhiên dự đoán khả năng gây bệnh bằng phần mềm Mutation Taster

cho kết quả có khả năng lành tính. Do đó, để xác định chính xác khả năng gây bệnh của đột biến mới này ta cần phải tìm hiểu về phả hệ, xác định tính di truyền của đột biến trong phả hệ và có các thử nghiệm chuyên sâu trong phân tích *in vitro*.

Bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến sai nghĩa c.1298A>G (p.D433G) là bệnh nhân nam 27 tuổi, chưa có tiền sử mắc bệnh về dạ dày, có sử dụng rượu và hút thuốc lá, tiền sử gia đình chưa có ai mắc bệnh UTDD. Cách ngày vào viện khoảng 1 tháng bệnh nhân xuất hiện đau vùng thượng vị, kèm theo mệt mỏi, ăn uống kém. Vào viện được khám, nội soi dạ dày có tổn thương sùi kích thước 2 – 3cm ở vị trí thân vị, làm mô bệnh học có kết quả ung thư biểu mô tế bào nhẵn. Bệnh nhân được phẫu thuật cắt toàn bộ dạ dày, vét hạch và điều trị hóa chất hỗ trợ 8 chu kỳ, hiện tại bệnh nhân vẫn sống. Kết quả hóa mô miễn dịch dương tính (+) với E-cadherin, cường độ biểu hiện của protein E-cadherin giảm nhẹ.

#### ***Đột biến c.1990A>C (p.K664Q)***

Kết quả giải trình tự gen *CDH1* đã phát hiện bệnh nhân mã số B151 mang đột biến dị hợp tử thay thế nucleotid A thành C ở vị trí c.1990, dẫn đến sự thay đổi acid amin ở vị trí p.664 từ lysine (là acid amin tích điện dương) thành glutamin (là acid amin phân cực ưa nước), đây cũng là một đột biến chưa được công bố. Đột biến này nằm trên vùng mã hóa của exon 13, thuộc miền ngoại bào tại tiểu phần EC5, đây cũng chính là nơi tiếp giáp giữa miền ngoại bào và vùng xuyên màng đơn, khu vực quan trọng cho đặc tính kết dính của tế bào [145]. Kết quả dự đoán theo phân tích Polyphen 2 và thuật toán SIFT đều cho thấy khả năng gây bệnh của đột biến này ở mức độ thấp, dự đoán bằng phần mềm Mutation Taster cho thấy đột biến này có khả năng gây bệnh. Tuy nhiên đột biến c.1990A>C được phát hiện ở bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền có bố đẻ bị UTDD. Do đó để khẳng định khả năng

gây bệnh của đột biến cần đánh giá lại khi có xét nghiệm di truyền trong phả hệ gia đình bệnh nhân và các nghiên cứu sâu trong phân tích *in vitro*.

Bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến sai nghĩa c.1990A>C (p.K664Q) là bệnh nhân nữ 35 tuổi, không có tiền sử mắc bệnh lý dạ dày, không sử dụng rượu cũng như không hút thuốc lá. Tiền sử gia đình có bố đẻ chết vì UTDD ở tuổi 63. Bệnh nhân vào viện vì lý do ngất xỉu và được chẩn đoán thiếu máu do xuất huyết tiêu hóa. Kết quả nội soi có ổ loét vùng thân vị kích thước 2 cm với test *H.Pylori* âm tính, kết quả mô bệnh học vết loét dạ dày là ung thư biểu mô tế bào nhẵn. Bệnh nhân được phẫu thuật cắt 4/5 dạ dày, nạo vét hạch đến D4, sau đó được hóa trị liệu hỗ trợ, hiện tại bệnh nhân vẫn sống. Kết quả hóa mô miễn dịch dương tính (++) với E-cadherin, tức là sự biểu hiện của protein E-cadherin vẫn bình thường.

Sự liên quan về lâm sàng với chức năng của các đột biến sai nghĩa ở gen *CDH1* vẫn còn gây nhiều tranh cãi, một phần do chiều dài đoạn protein không thay đổi và mức độ biểu hiện protein vẫn rõ ràng. Vì vậy, đột biến sai nghĩa cần phải thực hiện thêm các nghiên cứu bổ sung để đánh giá sự thay đổi này có ảnh hưởng đến biểu hiện, chức năng của E-cadherin, cũng như các cơ chế tín hiệu từ miền ngoại bào qua tế bào chất vào nhân làm thay đổi biểu hiện gen hay không. Trong nghiên cứu này do phạm vi của luận án nên chúng tôi chưa có những phân tích sâu hơn trong *in vitro* đối với 2 đột biến sai nghĩa trên, do đó việc xác định khả năng gây bệnh chủ yếu dựa vào phần mềm dự đoán *in silico* và phân tích di truyền phả hệ. Các dữ liệu về di truyền trong hai gia đình mang đột biến sai nghĩa này sẽ được chúng tôi đề cập đến trong phần sau.

Gần đây, các phần mềm phân tích *in silico* đã được sử dụng rộng rãi, liên tục được phát triển để ứng dụng trong nghiên cứu di truyền ở người và đặc biệt là trong bệnh ung thư. Những dự đoán này có thể cung cấp những thông tin hữu ích về tác động của đột biến lên bản phiên mã gốc hoặc lên bản thay thế, cũng như tác động tiềm ẩn của nó lên cấu trúc và chức năng của protein

[110] . Hầu hết các công cụ hiện có đều tính đến mức độ bảo tồn của một nucleotid cụ thể, vị trí trong chuỗi protein, tính chất sinh hóa của sự thay thế acid amin. Việc sử dụng nhiều chương trình phần mềm để giải thích sự thay đổi của các acid amin cũng được khuyến nghị, vì các chương trình này dựa trên các thuật toán riêng biệt để cho ra kết quả đầu ra khác nhau [112] . Các đột biến sai nghĩa được dự đoán là có khả năng gây bệnh nên áp dụng ít nhất là 2 công cụ trong phân tích *in silico* để dự đoán [14] . Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng phân tích Pholyphen-2, thuật toán SIFT và phần mềm Mutation Taster để dự đoán tác động của hai đột biến sai nghĩa, và đây cũng là công cụ tiêu chuẩn trong phân tích *in silico* [110] , [111] , [153] .

Nhiều nghiên cứu trên thế giới về đột biến gen *CDHI* trên bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền, đã sử dụng phần mềm tin sinh học trong dự đoán khả năng gây bệnh của các đột biến sai nghĩa mới. Yelskava và cộng sự (2016), đã phát hiện ra một đột biến sai nghĩa c.1679C>G (p.T560R) ở một bệnh nhân nam giới 50 tuổi được chẩn đoán mắc UTDD lan tỏa di truyền với một tiền sử gia đình có 2 anh trai đều mắc UTDD. Đột biến này làm thay acid amin threonine (T) thành arginine (R) tại vị trí p.560. Trong phân tích *in silico* sử dụng Pholyphen-2 và SIFT để dự đoán đột biến thì đều cho kết quả có khả năng gây bệnh, sự thay đổi acid amin này có ảnh hưởng đến chức năng protein E-cadherin. Để làm sáng tỏ dự đoán một phân tích sâu trong nghiên cứu đã được đưa ra chứng minh khả năng gây bệnh của đột biến [102] . Một nghiên cứu ở Trung Quốc (2013), đã phát hiện ra 2 đột biến sai nghĩa mới là c.604G>A (p.V202I) và c.1888C>G (p.L630V). Phân tích *in silico* khi sử dụng cả SIFT và Pholyphen-2 cho thấy đột biến sai nghĩa p.L630V có khả năng gây bệnh trong khi đột biến p.V202I thì không [154] . Roviello và cộng sự, mô tả một đột biến gen *CDHI* đầu tiên được phát hiện trong một gia đình người Ý vào năm 2007. Qua đó một đột biến sai nghĩa của gen *CDHI* được tìm thấy đó là c.1118C>T (p.Pro373Leu), phân tích *in silico* và làm hóa mô

miền dịch có cường độ biểu hiện E-cadherin giảm cho thấy một đột biến có khả năng gây bệnh [122] . Năm 2013, Garziera và cộng sự đã phát hiện một đột biến mới tại exon 6 là c.820G>A (p.G274S) trên một bệnh nhân UTDD lan tỏa không có tiền sử gia đình bị UTDD. Đột biến này nằm ở EC2 của miền ngoại bào, nơi gắn với các liên kết  $Ca^{2+}$ , yếu tố quan trọng đối với sự kết dính tế bào. Tuy nhiên khi phân tích *in silico* cho thấy đột biến này có khả năng lành tính, điều đó cũng phù hợp với thử nghiệm *in vitro*, cho thấy đột biến p.G274S không ảnh hưởng đến chức năng của protein E-cadherin [155] . Guindalini và cộng sự (2019), nghiên cứu ở 88 bệnh nhân UTDD khởi phát sớm, trong đó 55% đáp ứng tiêu chuẩn UTDD lan tỏa di truyền. Trong các đột biến mới tìm được thì có 4 đột biến sai nghĩa gồm: c.313T>A, c.387G>T, c.1676G>A và c.1806C>A. Sử dụng phân tích *in silico* đều cho thấy 4 đột biến sai nghĩa này đều đưa ra kết quả không thống nhất giữa các công cụ phân tích. Các đột biến này được coi là lành tính khi sử dụng SIFT và Polyphen-2, nhưng phần mềm Mutation Taster lại đưa ra các đột biến này đều có khả năng gây bệnh. Do đó các đột biến sai nghĩa này hiện nay vẫn được xếp vào loại đột biến có ý nghĩa không chắc chắn [156] . Một nghiên cứu về đột biến gen *CDH1* ở Brazil, gồm 6 bệnh nhân đáp ứng về tiêu chí của bệnh UTDD lan tỏa di truyền, nghiên cứu đã phát hiện ra 1 đột biến vô nghĩa dẫn đến tạo mã kết thúc sớm c.1023T>G (p.Y341\*) nằm trên exon 8 và một đột biến sai nghĩa c.1849G>A (p.A617T) nằm trên exon 12. Phân tích được thực hiện bởi phần mềm SIFT và Polyphen-2 cho thấy kết quả dự đoán đối với đột biến sai nghĩa có khả năng gây bệnh mức độ thấp [157] . Tuy nhiên, đột biến sai nghĩa c.1849G>A (p.A617T) cũng đã được mô tả trong một nghiên cứu của Suriano và cộng sự, nghiên cứu này đã chứng minh được sự bất hoạt chức năng đối với protein E-cadherin của đột biến này trong phân tích *in vitro* [96] .

Qua những đặc điểm lâm sàng của hai bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền B532 và B151 mang đột biến sai nghĩa nêu trên có một vài đặc điểm



nổi bật như: Tuổi phát hiện bệnh trẻ (< 40 tuổi). Hai bệnh nhân khi phát hiện bệnh ở giai đoạn II, mà trong UTDD thể lan tỏa ở giai đoạn sớm có thể được điều trị bằng cắt dạ dày thì tiên lượng thường tốt hơn so với UTDD thể ruột. Nhưng ở UTDD thể lan tỏa mà được phát hiện ở giai đoạn muộn thì tiên lượng bệnh xấu hơn [158]. Tỷ lệ sống sau 5 năm nếu được chẩn đoán và điều trị trước di căn là 67%, tỷ lệ sống khác nhau dựa trên giai đoạn bệnh khi được can thiệp phẫu thuật, với những khối u ở giai đoạn IA hay IB thì tỷ lệ sống trên 5 năm lần lượt là 94% và 88%. Mặt khác khối u ở giai đoạn IIIC được điều trị phẫu thuật và hóa trị bổ trợ thì cơ hội sống sót lên đến 18% [159]. Hiện tại, sau phẫu thuật cắt dạ dày và điều trị hóa chất bổ trợ 2 bệnh nhân vẫn sống. Tác động lâm sàng của những đột biến sai nghĩa hiện vẫn còn gây nhiều tranh cãi vì trong hầu hết các trường hợp đoạn protein E-cadherin vẫn giữ nguyên chiều dài và mức độ biểu hiện đều đặn vẫn được quan sát. Do đó, khi xác định các đột biến sai nghĩa ở gen *CDH1*, cần phải thực hiện các nghiên cứu bổ sung để đánh giá sự thay đổi này có ảnh hưởng đến chức năng của E-cadherin cũng như các cơ chế tín hiệu nội bào hay không. Từ đó đưa ra được những tư vấn di truyền và khuyến nghị về lâm sàng hợp lý nhất cho những thành viên gia đình mang đột biến sai nghĩa.

### **Các SNP và đặc điểm của bệnh nhân mang SNP trong nghiên cứu**

Sự khác biệt cho mỗi cá thể được tạo bởi tính đa hình của các gen, hiện tượng đa hình đơn nucleotid (SNP) là sự khác nhau giữa các cá thể của một loài hay giữa các cặp NTS của một người. Giống nhau giữa các cá thể lên đến trên 90% và khoảng 1% sự khác biệt chủ yếu biểu hiện bởi các SNP [40]. Đa hình đơn nucleotid là một hiện tượng phổ biến, được coi là hậu quả của đột biến điểm thay thế một cặp nucleotid, tần số xuất hiện > 1% trong quần thể [40]. Hiện tượng đa hình đơn nucleotid có thể xảy ra ở vùng mã hóa (exon) và vùng không mã hóa (intron). Có những SNP làm thay đổi acid amin dẫn đến có thể ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein, có những SNP

mặc dù thay đổi nucleotid nhưng lại không làm thay đổi acid amin. Tuy nhiên nếu những SNP đó nằm trên vùng có chức năng quan trọng thì cũng có thể gây ra các ảnh hưởng đến chức năng của gen đó. Ứng dụng lớn nhất của SNP là so sánh vùng gen giữa các nhóm người với nhau (ví dụ như nhóm bị bệnh và không bị bệnh), xác định mối liên quan giữa SNP với sự hình thành và phát triển của bệnh. Để từ đó tiến hành sàng lọc, tư vấn di truyền cho những cá nhân có nguy cơ mắc bệnh cao.

Cho đến nay, đã có nhiều báo cáo về mối liên quan giữa đa hình đơn nucleotid trong gen *CDH1* với tính nhạy cảm của UTDD. Lin và cộng sự (2015), đã nghiên cứu về mối liên quan giữa các SNP của gen *CDH1* với UTDD ở tỉnh Giang Tô (Trung Quốc). Nghiên cứu đã xác định vai trò của 5 đa hình đơn nucleotid là rs33935154, rs121964871, rs121964874, rs121964875, rs121964876 ở nhóm UTDD (n=359, tuổi trung bình 56,69±9,51) và nhóm chứng (n=368, tuổi trung bình 58,12±10,68). Kết quả cho thấy có 1 SNP là rs121964871C>G có liên quan đến sự nhạy cảm của UTDD với một số xu hướng phụ thuộc vào độ tuổi và giới tính [160]. Tác giả Al-Moundhrin khi nghiên cứu trên một quần thể người Hồi giáo (nhóm bệnh là 192 bệnh nhân, nhóm chứng 179 người) với bốn đa hình đơn +54 T>C, -160 C>A, -616 G>C, -3159 T>C. Kết quả cho thấy kiểu gen -160 AA có liên quan đến tăng nguy cơ mắc UTDD (OR = 3.6, 95% CI: 1.1-11.8) với p = 0,03 [161].

Nghiên cứu của chúng tôi đã tìm thấy 11 SNP ở các bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền tham gia nghiên cứu. Với 9 SNP đã được công bố trên ngân hàng dữ liệu là c.48+6T>C, c.1020G>A (T340T), c.1711+47G>A, c.2076T>C (A692A), c.2103C>T (V701V), 2164+17dupA, c.2165-15C>A, c.2253C>T (N751N) và c.2649+54C>T. Có 2 SNP mới chưa được công bố là c.1712-54dupT, 1008+131delGinsATC. Có hơn 80% số bệnh nhân mang từ 2 SNP trở lên và gần 40% số bệnh nhân mang từ 3 SNP trở lên, không có mối liên

quan về lâm sàng và một số yếu tố nguy cơ giữa 2 nhóm mang từ 2 SNP trở xuống và nhóm mang nhiều hơn 2 SNP.

Đa hình đơn c.48+6T>C (rs3743674) này nằm ở vị trí nucleotid thứ sáu sau mã bộ ba mã hóa cuối của exon 1. Biến thể này cũng được tìm thấy ở nhiều nghiên cứu, xuất hiện ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng, các nghiên cứu cũng đã cho thấy không có mối liên quan giữa SNP này với UTDD lan tỏa di truyền [162]. Trong nghiên cứu của chúng tôi đa hình c.48+6T>C xuất hiện ở 39/45 bệnh nhân gồm cả người mang đột biến và không mang đột biến. Tuy trong nghiên cứu này chúng tôi không thực hiện trên nhóm chứng, nhưng với kết quả trên cũng cho thấy sự phù hợp với các nghiên cứu khác trên thế giới. Như trong nghiên cứu của Humar và cộng sự đã cho thấy hai đa hình c.48+6T>C, c.2076C>T có sự phân bố đồng đều ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng, nhưng khi phân tích kết hợp cả ba đa hình -160C>A, c.48+6T>C và c.2076C>T thì thấy có mối liên quan đáng kể với UTDD lan tỏa ( $p < 0,05$ ). Phải chăng, khi phân tích đa hình trong nghiên cứu của Humar, tác giả đã gợi ý rằng đa hình -160C>A có thể gây ra trạng thái mất cân bằng liên kết với một vị trí gây bệnh riêng biệt hoặc kết hợp với các biến thể chức năng khác nằm trong hoặc nằm ở gần vùng *CDHI* [42].

Đa hình c.2253C>T (rs 33964119) cũng đã được tìm thấy trong nhiều nghiên cứu trên thế giới [41], [163], [164]. Nghiên cứu của Zhang và cộng sự (2006), đã chỉ ra c.2253C>T có tần số cao hơn đáng kể ở bệnh nhân UTDD so với nhóm chứng không bị UTDD ( $p < 0,05$ ). Nó gợi ý cho một biến thể có thể gây ra một khuynh hướng UTDD, đặc biệt là ở nhóm UTDD có yếu tố gia đình [163]. Tác giả Chu (2014), đã cho thấy không có sự khác biệt giữa UTDD lan tỏa với nhóm chứng ở từng đa hình đơn lẻ. Tuy nhiên, khi kết hợp từ ba đa hình trên một bệnh nhân -160C>A, 48+6 T>C, 2076C>T hoặc -160C>A, 1937-13T>C, 2253C>T có thể làm tăng nguy cơ UTDD lan tỏa so với nhóm chứng, điều này có ý nghĩa hơn khi nghiên cứu cũng chỉ ra không có mối liên

quan nào giữa UTDD thể ruột với sự kết hợp của ba đa hình trên bệnh nhân [41]. Norero và cộng sự (2019), nghiên cứu ở 36 bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền đã phát hiện có 4 mẫu mang đa hình c.2253C>T [128]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, đa hình c.2253C>T được tìm thấy ở 4/45 bệnh nhân, cả 4 bệnh nhân này đều không mang đột biến kèm theo, có 3/4 bệnh nhân có tiền sử gia đình có người bị UTDD, với tuổi mắc bệnh từ 37 – 52 tuổi. Mặc dù trong nghiên cứu này chúng tôi không phân tích SNP -160C>A, tuy nhiên với những đặc điểm của 4 bệnh nhân vừa nêu cũng tương tự với một số nghiên cứu chúng tôi đã đưa ra ở bên trên. Phải chăng đa hình c.2253C>T khi kết hợp với một số yếu tố gia đình đã làm tăng nguy cơ mắc UTDD lan tỏa, từ đó có thể định hướng cho các nhà lâm sàng trong vấn đề tư vấn để dự phòng sớm bệnh UTDD cho những người có nguy cơ cao.

Đa hình c.2649+54C>T (rs 1801026) nằm trên intron 16, được tìm thấy ở nhiều nghiên cứu trước đó [161], [165], [166] và trong nghiên cứu này chúng tôi có 6/45 bệnh nhân bị UTDD lan tỏa di truyền mang đa hình c.2649+54C>T. Cả 6 bệnh nhân này đều không mang đột biến kèm theo. Nghiên cứu của Li và cộng sự (2011) đã nghiên cứu ảnh hưởng của đa hình c.2649+54C>T (rs1801026) trong gen *CDHI* với nguy cơ và sự tiến triển của một số loại ung thư trong đó có ung thư dạ dày. Kết quả cho thấy những người mang alen T làm giảm nguy cơ phát triển bệnh UTDD với OR=0,67 (95% CI=0,48 – 0,91). Không có mối liên quan giữa tần số kiểu gen và đặc điểm lâm sàng của UTDD, kết quả này cho thấy đa hình này có thể là một dấu hiệu cho tính nhạy cảm di truyền trong UTDD [166]. Zang và cộng sự, khi nghiên cứu ảnh hưởng của một số SNP của gen *CDHI* trên 239 bệnh nhân bị ung thư biểu mô tuyến dạ dày. Kết quả nghiên cứu của tác giả đã cho thấy, với đa hình c.2649+54C>T có alen C (C/C hoặc C/T) làm tăng nguy cơ đáng kể phát triển UTDD so với kiểu gen có alen T/T (tỷ lệ chênh lệch được điều chỉnh theo tuổi và giới tính). Tuy nhiên mối liên quan này chỉ có ý nghĩa ở

những người không hút thuốc và những người không có tiền sử gia đình bị ung thư đường tiêu hóa trên. Ngoài ra nghiên cứu cũng cho thấy có sự liên quan đáng kể khi kết hợp các haplotype của SNP trên gen *CDH1* -160C / -347G / +54C và -160C / -347GA / +54C với sự phát triển UTDD so với haplotype -160C / -347G / +54T. Nghiên cứu này đã chỉ ra tính đa hình trên gen *CDH1* có thể làm thay đổi tính nhạy cảm với ung thư biểu mô dạ dày [165] .

Kết quả phân tích gen *CDH1* trên bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền trong nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện ra một số SNP, có những SNP đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới cho thấy có mối liên quan và có thể là một yếu tố nguy cơ ảnh hưởng đến sự phát triển UTDD. Việc phân tích cả SNP trên gen *CDH1* ở những người có nguy cơ cao mắc UTDD là cần thiết để từ đó giúp cho các nhà lâm sàng đưa ra những tư vấn hợp lý cũng như chiến lược phòng ngừa bệnh cho bệnh nhân.

### **4.3. Đột biến gen *CDH1* ở các thành viên trong gia đình bệnh nhân mang đột biến gen *CDH1*.**

#### **4.3.1. Phả hệ gia đình của các bệnh nhân mang đột biến gen *CDH1***

Cơ chế gây bệnh trong UTDD lan tỏa di truyền là do đột biến gen trội nằm trên NST thường chi phối, là đột biến ở trạng thái dị hợp và có khả năng di truyền gen bệnh cho thế hệ sau. Lập phả hệ gia đình những bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền nói chung và những bệnh nhân mang đột biến gen *CDH1* nói riêng là một bước vô cùng quan trọng trong việc tư vấn, tiên lượng và phòng bệnh đối với các thành viên trong gia đình. Ngoài ra việc phân tích về dữ liệu di truyền và phả hệ gia đình là cách tiếp cận đầu tiên trong việc đánh giá đột biến sai nghĩa ở gen *CDH1*. Fitzgerald và Caldas đề xuất trong trường hợp có đột biến sai nghĩa thì ít nhất 4 thành viên trong gia đình của bệnh nhân mang đột biến cần được làm sàng lọc di truyền để tìm xem có đột biến sai nghĩa giống bệnh nhân không [109] .

Sau khi phát hiện đột biến gen *CDH1* trên bệnh nhân cụ thể gọi là đột biến đích, chúng tôi tiếp tục khuếch đại đoạn exon có chứa đột biến đích trên các thành viên có quan hệ huyết thống với bệnh nhân. Nghiên cứu đã thu thập được 36 mẫu thành viên ở gia đình của 4 bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến gen *CDH1*.

#### **Phả hệ gia đình bệnh nhân B4**

Gia đình bệnh nhân B4 có 11 thành viên tham gia vào nghiên cứu, tiền sử gia đình không có ai bị UTDD, tuy nhiên ở thế hệ ông bà của bệnh nhân có nhiều người mất cách đây đã lâu và không rõ nguyên nhân. Tại thời điểm nghiên cứu các thành viên tham gia chưa có phát hiện bệnh lý UTDD. Bệnh nhân B4 mang đột biến dị hợp tử c.639G>A tạo một mã kết thúc sớm tại vị trí 213 (p.W213\*) nằm trên vùng mã hóa của exon 5. Khi làm phân tích gen *CDH1* tại vị trí exon mang đột biến của bệnh nhân B4 trên 11 thành viên gia đình thì phát hiện có bố đẻ và bác ruột mang đột biến dị hợp tử giống với bệnh nhân. Mẹ đẻ, chị gái và một em trai không mang đột biến. Theo phả hệ của gia đình bệnh nhân, mặc dù thế hệ ông bà không còn ai, nhưng 2 thành viên gia đình mang đột biến là bố đẻ và người bác ruột điều đó cho thấy đây là đột biến được di truyền từ thế hệ trước. Người bố mang đột biến c.639G>A (p.W213\*) tiếp tục di truyền cho người con trai là bệnh nhân B4.

Đối tượng nghiên cứu trong phả hệ là bệnh nhân nam 28 tuổi mang đột biến vô nghĩa tạo mã kết thúc sớm, đột biến này làm cho chiều dài chuỗi acid amin bị cắt ngắn ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein E-cadherin. Biểu hiện lâm sàng bệnh nhân khởi phát bệnh sớm, các triệu chứng rầm rộ của UTDD lan tỏa giai đoạn cuối và tử vong nhanh. Nhưng bố đẻ (59 tuổi) và bác ruột (65 tuổi) cũng mang đột biến giống bệnh nhân mà chưa có biểu hiện bệnh. Thông thường, người mang đột biến gây bệnh trên gen *CDH1* sẽ tiến triển thành UTDD lan tỏa trong khoảng từ 35 đến 40 tuổi [7]. Do tính thấm của đột biến gen *CDH1* là tương đối cao, nguy cơ tích lũy ước tính mắc

UTDD ở người mang đột biến gây bệnh ở tuổi 80 là 70% đối với nam và 56% đối với nữ [7] , nhưng tính thấm của gen *CDHI* có đặc điểm là thấm không hoàn toàn do đó không phải ai mang đột biến gen *CDHI* cũng sẽ tiến triển thành UTDD. Như vậy trong trường hợp này có thể đưa ra các giả thuyết như: Do sự giảm tính thấm của gen ở từng cá thể nên bố đẻ và bác ruột của bệnh nhân mang đột biến gen nhưng chưa biểu hiện bệnh, hoặc sự tác động của yếu tố môi trường hay nhiễm vi khuẩn *H. Pylori* có thể liên quan đến sự tiến triển của bệnh. Vì bệnh nhân B4 với tuổi khởi phát bệnh sớm đều có các yếu tố nguy cơ như tiền sử sử dụng rượu ở mức có hại, hút thuốc lá và nhiễm *H. Pylori* dương tính. Trong một nghiên cứu của Enrique và cộng sự, đã phát hiện ra một đột biến vô nghĩa c.1531C>T tạo mã kết thúc sớm, đây là đột biến dị hợp tử và chưa được công bố. Đột biến này cũng tìm thấy ở 5 thành viên gia đình bệnh nhân là em gái, mẹ đẻ, bà ngoại, một người cô và một người em họ. Khi làm xét nghiệm gen cả 5 người này đều chưa bị UTDD, người em gái 20 tuổi trải qua một cuộc cắt dạ dày dự phòng, mô bệnh học của dạ dày cho thấy có hình ảnh ung thư biểu mô tế bào nhẵn ( $T_{1a}$ ), mặc dù không có biểu hiện bệnh lý về dạ dày. Tuy nhiên mẹ đẻ và bà ngoại của bệnh nhân sau khi được kiểm tra về nội soi dạ dày và làm sinh thiết ngẫu nhiên cũng không phát hiện ra bệnh [128] . Nghiên cứu này cho thấy đột biến gen *CDHI* gây bệnh UTDD ở những người trẻ tuổi được di truyền từ bà ngoại và mẹ đẻ, nhưng do giảm tính thấm của gen *CDHI* nên mẹ đẻ và bà ngoại mang đột biến gen chưa biểu hiện bệnh UTDD [128] .

Với sự đồng thuận tại hội thảo của Hiệp hội liên kết ung thư dạ dày thế giới 2015 đã đưa ra khuyến cáo với những người mang đột biến gây bệnh gen *CDHI* nên được xem xét để cắt dạ dày dự phòng, nhưng trước khi cắt dạ dày dự phòng cần tiến hành nội soi cơ bản để tìm tổn thương nghi ngờ cũng như làm mô bệnh học là cần thiết [7] .

Tuy nhiên tại Việt Nam, tất cả những nghiên cứu về UTDD đều được thực hiện khi khối u đã hình thành, do đó cắt dạ dày dự phòng vẫn còn rất mới mẻ ở những cá nhân trong gia đình UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến gây bệnh của gen *CDHI*, nhưng chưa biểu hiện bệnh lý UTDD. Ngoài ra, cắt dạ dày dự phòng khi chưa biểu hiện bệnh còn liên quan đến vấn đề y đức. Như vậy, trong trường hợp của bố đẻ và người bác của bệnh nhân B4 thì phương thức phòng bệnh là cần phải được giám sát về lâm sàng và theo dõi chặt bằng nội soi dạ dày định kỳ.

### **Phả hệ gia đình bệnh nhân B732**

Gia đình bệnh nhân B732 có 4 thành viên tham gia vào nghiên cứu, khi phân tích gen *CDHI* tại vị trí bệnh nhân B732 mang đột biến thì cho thấy có 3 người mang đột biến giống bệnh nhân là mẹ đẻ, một chị gái và một người cháu trai. Đột biến c.1937-13T>C nằm trên intron 12 là đột biến gây bệnh đã được công bố. Như vậy trong gia đình B732 thì người mẹ mang đột biến đã di truyền cho 2 người con gái, chị gái của bệnh nhân lại di truyền cho người con trai của mình. Bệnh nhân nữ 34 tuổi mang mã số B732 mang đột biến gây bệnh trên gen *CDHI* đã biểu hiện bệnh UTDD lan tỏa di truyền với các triệu chứng lâm sàng rầm rộ, tử vong sau 2 tháng phát hiện ra bệnh, tuy nhiên bệnh nhân cũng có tiền sử mắc bệnh lý về dạ dày trước đó. Mẹ đẻ của bệnh nhân 74 tuổi và chị gái 37 tuổi tại thời điểm nghiên cứu chưa phát hiện bệnh lý UTDD. Kluijt và cộng sự (2012) đã theo dõi 10 gia đình UTDD lan tỏa di truyền có đột biến gen *CDHI*, trong đó 5 gia đình có các thành viên khởi phát UTDD sớm có mang đột biến gen nhưng bố hoặc mẹ của các đối tượng này mang đột biến di truyền cho con cái thì không khởi phát bệnh hoặc chết nhưng không phải do bệnh lý UTDD [167]. Điều này có thể giải thích do sự giảm tính thấm của gen ở từng cá nhân, do đó không phải ai mang đột biến gen cũng biểu hiện ra bệnh. Đối với các thành viên mang đột biến gây bệnh c.1937-13T>C trong gia đình B732 cần phải có một chiến lược quản lý về



lâm sàng chặt chẽ, vì nguy cơ bị UTDD lan tỏa lên đến 70% ở nữ và nguy cơ bị ung thư vú thùy là 68% ở độ tuổi 80 [14] . Do đó, cần tiến hành nội soi dạ dày cũng như kiểm tra vú định kỳ ở các thành viên nữ, riêng người cháu đặt ra vấn đề quản lý bệnh khi tuổi từ 18 trở lên vì tỷ lệ mắc bệnh < 18 tuổi rất hiếm chỉ dưới 1% [14] . Tuy nhiên, chiến lược điều trị cũng như phòng bệnh lâu dài ở các thành viên mang đột biến trong gia đình bệnh nhân B732 này là cân nhắc nên phẫu thuật cắt dạ dày dự phòng.

### **Phả hệ gia đình bệnh nhân B151**

Bệnh nhân B151 mang đột biến sai nghĩa c.1990A>C (p.K664Q), đột biến này làm thay đổi acid amin từ lysine (K) thành glutamin (Q) ở vị trí 664 nằm trên vùng mã hóa exon 13, đây là đột biến dị hợp tử. Gia đình bệnh nhân B151 có 10 thành viên tham gia vào nghiên cứu, tại thời điểm nghiên cứu các thành viên trong gia đình chưa có ai phát hiện bệnh lý UTDD. Tiền sử gia đình có bố đẻ chết vì UTDD ở tuổi 63.

Tiến hành phân tích gen *CDHI* tại vị trí đột biến nằm trên exon 13 của 10 thành viên gia đình thì có 7/10 người mang đột biến giống với bệnh nhân, gồm 1 anh trai, 1 em gái, 2 người em họ, 2 người cháu và một người con trai. Mẹ đẻ của bệnh nhân không mang đột biến, bố đẻ chết vì UTDD nên không tiến hành phân tích gen, có 2 người em họ con của cô ruột mang đột biến, có anh trai và 2 người con của anh trai cũng mang đột biến, có thể thấy đột biến trong gia đình bệnh nhân B151 được di truyền từ người bố đã chết vì UTDD. Kết quả dự đoán theo phân tích Polyphen 2 và thuật toán SIFT đều cho thấy khả năng gây bệnh của đột biến này ở mức độ thấp, nhưng phần mềm dự đoán Mutation Taster là có khả năng gây bệnh và đột biến c.1990A>C được phát hiện ở bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền có bố đẻ bị UTDD. Ngoài ra đột biến cũng được phát hiện ở 7/10 thành viên gia đình tham gia nghiên cứu, nhưng hiện tại chưa có ai biểu hiện bệnh. Có thể, do độ tuổi của đối tượng mang đột biến trong gia đình trung bình là 30,4 tuổi, người trẻ nhất mang đột

biến là 14 tuổi và lớn nhất là 44 tuổi, trong khi đó tuổi trung bình biểu hiện bệnh ở những người mang đột biến gen *CDHI* là 38 tuổi (từ 14 – 69 tuổi) và tuổi khởi phát bệnh có thể thay đổi giữa các thành viên trong gia đình [9] . Tuy nhiên, để khẳng định khả năng gây bệnh của đột biến sai nghĩa ngoài việc phân tích phả hệ gia đình, các phần mềm tin sinh học thì phân tích khả năng gây bệnh của đột biến này cần thiết phải đánh giá lại ở các nghiên cứu sâu trong phân tích *in vitro*.

Đối với các thành viên mang đột biến trong gia đình bệnh nhân B151 cần phải có chiến lược về tư vấn di truyền và quản lý lâm sàng. Lời khuyên dành cho những người mang đột biến sai nghĩa khi mà khả năng gây bệnh của đột biến chưa rõ ràng, cũng như ở những thành viên mang đột biến có độ tuổi dưới 18 tuổi thì việc giám sát bằng nội soi dạ dày là vô cùng cần thiết. Nội soi trong UTDD lan tỏa di truyền được khuyến nghị thực hiện như mô tả trong tiêu chuẩn nội soi của Cambridge [59] . Ngoài ra, nguy cơ ung thư biểu mô tiêu thụ vú có thể xảy ra với những thành viên nữ mang đột biến gen *CDHI* do đó việc giám sát bằng chụp X- quang vú, khám lâm sàng vú hàng năm kết hợp chụp cộng hưởng từ 2 bên định kỳ là rất cần thiết [7] .

### **Phả hệ gia đình bệnh nhân B532**

Bệnh nhân nam 27 tuổi mã số B532 mang đột biến dị hợp tử c.1298A>G, làm thay đổi acid amin từ aspartic thành glycine tại vị trí 433 (D433G) nằm trên vùng mã hóa của exon 9. Gia đình bệnh nhân có 11 thành viên tham gia vào nghiên cứu, tại thời điểm nghiên cứu chưa có ai phát hiện bệnh lý UTDD, tiền sử gia đình không có ai mắc UTDD.

Phân tích gen *CDHI* các thành viên gia đình tại vị trí đột biến tương tự bệnh nhân ở exon 9 thì thấy có 3/11 người mang đột biến dị hợp tử giống bệnh nhân gồm bố đẻ, một người chị gái và một cô cháu gái là con của người chị mang đột biến. Mẹ đẻ của bệnh nhân đã chết vì bệnh lý tim mạch, một người chị gái chết vì tai biến mạch não. Như vậy người bố mang đột biến gen

đã di truyền cho 1 người con gái và một người con trai, trong đó người con gái lại di truyền đột biến cho con gái của mình. Đột biến dị hợp trong gia đình bệnh nhân B532 di truyền từ thế hệ trước cho thế hệ sau theo quy luật di truyền của gen *CDHI* trên bệnh lý UTDD lan tỏa là di truyền gen trội trên NST thường, do đó khi bố hoặc mẹ mang đột biến thì con cái của họ có nguy cơ 50% bị bệnh và 50% không bị bệnh theo quy luật di truyền của Mendel. Khi phân tích đột biến sai nghĩa này bằng công cụ Polyphen 2 và thuật toán SIFT thì đều cho thấy đột biến này có khả năng gây bệnh. Đột biến khởi phát ở bệnh nhân với tuổi phát hiện bệnh tương đối trẻ, nhưng bố đẻ của bệnh nhân ở tuổi 71 mang đột biến gen chưa thấy biểu hiện bệnh, có thể do giảm tính thấm của gen ở từng cá thể mang đột biến. Mặc dù nguy cơ mắc UTDD lan tỏa di truyền cao hơn ở những người mang đột biến gen *CDHI* nhưng không phải ai mang đột biến cũng sẽ tiến triển bệnh. Điều thú vị chưa hiểu rõ được là những gia đình bị UTDD lan tỏa có đột biến sai nghĩa thường biểu thị tính thấm của gen thấp [168] . Tuổi khởi phát bệnh trung bình ở người mang đột biến gen *CDHI* là 38 tuổi do đó có thể lý giải hai thành viên gia đình còn lại mang đột biến là ở tuổi 37 và 12 tuổi chưa biểu hiện bệnh.

Khả năng gây bệnh của đột biến sai nghĩa c.1298A>G (D433G) mới dừng lại ở dự đoán kết quả qua phân tích *in silico*, lập phả hệ và làm xét nghiệm di truyền đột biến gen thành viên trong gia đình. Để khẳng định khả năng gây bệnh của đột biến cần phải có những nghiên cứu sâu hơn trong phân tích *in vitro*. Do đó chiến lược về tư vấn di truyền và giám sát lâm sàng những thành viên mang đột biến sai nghĩa của gia đình B532 là ưu tiên giám sát bằng nội soi theo tiêu chuẩn Cambridge, với thành viên nữ mang đột biến cũng giám sát bằng chụp X- quang vú, khám lâm sàng vú hàng năm kết hợp chụp cộng hưởng từ 2 bên định kỳ [7] .

Qua việc phân tích 4 phủ hệ và xác định đột biến gen ở các thành viên trong gia đình, cho thấy rằng tư vấn di truyền là một hoạt động rất cần thiết trong việc đánh giá và quản lý bệnh UTDD lan tỏa di truyền. Ngày nay, trong bối cảnh bệnh lý ung thư trên toàn thế giới thì vấn đề quản lý hay công tác phòng bệnh ung thư đã có những thay đổi sâu sắc. Một trong những cách tiếp cận hiện đại là đánh giá rủi ro, tư vấn bệnh lý thường được tiến hành trước khi bắt đầu điều trị hoặc phòng ngừa, đặc biệt trong bệnh lý có liên quan đến di truyền, nó không chỉ có ý nghĩa đối với bệnh nhân mà còn có ý nghĩa đối với các thành viên gia đình. Tư vấn di truyền trong bệnh UTDD lan tỏa có thể giúp xác định khả năng một cá nhân tiến triển thành UTDD, nhưng để làm được điều này thì cần phải thu thập rất nhiều thông tin về tiền sử cá nhân, tiền sử gia đình, các yếu tố rủi ro ngoài môi trường (lối sống, môi trường ô nhiễm, bệnh lý, tiếp xúc với các chất gây ung thư tiềm ẩn...). Xét nghiệm di truyền cũng là một trong những công cụ được sử dụng để đánh giá mức độ rủi ro và nên được bắt đầu từ người được chẩn đoán mắc UTDD lan tỏa di truyền. Tiêu chí cho xét nghiệm di truyền trong bệnh UTDD lan tỏa di truyền do đột biến gen *CDHI* đã được Hiệp hội liên kết ung thư dạ dày thế giới lần đầu tiên xây dựng vào năm 1999, sau đó được sửa đổi và đồng thuận năm 2015 [14].

Đối với những đột biến chưa được chứng minh khả năng gây bệnh, đa số là những đột biến sai nghĩa thì ở những thành viên gia đình mang đột biến này, giám sát bằng nội soi dạ dày là biện pháp thích hợp nhất. Tuy nhiên, những tổn thương trong UTDD lan tỏa khó phát hiện ở giai đoạn sớm do tổn thương rời rạc, phát triển lớp dưới niêm mạc, không hình thành nên khối u. Vì vậy nội soi dạ dày cần đưa vào để theo dõi, sàng lọc và được tiến hành theo tiêu chuẩn nội soi của Cambridge [59]. Theo tiêu chuẩn Cambridge, nội soi được thực hiện bằng máy nội soi có độ nét cao, sử dụng ánh sáng trắng, thời gian nội soi tối thiểu là 30 phút, với 30 mảnh sinh thiết ngẫu nhiên ở 6 vị trí

của dạ dày gồm: phình vị, tâm vị, thân vị, vùng chuyển tiếp giữa hang vị và thân vị, hang vị và bờ cong nhỏ, tiền môn vị ( mỗi vị trí sinh thiết 5 mảnh) [59] . Cần đặc biệt chú ý đến vùng niêm mạc nhạt màu, vùng nghi ngờ tổn thương vì có nhiều khả năng chứa các ổ nhỏ ung thư biểu mô tế bào nhẵn [169] . Việc sàng lọc sớm nên được thực hiện từ 5 – 10 năm trước tuổi chẩn đoán sớm nhất của người mắc bệnh trong gia đình. Trong một nghiên cứu của Mi và cộng sự (2018), giám sát nội soi được thực hiện ở 2 nhóm là nhóm có đột biến gây bệnh trên gen *CDH1* và nhóm nằm trong gia đình UTDD lan tỏa di truyền nhưng không có đột biến gen, cho thấy kết quả qua nội soi phát hiện được ung thư biểu mô tế bào nhẵn ở nhóm có đột biến là 63,6% và nhóm không có đột biến là 9,7%, điều đó cho thấy được tầm quan trọng của nội soi dạ dày trong giám sát bệnh UTDD lan tỏa di truyền [124] .

Đối với những người mang đột biến gây bệnh trên gen *CDH1* đã được chứng minh thì cắt dạ dày dự phòng là biện pháp duy nhất để loại bỏ nguy cơ tiến triển thành UTDD [170] . Tiên lượng bệnh ở những bệnh nhân được cắt dạ dày dự phòng là tương đối tốt. Tỷ lệ tử vong tổng thể ước tính là 2 – 4% so với nguy cơ mắc bệnh lâu dài lên đến 80% [59] ,[171] . Thời gian tối ưu thực hiện cắt dạ dày dự phòng vẫn còn là điều tranh cãi. Blair và cộng sự cho rằng những người mang đột biến gen gây bệnh, nội soi với sinh thiết dạ dày bình thường nên xem xét việc cắt dạ dày dự phòng khi qua tuổi 20, vì nguy cơ mắc bệnh < 1% ở những bệnh nhân < 20 tuổi, tác giả cũng khuyến cáo xét nghiệm di truyền và nội soi giám sát cũng nên được thực hiện ở tuổi 16, với vị trí đột biến gen đã được xác định của người bị UTDD lan tỏa mang đột biến gen trong gia đình [172] . Có nhiều nghiên cứu trên thế giới cho thấy vai trò của cắt dạ dày dự phòng ở những thành viên gia đình mang đột biến gây bệnh mà chưa biểu hiện bệnh. Lynch và cộng sự, khi nghiên cứu trong 4 gia đình UTDD lan tỏa di truyền có dương tính với đột biến gen *CDH1*, gia đình thứ nhất đột biến c.1003 C>T được tìm thấy trong 11 thành viên gia đình, cả 11

thành viên đều đồng ý cắt dạ dày dự phòng, tất cả các sàng lọc trước mổ đều không phát hiện bệnh lý UTDD, tuy nhiên 10 người trong số đó đã phát hiện ung thư biểu mô tế bào nhẵn ở mẫu dạ dày sau khi cắt. Các gia đình khác trong nghiên cứu đều có thành viên mang đột biến phát hiện UTDD lan tỏa chỉ sau khi thực hiện cắt dạ dày toàn bộ, với việc phát hiện ra các ổ tổn thương nhỏ nằm rải rác lớp dưới niêm mạc dạ dày [173]. Quyết định cắt dạ dày toàn bộ khi chưa có biểu hiện bệnh lý là một việc rất khó khăn, ảnh hưởng đến tâm lý, cuộc sống, sức khỏe và công việc của người bệnh. Việc hỗ trợ về tâm lý người bệnh, và tư vấn về rủi ro, tiên lượng trong UTDD lan tỏa là điều quan trọng để đưa ra quyết định điều trị dự phòng. Ở Việt Nam, vấn đề này gặp rất nhiều khó khăn vì chưa có một nghiên cứu nào được thực hiện trên đối tượng bệnh nhân này, cũng như có những trở ngại trong vấn đề y đức.

#### **4.3.2. Đặc điểm các thành viên gia đình mang đột biến gen *CDH1***

Trong các gia đình đáp ứng tiêu chí về lâm sàng của bệnh UTDD lan tỏa di truyền, nam giới mang đột biến gây bệnh trên gen *CDH1* có nguy cơ mắc UTDD lan tỏa ước tính 67 – 70%, trong khi ở phụ nữ nguy cơ mắc bệnh ước tính 56 – 83 % ở độ tuổi 80. Nguy cơ tích lũy mắc ung thư vú thùy ở độ tuổi 80 của nữ là 39 – 52% [14]. Tỷ lệ thâm nhập cao này làm nổi bật tầm quan trọng của việc xác định đột biến gen *CDH1* ở các thành viên trong gia đình UTDD lan tỏa di truyền. Quan trọng hơn, chẩn đoán sớm UTDD lan tỏa dựa vào các tiêu chí về lâm sàng cũng như các xét nghiệm di truyền có thể giúp cải thiện tiên lượng và tỷ lệ sống lâu hơn cho những người mang đột biến gen *CDH1*.

Nghiên cứu của chúng tôi đã lấy được 36 mẫu các thành viên và lập phả hệ của 4 gia đình bệnh nhân mang đột biến gen *CDH1* (tổng số thành viên trong 4 phả hệ tính cả đương sự là 40 người). Trong 4 phả hệ của gia đình UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến gen *CDH1*, độ tuổi trung bình mang đột biến thấp nhất ở gia đình bệnh nhân B151 là 30,4 tuổi, gia đình B4 có tuổi trung bình cao nhất là 50,6 tuổi. Thành viên mang đột biến gen cao tuổi nhất là 74 tuổi

và nhỏ tuổi nhất là 10 tuổi đều ở gia đình B732. Độ tuổi trong các gia đình tham gia nghiên cứu khác nhau, một phần do số lượng thành viên tham gia nghiên cứu và một phần phụ thuộc vào tuổi phát hiện bệnh của đương sự trong phả hệ. Tuổi trung bình của các thành viên mang đột biến sai nghĩa với khả năng gây bệnh chưa rõ ràng ở gia đình B151 và B532 đều < 40 tuổi, nhưng các thành viên mang đột biến gây bệnh ở gia đình B4 và B732 có tuổi trung bình cao hơn lần lượt là 50,6 tuổi và 38,7 tuổi, trong khi đó theo các nghiên cứu tổng hợp trên thế giới cho thấy tuổi trung bình khởi phát bệnh UTDD ở người mang đột biến gây bệnh là 38 tuổi [9]. Điều đó cho thấy có thể do sự giảm tính thấm của gen *CDHI* nên không phải ai mang đột biến cũng tiến triển thành UTDD.

Trong bệnh lý di truyền theo quy luật di truyền gen trội trên NST thường thì khả năng mang đột biến ở nam và nữ là như nhau. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ thành viên nữ trong 4 gia đình mang đột biến là 42,1% gần tương đương so với nam, do đối tượng nam và nữ trong nghiên cứu không đồng đều nam là 21 thành viên, nữ là 19 thành viên, ngoài ra chúng tôi cũng không lấy hết được đầy đủ các thành viên trong 4 gia đình, nên tỷ lệ nam/nữ mang đột biến trong nghiên cứu không phản ánh chính xác tình trạng mang đột biến gen theo giới. Đa số các nghiên cứu về UTDD lan tỏa di truyền có đột biến gây bệnh đều có tiền sử gia đình mắc UTDD, hoặc gia đình có tiền sử ung thư vú thùy, tuy nhiên vẫn có số ít những bệnh nhân UTDD lan tỏa mang đột biến gây bệnh mà không có tiền sử gia đình nhưng tuổi mắc bệnh dưới 40 tuổi [6], [174]. Bốn bệnh nhân mang đột biến trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ có 1 bệnh nhân là có tiền sử gia đình có người mắc UTDD, còn lại 3 bệnh nhân không có tiền sử gia đình bị UTDD và khởi phát bệnh khi tuổi còn rất trẻ.

Đột biến gen *CDHI* ở các thành viên tham gia nghiên cứu trong 4 gia đình đều là những đột biến di truyền từ thế hệ trước cho thế hệ sau, tỷ lệ mang đột biến gen ở họ hàng bậc 1 khá cao từ 50 – 100% và giảm dần ở họ hàng

bậc 2 và bậc 3. Tỷ lệ mang đột biến gen trong 4 gia đình không đều nhau, trong đó gia đình B732 và B151 tỷ lệ là 80%, phù hợp với đặc điểm của di truyền gen trội trên NST thường, là tỷ lệ cá thể mang đột biến gen trong phả hệ thường từ 50% trở lên và nếu bố hoặc mẹ mang đột biến gen, thì con cái của họ có nguy cơ 50% mang đột biến 50% bình thường. Tuy nhiên tỷ lệ mang đột biến gen ở gia đình B4 là 27%, gia đình B532 là 33% thấp hơn so với tỷ lệ mang đột biến trong di truyền gen trội trên NST thường, vì nhiều lý do nên nghiên cứu không lấy được hết mẫu các thành viên trong gia đình để phân tích gen, do đó bỏ sót những người không tham gia nghiên cứu có thể mang gen đột biến. Có thể thấy rằng, hầu hết các nghiên cứu trên thế giới về UTDD lan tỏa di truyền đều không đưa ra tỷ lệ mang đột biến gen ở các gia đình, rào cản lớn nhất là sự khó khăn trong việc thu thập thông tin, bệnh phẩm cũng như sự đồng thuận tham gia nghiên cứu của các thành viên trong phả hệ gia đình. Vì vậy, nghiên cứu của chúng tôi đưa ra các tỷ lệ về đột biến gen trong gia đình hay qua các thế hệ bậc 1, 2, 3 để cho thấy khả năng mang đột biến gen do di truyền trên thực tế ở trong nghiên cứu này là từ 27 – 80%.

Tại thời điểm lấy mẫu phân tích gen *CDHI* các thành viên trong 4 gia đình đều chưa biểu hiện bệnh lý UTDD, sau khi có kết quả phân tích gen *CDHI* thì những thành viên mang đột biến gen được kiểm tra bằng nội soi dạ dày để đánh giá tình trạng bệnh. Chúng tôi tiến hành nội soi dạ dày và sinh thiết làm mô bệnh học các thành viên mang đột biến ở 3 gia đình. Có 8/15 thành viên mang đột biến, 4 thành viên có biểu hiện dị sản và loạn sản mức độ thấp, hầu hết các thành viên đều có test *H.Pylori* dương tính và chưa ai phát hiện mắc UTDD tại thời điểm hiện tại. Như chúng ta đã biết, con đường gây ung thư dạ dày được cho là có liên quan chặt chẽ với các yếu tố môi trường (bao gồm nhiễm *H.Pylori*, chế độ ăn uống, lối sống...). Từ nhiễm *H.Pylori* gây viêm dạ dày mạn tính, sau đó gây viêm teo, dị sản ruột, loạn sản và cuối cùng dẫn đến



UTDD [175] . Vì vậy, 4 thành viên gia đình mang đột biến gen *CDHI* trong nghiên cứu có biểu hiện mô bệnh học là dị sản và loạn sản độ thấp cùng với tình trạng nhiễm *H.Pylori*, có nguy cơ cao tiến triển thành UTDD nói chung. Trong đặc điểm mô bệnh học của UTDD thể lan tỏa là các tổn thương phát triển từ những tế bào đơn lẻ hoặc tập trung thành đám nhỏ phát triển ở lớp dưới niêm mạc dạ dày. Do đó, việc giám sát bằng nội soi dạ dày nhằm phát hiện sớm tổn thương ác tính thì ngoài việc lấy mẫu sinh thiết ở vùng tổn thương quan sát được bằng nội soi, thì việc lấy mẫu ngẫu nhiên ở 6 vùng của dạ dày theo tiêu chuẩn nội soi Cambridge sẽ làm tăng khả năng phát hiện được các tế bào ung thư nằm tiềm ẩn trong dạ dày [59] . Tuy nhiên, vai trò trong phát hiện ung thư dạ dày lan tỏa sớm của nội soi ở những đối tượng mang đột biến mà chưa có biểu hiện bệnh là khác nhau. Trong nghiên cứu của Norton (2007), trong một gia đình có 6 người mang đột biến gây bệnh ở gen *CDHI* tham gia cắt dạ dày dự phòng, trước khi phẫu thuật tất cả đều trải qua một quá trình sàng lọc đánh giá bằng nội soi dạ dày với độ phóng đại cao, nhiều mảnh sinh thiết dạ dày được lấy ngẫu nhiên từ nhiều vị trí, nhưng đều không cho thấy bằng chứng nào về UTDD. Nhưng khi thực hiện cắt dạ dày dự phòng ở 6 người này, kết quả đã phát hiện ung thư biểu mô tế bào nhẵn trong mẫu dạ dày sau phẫu thuật của cả 6 người [106] . Trong một nghiên cứu về giá trị của nội soi trong theo dõi UTDD ở các thành viên gia đình UTDD lan tỏa di truyền, Lim và cộng sự đã theo dõi 29 bệnh nhân trải qua nhiều lần nội soi dạ dày, kết quả cho thấy ung thư biểu mô tế bào nhẵn được xác định ở 14/22 bệnh nhân (63,6%) có đột biến gen và 2/7 (28%) bệnh nhân không mang đột biến gen [176] . Xác suất phát hiện ung thư ở bệnh nhân mang đột biến gây bệnh qua giám sát bằng nội soi tăng lên khi tuân thủ đúng tiêu chuẩn nội soi dạ dày trong UTDD lan tỏa với thời gian theo dõi hợp lý. Các thành viên gia đình trong nghiên cứu của chúng tôi mới được thực hiện nội soi dạ dày 1 lần, do đó cần có chiến lược

theo dõi bằng nội soi cho các thành viên này trong một thời gian dài, đặc biệt ở những bệnh nhân có kết quả mô bệnh học là có biểu hiện loạn sản. Với thành viên gia đình mang đột biến gây bệnh đã được chứng minh thì nên xem xét việc cắt dạ dày dự phòng.

Qua phân tích về một số đặc điểm lâm sàng của 4 phả hệ trên đã cho thấy có một vài thách thức đặt ra khi tư vấn và quản lý lâm sàng cho các thành viên gia đình mang đột biến gen đó là: tuổi khởi phát bệnh trong các gia đình UTDD lan tỏa di truyền có đột biến có thể rất khác nhau giữa các gia đình, thậm chí là giữa các thành viên trong gia đình. Sự khác nhau về tuổi khởi phát đã đặt ra một thách thức lớn đối với các nhà di truyền học lâm sàng, khi thảo luận về việc làm xét nghiệm di truyền cho các thành viên gia đình ở độ tuổi thiếu niên, cũng như thách thức đối với các nhà lâm sàng chuyên ngành tiêu hóa, ung bướu, ngoại khoa khi thực hiện tư vấn về các biện pháp phòng bệnh cho bệnh nhân. Tuy nhiên, ngày nay với những hiểu biết sâu hơn về cơ chế bệnh sinh trong UTDD lan tỏa di truyền đã giúp các nhà di truyền, nhà lâm sàng chủ động hơn trong các chương trình sàng lọc và dự phòng, đặc biệt là trong việc xác định thời điểm để cắt dạ dày dự phòng.

## KẾT LUẬN

### 1. Đột biến gen *CDH1* và một số đặc điểm trên bệnh nhân ung thư dạ dày lan tỏa di truyền.

- Đã phát hiện được 4/45 bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến gen *CDH1*. Trong đó có 3 đột biến chưa từng được công bố gồm: 1 đột biến vô nghĩa c.639G>A (p.W213\*), 2 đột biến sai nghĩa c.1990A>C (p.K664Q) và c.1298A>G (D433G). 1 đột biến tại vị trí nối c.1937-13T>C đã được công bố là đột biến gây bệnh.

- 11 SNP của gen *CDH1* được phát hiện trong nghiên cứu, có 9 SNP đã được công bố, 2 SNP chưa được công bố là c.1712-54dupT và c.1008+131delGinsATC

- Một số đặc điểm lâm sàng nổi bật: tuổi mắc bệnh trẻ  $\leq 40$  tuổi chiếm 88,9%. Tỷ lệ mắc bệnh ở nam và nữ là 1:1. Tuổi mắc bệnh trung bình ở nữ ( $32,86 \pm 5,52$ ) thấp hơn nam ( $36,74 \pm 6,58$ ) một cách có ý nghĩa.

- 2 bệnh nhân mang đột biến gây bệnh c.639G>A (p.W213\*) và c.1937-13T>C đều có tuổi khởi phát bệnh sớm, biểu hiện lâm sàng nặng nề, hóa mô miễn dịch có giảm biểu hiện protein E-cadherin, bệnh nhân tử vong nhanh sau khi phát hiện bệnh. Hai bệnh nhân mang đột biến sai nghĩa 1990A>C (p.K664Q) và c.1298A>G (D433G) với chức năng gây bệnh chưa rõ, biểu hiện lâm sàng không đặc hiệu, kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch giảm nhẹ hoặc biểu hiện bình thường, tiên lượng bệnh tốt và thời gian sống lâu hơn.

### 2. Đột biến gen *CDH1* ở các thành viên trong gia đình bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến gen *CDH1*.

- Bệnh nhân UTDD lan tỏa di truyền mang đột biến gen *CDH1* trong nghiên cứu đều được di truyền từ thế hệ trước sang thế hệ sau. Đột biến gen

*CDHI* xuất hiện ở các thành viên trong phả hệ tuân theo quy luật di truyền gen trội trên NST thường, với sự xuất hiện từ 2 đến 7 thành viên trong các gia đình mang đột biến giống với bệnh nhân.

- Kết quả nội soi và mô bệnh học ở 1 số thành viên gia đình mang đột biến gen *CDHI* có biểu hiện dị sản và loạn sản ở niêm mạc dạ dày.

## KIẾN NGHỊ

1. Cần làm thêm các nghiên cứu để phát hiện một số đột biến gen khác liên quan đến UTDD lan tỏa di truyền ở nhóm bệnh nhân không mang đột biến gen *CDH1*.
2. Cần làm thêm những nghiên cứu sâu hơn trong *in vitro* để chứng minh khả năng gây bệnh của một số đột biến mới.
3. Có chiến lược tư vấn di truyền, quản lý, theo dõi và điều trị dự phòng cho những thành viên mang đột biến gen *CDH1*, cũng như những người không mang đột biến trong gia đình có UTDD lan tỏa di truyền.

## **DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Nguyễn Thị Thanh Hương**, Vũ Đức Anh, Đặng Thị Ngọc Dung, Trần Mạnh Bắc, Tạ Thành Văn (2019), Xác định đột biến gen *CDH1* trên bệnh nhân ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, *Tạp chí Y học Việt Nam*, Tháng 9/2019 – Số chuyên đề (Tập 482), 48 – 53.
2. **Nguyễn Thị Thanh Hương**, Nguyễn Thị Phong Lan, Trần Mạnh Bắc, Đặng Thị Ngọc Dung (2020), Đột biến gen *CDH1* trong gia đình bệnh nhân ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, *Tạp chí Y học Việt Nam*, Số 1 &2 (Tập 486), 159 – 163.
3. **Nguyễn Thị Thanh Hương**, Vũ Xuân Vinh và Đặng Thị Ngọc Dung (2020), Phát hiện một đột biến mới của gen *CDH1* trong gia đình bệnh nhân ung thư dạ dày lan tỏa di truyền, *Tạp chí nghiên cứu y học*, Số 125, tập 1, 8-14

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram và cộng sự (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68 (6), 394-424.
2. G. Corso, D. Marrelli và F. Roviello (2012). Familial gastric cancer and germline mutations of E-cadherin. *Ann Ital Chir*, 83 (3), 177-182.
3. J. Stiekema, A. Cats, A. Kuijpers và cộng sự (2013). Surgical treatment results of intestinal and diffuse type gastric cancer. Implications for a differentiated therapeutic approach? *Eur J Surg Oncol*, 39 (7), 686-693.
4. M. Takeichi (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem*, 59, 237-252.
5. W. Birchmeier và J. Behrens (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*, 1198 (1), 11-26.
6. P. Kaurah, A. MacMillan, N. Boyd và cộng sự (2007). Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA*, 297 (21), 2360-2372.
7. R. S. van der Post, I. P. Vogelaar, F. Carneiro và cộng sự (2015). Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet*, 52 (6), 361-374.
8. D. J. Kunz K.R., Appelman H.D. (1994). The identification of a novel familial gastric cancer syndrome. *Gastroenterology*, (106), A406.

9. P. Guilford, J. Hopkins, J. Harraway và cộng sự (1998). E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 392 (6674), 402-405.
10. F. M. Richards, S. A. McKee, M. H. Rajpar và cộng sự (1999). Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet*, 8 (4), 607-610.
11. C. Oliveira, G. Suriano, P. Ferreira và cộng sự (2004). Genetic screening for familial gastric cancer. *Hered Cancer Clin Pract*, 2 (2), 51-64.
12. C. Oliveira, R. Seruca và F. Carneiro (2006). Genetics, pathology, and clinics of familial gastric cancer. *Int J Surg Pathol*, 14 (1), 21-33.
13. P. Kaurah, A. MacMillan, N. Boyd và cộng sự (2007). Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA*, 297 (21), 2360-2372.
14. S. Hansford, P. Kaurah, H. Li-Chang và cộng sự (2015). Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncol*, 1 (1), 23-32.
15. C. Oliveira, R. Seruca và F. Carneiro (2009). Hereditary gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 23 (2), 147-157.
16. Y. Nishino, M. Inoue, I. Tsuji và cộng sự (2006). Tobacco smoking and gastric cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Jpn J Clin Oncol*, 36 (12), 800-807.
17. C. A. Gonzalez, G. Pera, A. Agudo và cộng sự (2003). Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*, 107 (4), 629-634.



18. R. Ladeiras-Lopes, A. K. Pereira, A. Nogueira và cộng sự (2008). Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control*, 19 (7), 689-701.
19. H. Wang, L. Ma, Y. Li và cộng sự (2000). Exposure to cigarette smoke increases apoptosis in the rat gastric mucosa through a reactive oxygen species-mediated and p53-independent pathway. *Free Radic Biol Med*, 28 (7), 1125-1131.
20. R. W. Kneller, W. C. You, Y. S. Chang và cộng sự (1992). Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesions. *J Natl Cancer Inst*, 84 (16), 1261-1266.
21. S. Sasazuki, S. Sasaki, S. Tsugane và cộng sự (2002). Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. *Int J Cancer*, 101 (6), 560-566.
22. E. J. Duell, N. Travier, L. Lujan-Barroso và cộng sự (2011). Alcohol consumption and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Am J Clin Nutr*, 94 (5), 1266-1275.
23. L. E. Hansson, J. Baron, O. Nyren và cộng sự (1994). Tobacco, alcohol and the risk of gastric cancer. A population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer*, 57 (1), 26-31.
24. R. Everatt, A. Tamosiunas, I. Kuzmickiene và cộng sự (2012). Alcohol consumption and risk of gastric cancer: a cohort study of men in Kaunas, Lithuania, with up to 30 years follow-up. *BMC Cancer*, 12, 475.
25. K. Sjødahl, Y. Lu, T. I. Nilsen và cộng sự (2007). Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer*, 120 (1), 128-132.

26. X. Q. Wang, P. D. Terry và H. Yan (2009). Review of salt consumption and stomach cancer risk: Epidemiological and biological evidence. *World J Gastroenterol*, 15 (18), 2204-2213.
27. S. Tsugane, M. Akabane, T. Inami và cộng sự (1991). Urinary salt excretion and stomach cancer mortality among four Japanese populations. *Cancer Causes Control*, 2 (3), 165-168.
28. Y. Tsubono, M. Kobayashi và S. Tsugane (1997). Food consumption and gastric cancer mortality in five regions of Japan. *Nutr Cancer*, 27 (1), 60-64.
29. S. A. Lee, D. Kang, K. N. Shim và cộng sự (2003). Effect of diet and Helicobacter pylori infection to the risk of early gastric cancer. *J Epidemiol*, 13 (3), 162-168.
30. M. Plummer, S. Franceschi, J. Vignat và cộng sự (2015). Global burden of gastric cancer attributable to Helicobacter pylori. *Int J Cancer*, 136 (2), 487-490.
31. W. K. Leung, Ng, E.K.W., Sung, J.J.Y. (2009). Tumors of the Stomach. *Textbook of gastroenterology*, 1026-1053.
32. C. Holcombe (1992). Helicobacter pylori: the African enigma. *Gut*, 33 (4), 429-431.
33. C. A. Gonzalez và L. Lopez-Carrillo (2010). Helicobacter pylori, nutrition and smoking interactions: their impact in gastric carcinogenesis. *Scand J Gastroenterol*, 45 (1), 6-14.
34. Z. M. Bamboat, L. H. Tang, E. Vinuela và cộng sự (2014). Stage-stratified prognosis of signet ring cell histology in patients undergoing curative resection for gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, 21 (5), 1678-1685.

35. D. E. Henson, C. Dittus, M. Younes và cộng sự (2004). Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. *Arch Pathol Lab Med*, 128 (7), 765-770.
36. I. J. Majewski, I. Kluijt, A. Cats và cộng sự (2013). An alpha-E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol*, 229 (4), 621-629.
37. I. J. Majewski, I. Kluijt, A. Cats và cộng sự (2013). An alpha-E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol*, 229 (4), 621-629.
38. D. Gaston, S. Hansford, C. Oliveira và cộng sự (2014). Germline mutations in MAP3K6 are associated with familial gastric cancer. *PLoS Genet*, 10 (10), e1004669.
39. W. M. Grady, J. Willis, P. J. Guilford và cộng sự (2000). Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet*, 26 (1), 16-17.
40. E. S. Lander (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 470 (7333), 187-197.
41. C. M. Chu, C. J. Chen, D. C. Chan và cộng sự (2014). CDH1 polymorphisms and haplotypes in sporadic diffuse and intestinal gastric cancer: a case-control study based on direct sequencing analysis. *World J Surg Oncol*, 12, 80.
42. B. Humar, F. Graziano, S. Cascinu và cộng sự (2002). Association of CDH1 haplotypes with susceptibility to sporadic diffuse gastric cancer. *Oncogene*, 21 (53), 8192-8195.
43. S. Bevan và R. S. Houlston (1999). Genetic predisposition to gastric cancer. *QJM*, 92 (1), 5-10.

44. M. Yaghoobi, R. Bijarchi và S. A. Narod (2010). Family history and the risk of gastric cancer. *Br J Cancer*, 102 (2), 237-242.
45. Y. Mao, W. Yang, Q. Qi và cộng sự (2019). Blood groups A and AB are associated with increased gastric cancer risk: evidence from a large genetic study and systematic review. *BMC Cancer*, 19 (1), 164.
46. Z. Wang, L. Liu, J. Ji và cộng sự (2012). ABO blood group system and gastric cancer: a case-control study and meta-analysis. *Int J Mol Sci*, 13 (10), 13308-13321.
47. J. A. Roberts (1957). Blood groups and susceptibility to disease: a review. *Br J Prev Soc Med*, 11 (3), 107-125.
48. L. C. Hoskins, H. A. Loux, A. Britten và cộng sự (1965). Distribution of ABO blood groups in patients with pernicious anemia, gastric carcinoma and gastric carcinoma associated with pernicious anemia. *N Engl J Med*, 273 (12), 633-637.
49. M. L. Sievers (1959). Hereditary aspects of gastric secretory function; race and ABO blood groups in relationship to acid and pepsin production. *Am J Med*, 27, 246-255.
50. E. E. Calle, C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond và cộng sự (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, 348 (17), 1625-1638.
51. J. Lagergren, R. Bergstrom và O. Nyren (1999). Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med*, 130 (11), 883-890.
52. P. D. H. v. N. A. Tuấn (2001). Tình hình phẫu thuật điều trị ung thư dạ dày tại bệnh viện 108 từ 1994-2000. *Tài liệu hội thảo lần thứ 2-Trung tâm hợp tác nghiên cứu của Tổ chức Y tế Thế giới về ung thư dạ dày. Bộ Y tế-Tổ chức Y tế Thế giới*,

53. C. Deans, M. S. Yeo, M. Y. Soe và cộng sự (2011). Cancer of the gastric cardia is rising in incidence in an Asian population and is associated with adverse outcome. *World J Surg*, 35 (3), 617-624.
54. M. A. Kim, H. S. Lee, H. K. Yang và cộng sự (2005). Clinicopathologic and protein expression differences between cardia carcinoma and noncardia carcinoma of the stomach. *Cancer*, 103 (7), 1439-1446.
55. K. E. McColl (2006). Cancer of the gastric cardia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 20 (4), 687-696.
56. G. N. Stemmermann, Fenoglio-Preiser, C.M. (2008). Gastric Cancer: Pathology. *Principles and practice of gastrointestinal oncology*, 257-274.
57. N. Ahmed (2005). 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: is the debate over? *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 4, 17.
58. J. F. Flejou (2011). [WHO Classification of digestive tumors: the fourth edition]. *Ann Pathol*, 31 (5 Suppl), S27-31.
59. R. C. Fitzgerald, R. Hardwick, D. Huntsman và cộng sự (2010). Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet*, 47 (7), 436-444.
60. D. Lazar, S. Taban, C. Ardeleanu và cộng sự (2008). The immunohistochemical expression of E-cadherin in gastric cancer; correlations with clinicopathological factors and patients' survival. *Rom J Morphol Embryol*, 49 (4), 459-467.
61. M. López, C. Cervera-Acedo, P. Santibañez và cộng sự (2016). A novel mutation in the CDH1 gene in a Spanish family with hereditary diffuse gastric cancer. *SpringerPlus*, 5,

62. L. Caggiari, G. Miolo, V. Canzonieri và cộng sự (2018). A new mutation of the CDH1 gene in a patient with an aggressive signet-ring cell carcinoma of the stomach. *Cancer Biol Ther*, 19 (4), 254-259.
63. G. Corso, J. Carvalho, D. Marrelli và cộng sự (2013). Somatic mutations and deletions of the E-cadherin gene predict poor survival of patients with gastric cancer. *J Clin Oncol*, 31 (7), 868-875.
64. C. Caldas, F. Carneiro, H. T. Lynch và cộng sự (1999). Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet*, 36 (12), 873-880.
65. S. Kim, J. W. Chung, T. D. Jeong và cộng sự (2013). Searching for E-cadherin gene mutations in early onset diffuse gastric cancer and hereditary diffuse gastric cancer in Korean patients. *Fam Cancer*, 12 (3), 503-507.
66. M. Yamada, T. Fukagawa, T. Nakajima và cộng sự (2014). Hereditary diffuse gastric cancer in a Japanese family with a large deletion involving CDH1. *Gastric Cancer*, 17 (4), 750-756.
67. E. S. Amin MB, Greene FL, et al., (2017). American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer Staging Manual, 8th edn*, New York: Springer,
68. R. Miceli, G. Tomasello, G. Bregni và cộng sự (2014). Adjuvant chemotherapy for gastric cancer: current evidence and future challenges. *World J Gastroenterol*, 20 (16), 4516-4525.
69. A. B. Benson (2008). Advanced gastric cancer: an update and future directions. *Gastrointest Cancer Res*, 2 (4 Suppl), S47-53.
70. C. Li, S. J. Oh, S. Kim và cộng sự (2009). Macroscopic Borrmann type as a simple prognostic indicator in patients with advanced gastric cancer. *Oncology*, 77 (3-4), 197-204.

71. J. G. C. Association (2011). Japanese classification of gastric carcinoma. *Gastric Cancer*, 14, 101-112.
72. T. K. Ha, J. Y. An, H. K. Youn và cộng sự (2008). Indication for endoscopic mucosal resection in early signet ring cell gastric cancer. *Ann Surg Oncol*, 15 (2), 508-513.
73. K. J. Kwon, K. N. Shim, E. M. Song và cộng sự (2014). Clinicopathological characteristics and prognosis of signet ring cell carcinoma of the stomach. *Gastric Cancer*, 17 (1), 43-53.
74. C. G. Jiang, Z. N. Wang, Z. Sun và cộng sự (2011). Clinicopathologic characteristics and prognosis of signet ring cell carcinoma of the stomach: results from a Chinese mono-institutional study. *J Surg Oncol*, 103 (7), 700-703.
75. D. Y. Kim, Y. K. Park, J. K. Joo và cộng sự (2004). Clinicopathological characteristics of signet ring cell carcinoma of the stomach. *ANZ J Surg*, 74 (12), 1060-1064.
76. C. Gronnier, M. Messenger, W. B. Robb và cộng sự (2013). Is the negative prognostic impact of signet ring cell histology maintained in early gastric adenocarcinoma? *Surgery*, 154 (5), 1093-1099.
77. C. Li, S. Kim, J. F. Lai và cộng sự (2007). Advanced gastric carcinoma with signet ring cell histology. *Oncology*, 72 (1-2), 64-68.
78. C. Kunisaki, H. Shimada, M. Nomura và cộng sự (2004). Therapeutic strategy for signet ring cell carcinoma of the stomach. *Br J Surg*, 91 (10), 1319-1324.
79. G. Berx và F. van Roy (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1 (6), a003129.

80. M. Takeichi (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102 (4), 639-655.
81. G. B. Grunwald (1993). The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*, 5 (5), 797-805.
82. L. Shapiro và W. I. Weis (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1 (3), a003053.
83. N. Pecina-Slaus (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*, 3 (1), 17.
84. F. van Roy và G. Berx (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 65 (23), 3756-3788.
85. X. Liu và K. M. Chu (2014). E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications. *Biomed Res Int*, 2014, 637308.
86. J. Yang và R. A. Weinberg (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14 (6), 818-829.
87. P. Polakis (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14 (15), 1837-1851.
88. A. O. Chan (2006). E-cadherin in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 12 (2), 199-203.
89. E. Sahai và C. J. Marshall (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2 (2), 133-142.
90. G. Suriano, M. J. Oliveira, D. Huntsman và cộng sự (2003). 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*, 12 (22), 3007-3016.



91. Y. I. Petrova, L. Schecterson và B. M. Gumbiner (2016). Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Mol Biol Cell*, 27 (21), 3233-3244.
92. Y. I. Petrova, M. M. Spano và B. M. Gumbiner (2012). Conformational epitopes at cadherin calcium-binding sites and p120-catenin phosphorylation regulate cell adhesion. *Mol Biol Cell*, 23 (11), 2092-2108.
93. P. Guilford (1999). E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today*, 5 (4), 172-177.
94. A. Bremm, A. Walch, M. Fuchs và cộng sự (2008). Enhanced activation of epidermal growth factor receptor caused by tumor-derived E-cadherin mutations. *Cancer Res*, 68 (3), 707-714.
95. K. F. Becker, M. J. Atkinson, U. Reich và cộng sự (1994). E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res*, 54 (14), 3845-3852.
96. G. Suriano, C. Oliveira, P. Ferreira và cộng sự (2003). Identification of CDH1 germline missense mutations associated with functional inactivation of the E-cadherin protein in young gastric cancer probands. *Hum Mol Genet*, 12 (5), 575-582.
97. A. R. Brooks-Wilson, P. Kaurah, G. Suriano và cộng sự (2004). Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet*, 41 (7), 508-517.
98. H. More, B. Humar, W. Weber và cộng sự (2007). Identification of seven novel germline mutations in the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat*, 28 (2), 203.

99. A. A. Onitilo, G. Aryal và J. M. Engel (2013). Hereditary diffuse gastric cancer: a family diagnosis and treatment. *Clin Med Res*, 11 (1), 36-41.
100. P. Guilford, B. Humar và V. Blair (2010). Hereditary diffuse gastric cancer: translation of CDH1 germline mutations into clinical practice. *Gastric Cancer*, 13 (1), 1-10.
101. Y. S. Chun, N. M. Lindor, T. C. Smyrk và cộng sự (2001). Germline E-cadherin gene mutations: is prophylactic total gastrectomy indicated? *Cancer*, 92 (1), 181-187.
102. Z. Yelskaya, R. Bacares, E. Salo-Mullen và cộng sự (2016). CDH1 Missense Variant c.1679C>G (p.T560R) Completely Disrupts Normal Splicing through Creation of a Novel 5' Splice Site. *PLoS One*, 11 (11), e0165654.
103. V. Blair, I. Martin, D. Shaw và cộng sự (2006). Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis and management. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4 (3), 262-275.
104. C. Oliveira, H. Moreira, R. Seruca và cộng sự (2005). Role of pathology in the identification of hereditary diffuse gastric cancer: report of a Portuguese family. *Virchows Arch*, 446 (2), 181-184.
105. R. S. van der Post, I. P. Vogelaar, F. Carneiro và cộng sự (2015). Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet*, 52 (6), 361-374.
106. J. A. Norton, C. M. Ham, J. Van Dam và cộng sự (2007). CDH1 truncating mutations in the E-cadherin gene: an indication for total gastrectomy to treat hereditary diffuse gastric cancer. *Ann Surg*, 245 (6), 873-879.

107. M. A. Garcia-Gonzalez, A. Lanás, E. Quintero và cộng sự (2007). Gastric cancer susceptibility is not linked to pro-and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in whites: a Nationwide Multicenter Study in Spain. *Am J Gastroenterol*, 102 (9), 1878-1892.
108. H. D. Kaurah P (2002 Nov 4 [Updated 2018 Mar 22]). *Hereditary Diffuse Gastric Cancer*, Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018,
109. R. C. Fitzgerald và C. Caldas (2004). Clinical implications of E-cadherin associated hereditary diffuse gastric cancer. *Gut*, 53 (6), 775-778.
110. J. Simoes-Correia, J. Figueiredo, R. Lopes và cộng sự (2012). E-cadherin destabilization accounts for the pathogenicity of missense mutations in hereditary diffuse gastric cancer. *PLoS One*, 7 (3), e33783.
111. G. Suriano, S. Seixas, J. Rocha và cộng sự (2006). A model to infer the pathogenic significance of CDH1 germline missense variants. *J Mol Med (Berl)*, 84 (12), 1023-1031.
112. S. Richards, N. Aziz, S. Bale và cộng sự (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 17 (5), 405-424.
113. N. L. Sim, P. Kumar, J. Hu và cộng sự (2012). SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res*, 40 (Web Server issue), W452-457.
114. I. Adzhubei, D. M. Jordan và S. R. Sunyaev (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 7, Unit7 20.

115. J. M. Schwarz, C. Rodelsperger, M. Schuelke và cộng sự (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*, 7 (8), 575-576.
116. P. Lauren (1965). The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 64, 31-49.
117. WHO (2001). *AUDIT : the Alcohol Use Disorders Identification Test : guidelines for use in primary health care*, Geneva, Switzerland.
118. J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya và cộng sự (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.
119. Dieffenbach C.W., Lowe T.M. và D. G.S (1993). General Concepts for PCR Primer Design *Genome Research*, 3(3), S30-37.
120. D. R. Smith (2015). Buying in to bioinformatics: an introduction to commercial sequence analysis software. *Brief Bioinform*, 16 (4), 700-709.
121. Y. C. Liu, C. Y. Shen, H. S. Wu và cộng sự (2006). Mechanisms inactivating the gene for E-cadherin in sporadic gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*, 12 (14), 2168-2173.
122. F. Roviello, G. Corso, C. Pedrazzani và cộng sự (2007). Hereditary diffuse gastric cancer and E-cadherin: description of the first germline mutation in an Italian family. *Eur J Surg Oncol*, 33 (4), 448-451.
123. P. D. Pharoah, P. Guilford, C. Caldas và cộng sự (2001). Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*, 121 (6), 1348-1353.

124. E. Z. Mi, E. Z. Mi, M. di Pietro và cộng sự (2018). Comparative study of endoscopic surveillance in hereditary diffuse gastric cancer according to CDH1 mutation status. *Gastrointest Endosc*, 87 (2), 408-418.
125. P. Rawla và A. Barsouk (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol*, 14 (1), 26-38.
126. H. Zheng, H. Takahashi, Y. Murai và cộng sự (2007). Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray. *J Clin Pathol*, 60 (3), 273-277.
127. I. Tramacere, E. Negri, C. Pelucchi và cộng sự (2012). A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. *Ann Oncol*, 23 (1), 28-36.
128. E. Norero, M. A. Alarcon, C. Hakkaart và cộng sự (2019). Identification of c.1531C>T Pathogenic Variant in the CDH1 Gene as a Novel Germline Mutation of Hereditary Diffuse Gastric Cancer. *Int J Mol Sci*, 20 (20),
129. A. R. Bustos-Carpinteyro, C. Oliveira, A. Sousa và cộng sự (2019). CDH1 somatic alterations in Mexican patients with diffuse and mixed sporadic gastric cancer. *BMC Cancer*, 19 (1), 69.
130. P. K. Dhillon, D. C. Farrow, T. L. Vaughan và cộng sự (2001). Family history of cancer and risk of esophageal and gastric cancers in the United States. *Int J Cancer*, 93 (1), 148-152.
131. H. Brenner, V. Arndt, T. Sturmer và cộng sự (2000). Individual and joint contribution of family history and Helicobacter pylori infection to the risk of gastric carcinoma. *Cancer*, 88 (2), 274-279.

132. T. T. Hoa (2009 ). Đánh giá hiệu quả của hóa trị bổ trợ ECX trên bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến dạ dày sau phẫu thuật tại bệnh viện K (2006-2009) *Luận văn thạc sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội. ,*
133. L. T. Trung (2011). Đánh giá hiệu quả điều trị ung thư dạ dày di căn hạch bằng phẫu thuật triệt căn kết hợp hóa chất bổ trợ tại bệnh viện K. *Luận văn thạc sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội. ,*
134. N. V. H. Nguyễn Quang Thái (2010). Nhận xét kết quả sớm điều trị phẫu thuật ung thư dạ dày tại khoa phẫu thuật tổng hợp bệnh viện K năm 2010. *Tạp chí Ung thư học, Hội thảo Quốc gia Phòng chống ung thư lần thứ XV, ( số 1-2010), 314-319.*
135. B. Á. Tuyết (2003). Nhận xét đặc điểm lâm sàng, hình ảnh nội soi và mô bệnh học của ung thư dạ dày điều trị tại bệnh viện K từ tháng 9/2002 – 6/2003. *Luận văn thạc sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội. ,*
136. T. H. Sơn (2001). Nghiên cứu nạo vét hạch trong điều trị phẫu thuật ung thư dạ dày. *Luận án tiến sỹ Y khoa, Trường Đại học Y Hà Nội.,*
137. Y. J. Bang, E. Van Cutsem, A. Feyereislova và cộng sự (2010). Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 376 (9742), 687-697.
138. F. Pacelli, V. Papa, P. Caprino và cộng sự (2001). Proximal compared with distal gastric cancer: multivariate analysis of prognostic factors. *Am Surg*, 67 (7), 697-703.
139. W. L. Fang, S. C. Chang, Y. T. Lan và cộng sự (2013). Molecular and survival differences between familial and sporadic gastric cancers. *Biomed Res Int*, 2013, 396272.

140. J. Y. Lee, E. J. Gong, E. J. Chung và cộng sự (2017). The Characteristics and Prognosis of Diffuse-Type Early Gastric Cancer Diagnosed during Health Check-Ups. *Gut Liver*, 11 (6), 807-812.
141. G. Corso, D. Marrelli, V. Pascale và cộng sự (2012). Frequency of CDH1 germline mutations in gastric carcinoma coming from high- and low-risk areas: metanalysis and systematic review of the literature. *BMC Cancer*, 12, 8.
142. W. Lo, B. Zhu, A. Sabesan và cộng sự (2019). Associations of CDH1 germline variant location and cancer phenotype in families with hereditary diffuse gastric cancer (HDGC). *J Med Genet*, 56 (6), 370-379.
143. C. Oliveira, H. Pinheiro, J. Figueiredo và cộng sự (2013). E-cadherin alterations in hereditary disorders with emphasis on hereditary diffuse gastric cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116, 337-359.
144. T. D. Godwin, S. T. Kelly, T. P. Brew và cộng sự (2019). E-cadherin-deficient cells have synthetic lethal vulnerabilities in plasma membrane organisation, dynamics and function. *Gastric Cancer*, 22 (2), 273-286.
145. E. Parisini, J. M. Higgins, J. H. Liu và cộng sự (2007). The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *J Mol Biol*, 373 (2), 401-411.
146. S. R. Ghaffari, M. Rafati, T. Sabokbar và cộng sự (2010). A novel truncating mutation in the E-cadherin gene in the first Iranian family with hereditary diffuse gastric cancer. *Eur J Surg Oncol*, 36 (6), 559-562.

147. C. Oliveira, M. C. Bordin, N. Grehan và cộng sự (2002). Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary diffuse gastric cancer kindred. *Hum Mutat*, 19 (5), 510-517.
148. J. T. Bacani, M. Soares, R. Zwingerman và cộng sự (2006). CDH1/E-cadherin germline mutations in early-onset gastric cancer. *J Med Genet*, 43 (11), 867-872.
149. M. Garziera, V. Canzonieri, R. Cannizzaro và cộng sự (2013). Identification and characterization of CDH1 germline variants in sporadic gastric cancer patients and in individuals at risk of gastric cancer. *PLoS One*, 8 (10), e77035.
150. J. Figueiredo, O. Soderberg, J. Simoes-Correia và cộng sự (2013). The importance of E-cadherin binding partners to evaluate the pathogenicity of E-cadherin missense mutations associated to HDGC. *Eur J Hum Genet*, 21 (3), 301-309.
151. C. Oliveira, J. Senz, P. Kaurah và cộng sự (2009). Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Hum Mol Genet*, 18 (9), 1545-1555.
152. O. J. Harrison, F. Bahna, P. S. Katsamba và cộng sự (2010). Two-step adhesive binding by classical cadherins. *Nat Struct Mol Biol*, 17 (3), 348-357.
153. I. P. Vogelaar, J. Figueiredo, I. A. van Rooij và cộng sự (2013). Identification of germline mutations in the cancer predisposing gene CDH1 in patients with orofacial clefts. *Hum Mol Genet*, 22 (5), 919-926.
154. Q. H. Chen, W. Deng, X. W. Li và cộng sự (2013). Novel CDH1 germline mutations identified in Chinese gastric cancer patients. *World J Gastroenterol*, 19 (6), 909-916.



155. M. Garziera, V. De Re, S. Geremia và cộng sự (2013). A novel CDH1 germline missense mutation in a sporadic gastric cancer patient in north-east of Italy. *Clin Exp Med*, 13 (2), 149-157.
156. R. S. C. Guindalini, M. C. V. Cormedi, S. Maistro và cộng sự (2019). Frequency of CDH1 germline variants and contribution of dietary habits in early age onset gastric cancer patients in Brazil. *Gastric Cancer*, 22 (5), 920-931.
157. A. El-Husny, M. Raiol-Moraes, M. Amador và cộng sự (2016). CDH1 mutations in gastric cancer patients from northern Brazil identified by Next- Generation Sequencing (NGS). *Genet Mol Biol*, 39 (2), 189-198.
158. K. J. Kwon, K. N. Shim, E. M. Song và cộng sự (2014). Clinicopathological characteristics and prognosis of signet ring cell carcinoma of the stomach. *Gastric Cancer*, 17 (1), 43-53.
159. N. A. Howlader, Krapcho, M., Miller, D., et al (2017). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. *Bethesda, MD: National Cancer Institute*; [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2014/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/), based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site,
160. Y. Lin, J. Yuan, L. Wang và cộng sự (2015). Correlation between SNPs in CDH1 and gastric cancer in Chinese population. *Open Med (Wars)*, 10 (1), 57-62.
161. M. S. Al-Moundhri, M. Al-Khanbashi, M. Al-Kindi và cộng sự (2010). Association of E-cadherin (CDH1) gene polymorphisms and gastric cancer risk. *World J Gastroenterol*, 16 (27), 3432-3436.
162. E. Avizienyte, V. Launonen, R. Salovaara và cộng sự (2001). E-cadherin is not frequently mutated in hereditary gastric cancer. *J Med Genet*, 38 (1), 49-52.

163. Y. Zhang, X. Liu, Y. Fan và cộng sự (2006). Germline mutations and polymorphic variants in MMR, E-cadherin and MYH genes associated with familial gastric cancer in Jiangsu of China. *Int J Cancer*, 119 (11), 2592-2596.
164. A. Jakubowska, M. Lawniczak, B. Wojnarska và cộng sự (2010). CDH1 gene mutations do not contribute in hereditary diffuse gastric cancer in Poland. *Fam Cancer*, 9 (4), 605-608.
165. X. F. Zhang, Y. M. Wang, H. Ge và cộng sự (2008). Association of CDH1 single nucleotide polymorphisms with susceptibility to esophageal squamous cell carcinomas and gastric cardia carcinomas. *Dis Esophagus*, 21 (1), 21-29.
166. Y. Li, Y. Tang, R. Zhou và cộng sự (2011). Genetic polymorphism in the 3'-untranslated region of the E-cadherin gene is associated with risk of different cancers. *Mol Carcinog*, 50 (11), 857-862.
167. I. Kluijt, E. J. Siemerink, M. G. Ausems và cộng sự (2012). CDH1-related hereditary diffuse gastric cancer syndrome: clinical variations and implications for counseling. *Int J Cancer*, 131 (2), 367-376.
168. C. Oliveira, H. Pinheiro, J. Figueiredo và cộng sự (2015). Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol*, 16 (2), e60-70.
169. D. Shaw, V. Blair, A. Framp và cộng sự (2005). Chromoendoscopic surveillance in hereditary diffuse gastric cancer: an alternative to prophylactic gastrectomy? *Gut*, 54 (4), 461-468.
170. J. A. Norton, C. M. Ham, J. Van Dam và cộng sự (2007). CDH1 truncating mutations in the E-cadherin gene: an indication for total gastrectomy to treat hereditary diffuse gastric cancer. *Ann Surg*, 245 (6), 873-879.

171. R. M. Cisco, J. M. Ford và J. A. Norton (2008). Hereditary diffuse gastric cancer: implications of genetic testing for screening and prophylactic surgery. *Cancer*, 113 (7 Suppl), 1850-1856.
172. V. Blair, I. Martin, D. Shaw và cộng sự (2006). Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis and management. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4 (3), 262-275.
173. H. T. Lynch, P. Kaurah, D. Wirtzfeld và cộng sự (2008). Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis, genetic counseling, and prophylactic total gastrectomy. *Cancer*, 112 (12), 2655-2663.
174. P. K. Pandalai, G. Y. Lauwers, D. C. Chung và cộng sự (2011). Prophylactic total gastrectomy for individuals with germline CDH1 mutation. *Surgery*, 149 (3), 347-355.
175. Y. Yuasa (2003). Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 3 (8), 592-600.
176. Y. C. Lim, M. di Pietro, M. O'Donovan và cộng sự (2014). Prospective cohort study assessing outcomes of patients from families fulfilling criteria for hereditary diffuse gastric cancer undergoing endoscopic surveillance. *Gastrointest Endosc*, 80 (1), 78-87.

**PHỤ LỤC 1**  
**Bảng nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA được tách chiết từ**  
**mẫu máu bệnh nhân nghiên cứu**

*Bảng 1. Kết quả tách DNA của các bệnh nhân*

Mã số	DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )	Mã số	DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )	Mã số	DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (A <sub>260/280</sub> )
B4	31,5	1,8	B341	23,1	1,9	B723	40,3	1,8
B22	19,4	1,7	B367	20,1	2,0	B724	25,4	1,8
B38	17,3	1,7	B445	58,7	1,9	B725	39,3	1,8
B39	28,5	1,8	B462	44,2	1,9	B726	38,4	1,8
B144	79,1	1,8	B486	29,7	1,8	B728	60,6	1,7
B151	22,5	1,9	B519	29,6	1,8	B729	45,4	1,9
B158	15,0	1,8	B532	76,7	1,8	B730	24,4	1,9
B169	19,8	1,9	B551	22,1	1,7	B731	26,2	2,0
B193	54,0	1,8	B637	47,9	1,9	B732	107,3	1,9
B277	34,9	1,9	B668	66,4	1,8	B733	29,9	1,8
B279	38,0	1,8	B717	22,5	1,9	B734	55,1	1,9
B284	19,2	1,9	B718	18,4	1,8	B735	54,3	1,8
B285	20,7	1,7	B719	54,5	1,8	B736	22,0	1,9
B295	45,1	1,8	B720	29,7	1,7	B737	38,1	1,9
B308	19,7	1,9	B722	44,0	1,8	B738	42,0	1,9

**Bảng 2. Kết quả tách DNA của các thành viên trong 4 gia đình**

Mã số	DNA ng/ $\mu$ l	Độ tinh sạch $A_{260/280}$	Mã số	DNA ng/ $\mu$ l	Độ tinh sạch $A_{260/280}$	Mã số	DNA ng/ $\mu$ l	Độ tinh sạch $A_{260/280}$	Mã số	DNA ng/ $\mu$ l	Độ tinh sạch $A_{260/280}$
Gia đình bệnh nhân B4			Gia đình bệnh nhân B151			Gia đình bệnh nhân B532			Gia đình bệnh nhân B732		
III-1	35,8	1,9	II-1	36,9	1,9	II-2	52,1	1,8	II-3	18,9	1,9
III-2	35,5	1,9	III-1	30,2	1,9	II-6	25,0	1,8	III-1	19,1	1,8
III-3	44,8	2,0	III-2	51,0	1,9	III-1	60,9	1,8	IV-1	17,1	1,8
III-4	29,2	1,8	III-4	25,6	1,9	III-2	31,3	1,7	IV-2	20,6	2,0
III-5	22,5	1,9	III-6	88,9	1,9	III-4	98,9	1,8			
III-6	76,3	1,9	III-7	41,3	1,9	III-8	49,4	1,8			
III-7	33,6	2,0	IV-2	42,8	1,8	IV-5	31,9	1,7			
IV-1	28,9	1,9	IV-3	53,9	1,9	IV-6	38,0	1,9			
IV-6	42,4	1,9	IV-4	42,2	1,9	IV-7	37,9	1,8			
IV-7	40,1	1,8	IV-5	80,9	1,9	IV-8	55,1	2,0			
IV-11	65,1	1,8				IV-9	69,8	1,9			

## PHỤ LỤC 2: BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

### NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA HÌNH VÀ NHẠY CẢM CỦA MỘT SỐ GEN LIÊN QUAN ĐẾN NGUY CƠ UNG THƯ DẠ DÀY TRÊN NGƯỜI VIỆT NAM

#### BỘ CÂU HỎI PHÒNG VẤN BỆNH NHÂN NỘI TRÚ VÀ NGOẠI TRÚ

Mã số phiếu: \_\_\_\_\_

Loại hình cơ sở y tế (nơi tiếp cận BN): Bệnh viện.....

Quận/ Huyện:.....

Tỉnh/ Thành phố: 1. Hà Nội 2. Khác

Họ và tên người được phỏng vấn:.....

Địa chỉ:.....

Điện thoại:.....

Mã số bệnh án :.....

Loại BN: 1. Nội trú. 2. Ngoại trú.

#### Thoả thuận nghiên cứu

Tôi là ..... nghiên cứu viên của đề tài do trường Đại học Y Hà Nội chủ trì. Hiện nay, chúng tôi muốn tìm hiểu về tình hình sử dụng dịch vụ y tế, chỉ tiêu cho chăm sóc sức khỏe, liên quan đến một số dịch vụ dự phòng, chăm sóc và điều trị về bệnh lý ung thư dạ dày. Do đó, tôi xin phép được hỏi ý kiến của anh/chị một số câu hỏi về chăm sóc sức khỏe của anh/chị và các thành viên trong gia đình.

Sự tham gia của anh/chị và gia đình trong cuộc khảo sát này là hoàn toàn tự nguyện. Chúng tôi đảm bảo rằng những thông tin anh/chị cung cấp sẽ chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu. Đồng thời, những thông tin cá nhân của anh/chị hoàn toàn được giữ bí mật. Chúng tôi hi vọng rằng thông qua hoạt động này chúng ta có thể tìm hiểu những cơ chế chi trả cho chăm sóc sức khỏe thuận tiện và hiệu quả nhất.

Đồng thời, những thông tin anh/ chị cung cấp cũng sẽ có những đóng góp ý nghĩa vào việc xây dựng và thực hiện các chính sách và chương trình y tế mang lại lợi ích cho mọi người.

Cuộc phỏng vấn sẽ kéo dài khoảng 30 phút, anh/chị có thể từ chối trả lời bất kỳ câu hỏi nào mà anh /chị không muốn trong suốt quá trình phỏng vấn.

Sau khi phỏng vấn chúng tôi sẽ tiến hành lấy khoảng 4mL máu của anh/chị để phục vụ đề tài nghiên cứu.

Anh/ chị có đồng ý tham gia nghiên cứu không?

1- Có- / 2- Không

Chữ ký của người được phỏng vấn: \_\_\_\_\_

Chữ ký của điều tra viên: \_\_\_\_\_

<b>A</b>		<b>THÔNG TIN CHUNG</b>	
<b>A1</b>	Năm sinh của anh/chị?		.....
<b>A2</b>	Gới tính?	Nam Nữ	1 2
<b>A3</b>	Anh/ chị đã hoàn thành hết cấp học nào?	Không đi học Cấp 1 - Tiểu học Cấp 2 - Trung học cơ sở Cấp 3 - Phổ thông trung học Trung cấp, cao đẳng, dạy nghề Đại học Sau đại học	1 2 3 4 5 6 7
<b>A4</b>	Tình trạng hôn nhân?	Độc thân Sống với vợ/ chồng Sống chung như vợ/ chồng, chưa kết hôn Ly dị/ Ly thân Góa	1 2 3 4 5
<b>A5</b>	Tôn giáo?	Không có tôn giáo Đạo Phật Đạo Thiên chúa giáo Đạo Tin Lành Khác	1 2 3 4 5
<b>A6</b>	Hiện tại anh chị làm <u>nghe</u> gì? (có thu nhập)	Thất nghiệp Làm nghề tự do Cán bộ, công chức, viên chức Công nhân, Nông dân Học sinh, sinh viên Nghề khác (có thu nhập)	1 2 3 4 5 6

<b>B</b>		<b>TIỀN SỬ BỆNH TẬT CÁ NHÂN</b>	
<b>B1</b>	Anh/chị đã từng mắc bệnh lý gì liên quan đến dạ dày chưa?	Rồi Chưa	1 2 → C1
<b>B2</b>	Bệnh lý dạ dày được chẩn đoán là gì?	Viêm loét niêm mạc dạ dày Viêm teo dạ dày Khác	1 2 3
<b>B3</b>	Anh/ chị được chẩn đoán cách đây bao lâu?	Trên 5 năm Từ 1-5 năm Dưới 1 năm	1 2 3
<b>B4</b>	Anh/chị đã được chẩn đoán mắc <i>Helicobacter Pylori</i> chưa?	Rồi Chưa	1 2
<b>B5</b>	Anh/chị đã được chẩn đoán KDD cách đây bao lâu?		
<b>B6</b>	Anh chị đã được điều trị bằng những phương pháp gì?	Xạ trị Hóa trị Phẫu thuật Phẫu thuật + xạ trị Khác	1 2 3 4 5
<b>B7</b>	Hiện tại, Anh chị được điều trị bằng những phương pháp gì?	Xạ trị Hóa trị Chăm sóc giảm nhẹ Khác	1 2 3 4
<b>B8</b>	Anh/chị hiện tại có mắc bệnh lý gì kèm theo không? (Ghi rõ chi tiết)		

<b>C</b>	<b>TIỀN SỬ BỆNH TẬT GIA ĐÌNH</b>	
<b>C1</b>	Gia đình anh/chị có ai mắc KDD chưa?  Rồi Chưa	1 2 → D1
<b>C2</b>	Có mấy người mắc?  1 người 2 người Trên 2 người  Là những ai: .....	1 2 3
<b>C3</b>	Tuổi mắc bệnh của thành viên trong gia đình?  Trên 40 tuổi Dưới 40 tuổi	1 2
<b>C4</b>	Thành viên đã mắc bệnh được chẩn đoán và điều trị cách đây bn lâu?	
<b>C5</b>	Gia đình anh/chị đã có ai mắc các bệnh UT không phải (#)KDD ?  Rồi Chưa	1 2
<b>C6</b>	Liệt kê: (quan hệ gia đình/ bệnh lý ung thư/tuổi mắc/tình trạng hiện tại)	
<b>D</b>	<b>SỬ DỤNG RƯỢU</b>	
<b>D1</b>	Trong thời gian gần đây, bao lâu anh/ chị uống rượu một lần?  Không bao giờ Hàng tháng Hàng tuần 2-3 lần mỗi tuần ≥ 4 lần mỗi tuần	1 → E1 2 3 4 5
<b>D2</b>	Thông thường mỗi lần uống rượu, anh/ chị thường uống mấy chén/ ly?	.....chén/ ly
<b>D3</b>	Bao lâu lại có một lần anh/ chị uống từ 6 chén/ ly rượu trở lên?  Không bao giờ Vài tháng một lần Hàng tháng Hàng tuần Hàng ngày	1 2 3 4 5
<b>E</b>	<b>SỬ DỤNG THUỐC LÁ</b>	
<b>E1</b>	Lần đầu tiên anh/chị hút thuốc lá vào năm bao nhiêu tuổi?  Chưa từng hút	.....tuổi 99 → F1
<b>E2</b>	Anh/chị đã từng hút thuốc lá thường xuyên hàng ngày trong bao nhiêu năm? Chưa từng hút thuốc lá thường xuyên Không nhớ	.....năm 98 99
<b>E3</b>	Trước khi phát hiện bệnh, anh/chị hút bao nhiêu điếu thuốc lá một ngày? Sau khi phát hiện bệnh, anh/chị hút bao nhiêu điếu thuốc lá một ngày?	..... điếu ..... điếu
<b>E4</b>	Từ trước đến giờ, anh/chị đã hút tổng cộng <u>100 điếu thuốc lá hoặc nhiều hơn</u> không? (100 điếu thuốc = 5 bao thuốc)  Có Không	1 2 → K1
<b>E5</b>	Trong vòng 30 ngày trở lại đây, anh/chị có hút thuốc lá không?  Có Không	1 2



<b>E6</b>	<b>Trung bình 1 ngày hiện tại, anh/chị hút bao nhiêu điếu thuốc?</b> (1 bao thuốc = 20 điếu thuốc)	Ít hơn hoặc bằng 10 điếu thuốc/ngày	1
		11-20 điếu thuốc/ngày	2
		21-30 điếu thuốc/ngày	3
		Trên 31 điếu thuốc/ngày	4
		Không nhớ	99

<b>K</b>	<b><u>TRIỆU CHỨNG LÂM SÀNG</u></b>	
----------	------------------------------------	--

	Triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân khi vào viện	Đau thượng vị	1
		Gầy sút cân	2
		Buồn nôn/nôn	3
		Chán ăn	4
		Nôn ra máu và/hoặc đi ngoài phân đen	5
		Khó nuốt	6
		Thiếu máu	7
		Vàng da, vàng mắt	8
		Bụng chướng	9
		Ăn thượng vị đau	
Hạch thượng đòn			
Thời gian xuất hiện triệu chứng	< 6 tháng	1	
	6 – 12 tháng	2	
	>12 tháng	3	

<b>L</b>	<b><u>HÌNH ẢNH NỘI SOI DA DÀY:</u></b>	Ngày nội soi: .....
----------	--	---------------------

<b>L1</b>	Hình ảnh nội soi của bệnh nhân?	Bình thường Có tổn thương	1 → M1 2
<b>L2</b>	Vị trí tổn thương?	Tâm vị Hang - môn vị Thân vị Khác	1 2 3 4 .....
<b>L3</b>	Kích thước tổn thương?	<1cm 1 – 2cm 2,1 – 3cm >3cm Khác	1 2 3 4 .....
<b>L4</b>	Các loại tổn thương	Loét Sùi Thâm nhiễm Loét thâm nhiễm Khác	1 2 3 4 .....

<b>M</b>	<b><u>KẾT QUẢ MÔ BỆNH HỌC</u></b>	
----------	-----------------------------------	--

	Mã tiêu bản.....		
	Bác sĩ đọc.....		
	Nơi đọc.....		
<b>M1</b>	Phân loại theo Lauren?	Thở ruột Thở lan tỏa	1 2

<b>M2</b>	Phân loại theo WHO?	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú	1
		Ung thư biểu mô tuyến thể ống nhỏ	2
		Ung thư biểu mô tuyến thể nhày	3
		Ung thư biểu mô tế bào nhân	4
		Ung thư biểu mô tuyến vảy	5
		Ung thư biểu mô tế bào vảy	6
		Ung thư biểu mô thể tế bào nhỏ	7
		Ung thư biểu mô thể không biệt hóa	8
		Các ung thư biểu mô khác	.....
<b>M3</b>	Mức độ biệt hóa?	Cao	1
		Vừa	2
		Kém	3
<b>M4</b>	<b>Kết luận:</b> K dạ dày thể .....	Có tính chất gia đình	1
		Không có tính chất gia đình	2
		Giai đoạn bệnh theo TNM:	

**Kết quả cận lâm sàng:**

Xét nghiệm	Kết quả (vào viện)
Test <i>HP</i>	
Nhóm máu	

**Kết quả chẩn đoán hình ảnh:**

1. Siêu âm:
2. Cắt lớp:
3. Khác:

**Kết quả giải trình tự gen:**

**PHỤ LỤC 3**  
**TRÌNH TỰ MÔI CỦA GEN *CDH1***

<b>Exon</b>	<b>Kích thước Exon</b>	<b>Kích thước sản phẩm PCR</b>	<b>Tm (° C)</b>	<b>Trình tự (5' – 3')</b>
E1	171	287	58	<b>F:</b> CAGGTGAACCCTCAGCCAATC <b>R:</b> AATGCGTCCCTCGCAAGT
E2	114	242	59	<b>F:</b> CACTCTTTACATGGTGGTGATG <b>R:</b> CAGAGAACTCCTATCTTGGGCA
E3	223	358	57	<b>F:</b> GTCCTCCACAAGTTCGCTC <b>R:</b> AGCGCACTAAAACAACAGCG
E4I4E5	143 – 155	645	61	<b>F:</b> GACGCTGTCTGGCTAGGTTG <b>R:</b> GCAACAGGTCAAGAGGTGTC
E6	144	476	55	<b>F:</b> AGAGTTTTTCAGGCCCGCATCT <b>R:</b> TTACACAACCTTTGGGCTTGGA
E7	175	307	62	<b>F:</b> GCAGTATTGACCCAGTCCCAA <b>R:</b> CTTTGTCCACGGGATTGAGC
I7E8	128	736	61	<b>F:</b> CCATCGCTTACACCATCCTC <b>R:</b> CAACTTCACAATCTTGCACC
E9	182	302	57	<b>F:</b> AATCCTTTAGCCCCCTGAGA <b>R:</b> AGGGGACAAGGGTATGAACA
E10	244	502	57	<b>F:</b> CCCTAGAATAGCCCCAGCTTT <b>R:</b> GCTGCAAGTCAGTTGAAAAATC
E11	145	287	53	<b>F:</b> AGCGCTTAAGCCGTTTTCA <b>R:</b> AGGGAGGGGCAAGGAACT
E12	224	687	53	<b>F:</b> GGAAACAACAGGCAGGCAATA <b>R:</b> CAATGGAAGGGGTGACATCTA
E13	227	664	55	<b>F:</b> TACCGAACCCAGCGACATC <b>R:</b> GGCTGGCATAACTTGGGAGT
E14	130	523	57	<b>F:</b> CCGACTTCAGGGATGTGAGTG <b>R:</b> GCTCAGGCAAGCTGAAAACAT
E15	143	662	55	<b>F:</b> TCACACAACAAAGCCCCAGAT <b>R:</b> GCTCAGGCAAGCTGAAAACAT
E16-1		840	57	<b>F:</b> TGGTTGGTGCTTGCATCTCTC <b>R:</b> GTAGCTGACTTCTCCCCTTCTT

## NGUYÊN TẮC TRONG THIẾT KẾ MỒI

1. Chiều dài của môi: môi tối ưu cho phản ứng khuếch đại PCR và cho phản ứng giải trình tự từ 18-24bp, đủ để gắn đặc hiệu và gắn vào với khuôn ở nhiệt độ gắn môi.

2. Nhiệt độ nóng chảy của môi ( $T_m$ ): tối ưu trong khoảng 52-58°C,  $T_m > 65^\circ\text{C}$  thường dễ xảy ra các sản phẩm phụ thứ cấp.

→  $T_m$  nên được tính toán cẩn trọng, nếu  $T_m$  giữa hai môi chênh nhau quá 5°C phản ứng khuếch đại rất khó xảy ra.

3. Nhiệt độ gắn môi ( $T_a$ ) quyết định tính đặc hiệu quan trọng của phản ứng khuếch đại PCR.  $T_a$  quá cao dẫn đến việc gắn không hiệu quả giữa môi và DNA gốc dẫn tới hiệu suất sản phẩm PCR thấp.  $T_a$  quá thấp có thể dẫn tới việc gắn không đặc hiệu gây ra bởi việc bắt cặp nhầm với sản phẩm phụ khác.

4. Tỷ lệ G, C trong môi: hàm lượng base G, C trong tổng số base trong mỗi môi nên trong khoảng 40-60%.

5. Kẹp GC: sự hiện diện của base G, C ở 5 base cuối cùng tại đầu 3' của mỗi môi vô cùng quan trọng quyết định khả năng liên kết do liên kết G và C thường mạnh hơn. Tuy nhiên để tránh việc gắn không đặc hiệu, lượng base G,C không nên lớn hơn 3 trong 5 base cuối đầu 3'.

6. Cấu trúc bậc 2: Sự hiện diện của các cấu trúc thứ cấp của môi được tạo ra bởi các tương tác giữa các phân tử môi hoặc nội phân tử môi có thể dẫn đến kém hoặc không có năng suất của sản phẩm. Chúng ảnh hưởng xấu đến quá trình ủ mẫu môi và cả quá trình khuếch đại, do đó làm giảm đáng kể “số lượng thực” sẵn có của môi cho phản ứng.

Cấu trúc kẹp tóc (Hairpins): là cấu trúc thứ phát được tạo ra do sự tương tác liên kết giữa chính các base trong môi đó. Nên hạn chế cấu trúc kẹp tóc này. Điều kiện tối ưu  $\Delta G$  kẹp tóc tại vị trí 3' nên lớn hơn -2 kcal/mol,  $\Delta G$  kẹp tóc bên trong (ngoại trừ 5 base đầu 3') nên lớn hơn -3 kcal/mol.

Liên kết tự thân của môi (Self-dimer): cấu trúc này hình thành do sự liên kết giữa 2 môi đơn cùng loại (ví dụ 2 môi xuôi tự liên kết với nhau trong chính

ống stock ban đầu). Khi các môi hình thành các liên kết self-dimer sẽ giảm hiệu quả bắt cặp với DNA đích, chúng làm giảm năng suất sản phẩm. Điều kiện tối ưu  $\Delta G$  của liên kết tự thân tại vị trí 3' nên lớn hơn -5 kcal/mol,  $\Delta G$  liên kết tự thân bên trong môi (trừ 5 base đầu 3') nên lớn hơn -6 kcal/mol.

Liên kết chéo giữa 2 môi (Cross-dimer): liên kết hình thành giữa môi xuôi và môi ngược. Điều kiện tối ưu  $\Delta G$  của liên kết giữa 2 môi tại vị trí 3' nên lớn hơn -5 kcal/mol,  $\Delta G$  liên kết giữa 2 môi bên trong môi (trừ 5 base đầu 3') nên lớn hơn -6 kcal/mol.

7. Lặp cặp: nên tránh các đoạn di-nucleotid lặp đi lặp lại nhiều lần trong các môi có thể gây bắt cặp nhầm. VD: ATATATATAT. Số lượng cặp di-nucleotid có thể chấp nhận trong môi nên dưới 4 cặp.

8. Lặp nucleotid: hạn chế các nucleotid lặp lại liên tiếp quá nhiều lần cũng dễ dẫn tới sự bắt cặp nhầm. VD: AGCGGGGGATGGGG số nucleotid lặp lần lượt là 5 và 4 trong 1 môi. Số lượng nu đơn lặp liên tiếp tối đa cho phép nên không quá 4.

Trình tự gen *CDH1* được lấy trực tiếp từ trình tự FASTA trên kho dữ liệu NCBI thông qua phiên bản giới hạn phần mềm CLC Main Workbench 8.1.2. của hãng QIAGEN [120]. Trên phần mềm hiển thị rõ các vùng exon, các vùng mã hóa protein (coding DNA sequence), intron...

Nhóm nghiên cứu tiến hành thiết kế các cặp môi bao trùm cả exon và một phần intron liên tiếp để đảm bảo các yêu cầu về chiều dài đoạn DNA đích:

(1) Có thể kiểm tra các đột biến ghép nối splicing cận kề nếu có

(2) Đảm bảo khi giải trình tự bằng phương pháp Sanger có thể hạn chế những vùng tín hiệu nhiễu ban đầu có thể ảnh hưởng tới đoạn exon và rìa intron mong muốn.

(3) Thực hiện GTT trên hệ thống 3730 có thể giải được đoạn 1000bp, do đó đoạn đích mong muốn chiều dài dưới 1000bp.

**PHỤ LỤC 4**  
**DANH SÁCH CÁC THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU CỦA GIA**  
**ĐÌNH BỆNH NHÂN B4**

<b>STT</b>	<b>Ký hiệu</b>	<b>Họ và tên</b>	<b>Tuổi</b>	<b>Quan hệ với bệnh nhân</b>
1	III-1	Phạm Thanh T.	64	Bác họ
2	III-2	Phạm Hồng P.	62	Bác họ
3	III-3	Phạm Thị K.	55	Bác họ
4	III-4	Phạm Văn Đ.	65	Bác ruột
5	III-5	Phạm Văn X.	61	Bác ruột
6	III-6	Phạm Văn T.	59	Bố đẻ
7	III-7	Hồ Thị H.	57	Mẹ đẻ
8	IV-1	Phạm Văn Q.	37	Anh họ
9	IV-6	Phạm Thị H.	31	Chị họ
10	IV-7	Phạm Thị H.	34	Chị ruột
11	IV-11	Phạm Ngọc T.	17	Em ruột

**DANH SÁCH CÁC THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU CỦA GIA**  
**ĐÌNH BỆNH NHÂN B151**

<b>STT</b>	<b>Ký hiệu</b>	<b>Họ và tên</b>	<b>Tuổi</b>	<b>Quan hệ với bệnh nhân</b>
1	II-1	Ngô Thị X.	68	Mẹ đẻ
2	III-1	Nguyễn Bá T.	46	Anh trai
3	III-2	Nguyễn Bá S.	44	Anh trai
4	III-4	Nguyễn Thị Đ.	33	Em gái
5	III-6	Nguyễn Việt T.	44	Em họ
6	III-7	Nguyễn Thị H.	33	Em họ
7	IV-2	Nguyễn Bá C.	17	Cháu trai
8	IV-3	Nguyễn Thị Q.	23	Cháu gái
9	IV-4	Nguyễn Bá Q.	16	Cháu trai
10	IV-5	Mai Xuân A.	15	Con trai

**DANH SÁCH CÁC THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU CỦA GIA  
ĐÌNH BỆNH NHÂN B532**

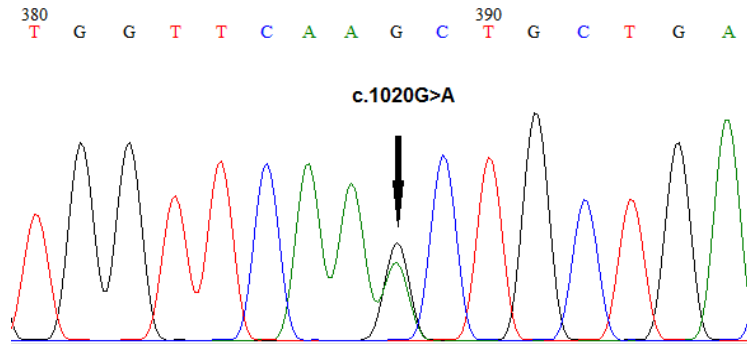
<b>STT</b>	<b>Ký hiệu</b>	<b>Họ và tên</b>	<b>Tuổi</b>	<b>Quan hệ với bệnh nhân</b>
1	II-2	Trần Văn Đ.	71	Bố đẻ
2	II-6	Trần Thị T.	54	Cô ruột
3	III-1	Trần Thị L.	48	Chị gái 1
4	III-2	Trần Thị L.	43	Chị gái 2
5	III-4	Trần Thị H.	37	Chị gái 3
6	III-8	Bùi Văn H.	27	Em họ
7	IV-5	Nguyễn Văn B.	16	Cháu trai
8	IV-6	Nguyễn Văn D.	15	Cháu trai
9	IV-7	Nguyễn Thị H.	13	Cháu gái
10	IV-8	Nguyễn Văn T.	15	Cháu trai
11	IV-9	Nguyễn Thị Minh T.	12	Cháu gái

**DANH SÁCH CÁC THÀNH VIÊN THAM GIA NGHIÊN CỨU CỦA GIA  
ĐÌNH BỆNH NHÂN B732**

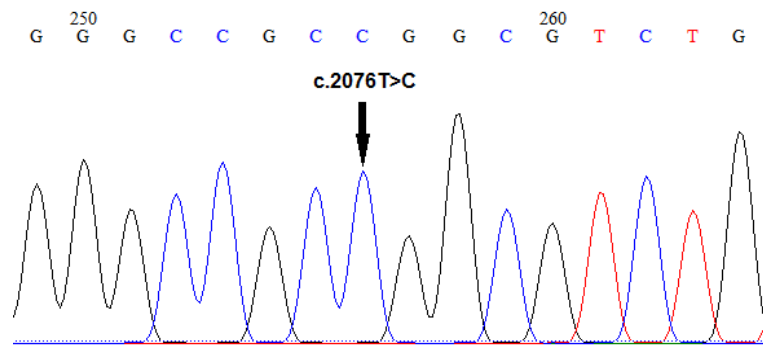
<b>STT</b>	<b>Ký hiệu</b>	<b>Họ và tên</b>	<b>Tuổi</b>	<b>Quan hệ với bệnh nhân</b>
1		Lê Thị C.	74	Mẹ đẻ
2		Phạm Thị Lê T.	37	Chị gái
3		Nguyễn Khánh L.	13	Cháu gái
4		Nguyễn Hoàng Gia B.	10	Cháu trai

## PHỤ LỤC 5

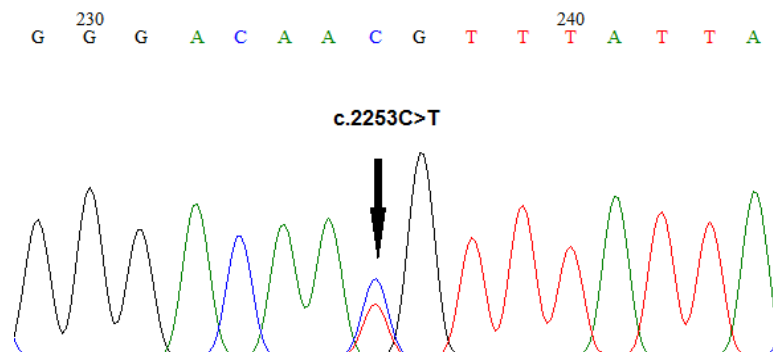
Hình ảnh của một số SNP trên gen *CDH1* được tìm thấy trong nghiên cứu



1. Hình ảnh giải trình tự SNP rs 61747632 – c.1020G>A (p.T340T) nằm trên Exon 8.

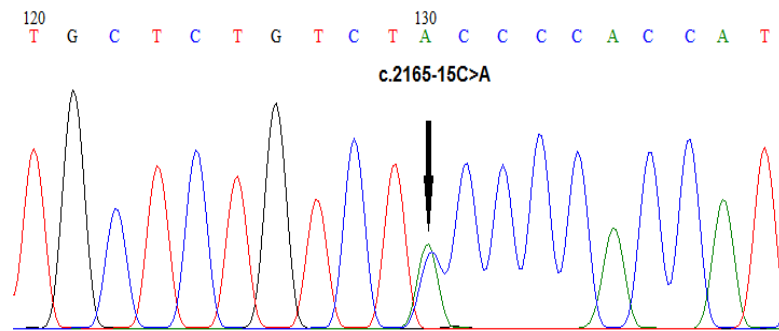


2. Hình ảnh giải trình tự SNP rs1801552 – c.2076T>C (p.A692A) nằm trên Exon 13, kiểu gen đồng hợp CC.

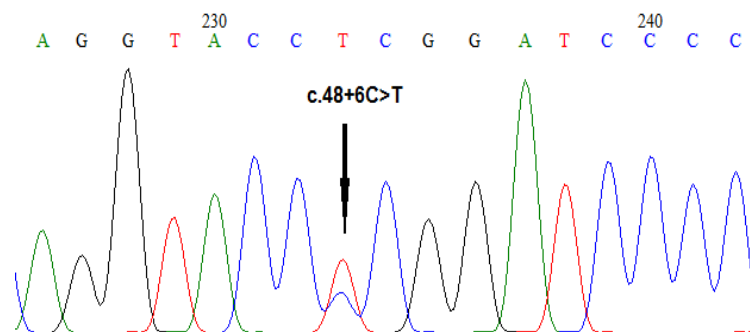


3. Hình ảnh giải trình tự SNP rs33964119 - c.2253C>T (p.N751N) nằm trên exon 14.

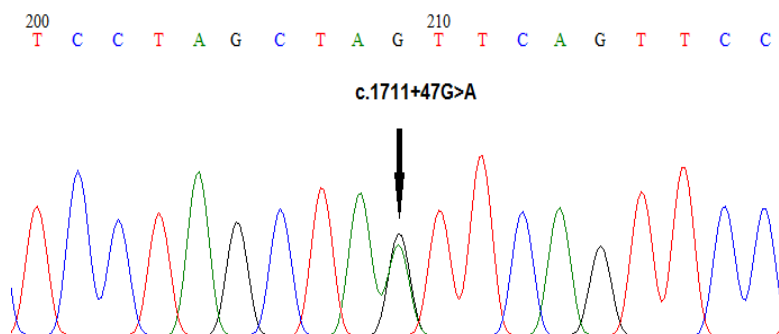




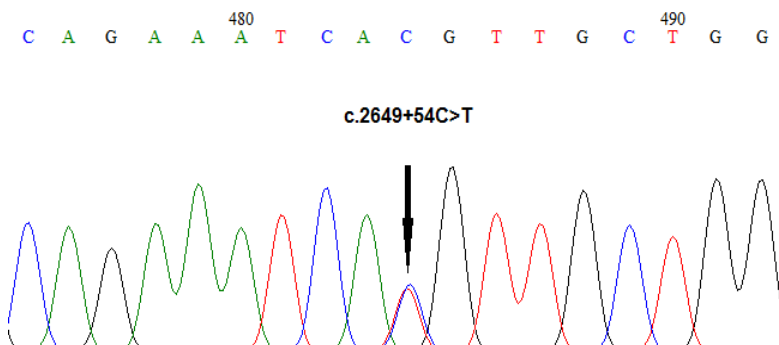
4. Hình ảnh giải trình tự SNP rs552874184 – c.2165-15C>A nằm trên intron 13.



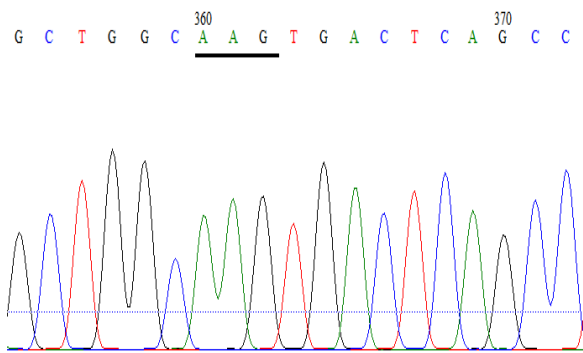
5. Hình ảnh giải trình tự SNP rs3743674 – c.48+6C>T nằm trên intron 1.



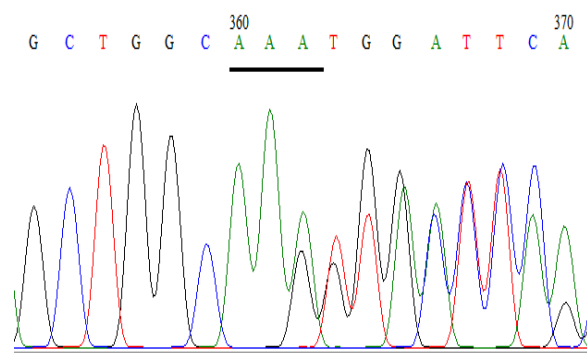
6. Hình ảnh giải trình tự gen SNP rs35667437 - c.1711+47G>A nằm trên intron 11.



7. Hình ảnh giải trình tự SNP rs1801026 – c.2649+54C>T nằm trên intron 16.

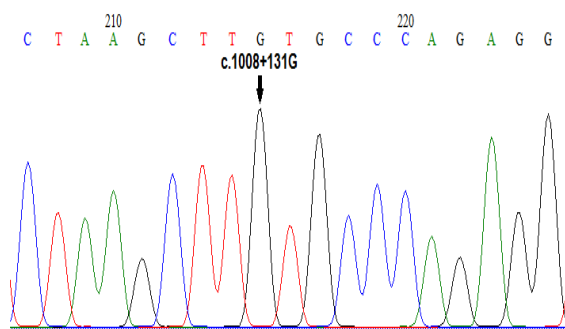


(a) c.2164+17A

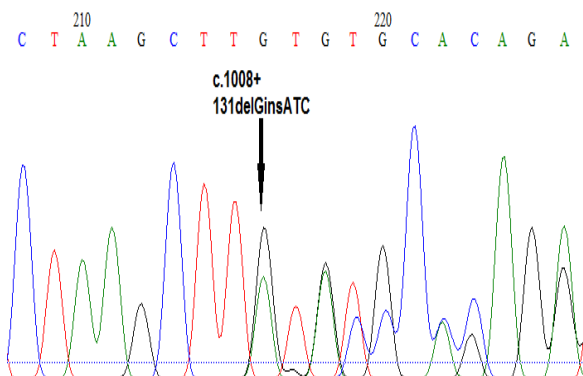


(b) c.2164+17dupA

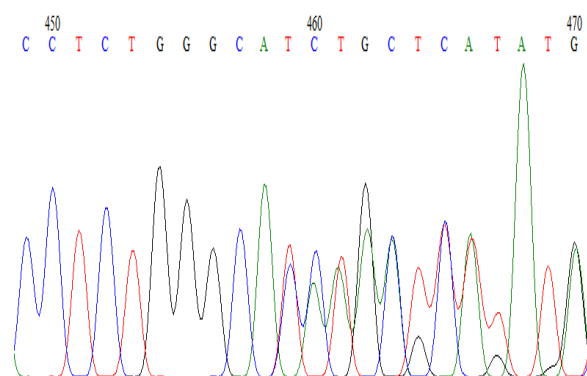
8. Hình ảnh giải trình tự SNP rs34939176 – c.2164+17dupA nằm trên intron 13. Hình (a) là hình ảnh giải trình tự bình thường. Hình (b) là hình ảnh giải trình tự SNP c.2164+17dupA



(a) c.1008+131G

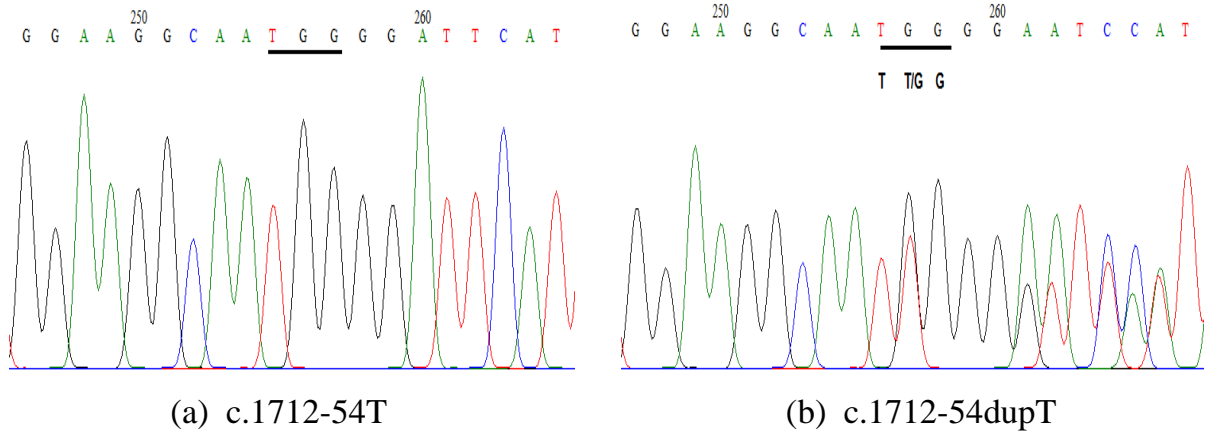


(b) c.1008+131delGinsATC  
Môi E7F

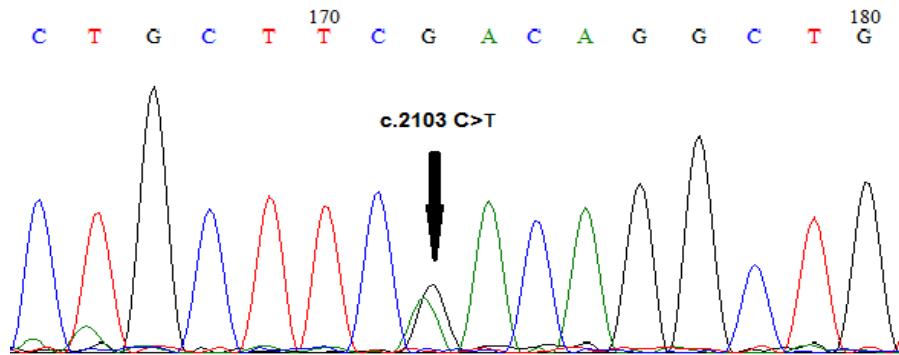


(c) c.1008+131delGinsATC  
Môi E7R

9. Hình ảnh giải trình tự SNP c.1008+131delGinsATC nằm trên intron 7, đây là SNP mới được phát hiện trong nghiên cứu. Hình (a) là hình ảnh GTT bình thường. Hình (b) là hình ảnh GTT SNP c.1008+131delGinsATC môi xuôi (F). Hình (c) là hình ảnh GTT SNP c.1008+131delGinsATC môi ngược (R).



10. Hình ảnh giải trình tự SNP c.1712-54dupT nằm trên intron 11, đây là SNP mới được phát hiện trong nghiên cứu. Hình (a) là hình ảnh GTT bình thường. Hình (b) là hình ảnh GTT SNP c.1712-54dupT.



11. Hình ảnh giải trình tự SNP rs730881656 - c.2103C>T (V701V) mỗi ngược (R).

**Phụ lục 6**  
**BỘ CÂU HỎI AUDIT-C**

STT	Nội dung câu hỏi	Nội dung câu trả lời	Điểm
1	Tần suất uống rượu trong thời gian gần đây	-Chưa bao giờ	0
		-≤ 1 lần/tháng	1
		-2 – 4 lần/tháng	2
		-2 – 3 lần/tuần	3
		-≥ 4 lần/tuần	4
2	Số chén rượu uống trong một ngày	-Không uống	0
		-1 – 2 chén*	0
		-3 – 4 chén	1
		-5 – 6 chén	2
		-7 – 9 chén	3
-≥ 10 chén	4		
3	Bao nhiêu lâu uống từ 6 chén trở lên trong một lần uống	-Không bao giờ	0
		-Vài tháng một lần	1
		-Hàng tháng	2
		-Hàng tuần	3
		-Hàng ngày	4

\*: 1 chén rượu trong bộ câu hỏi tương đương với 1 đơn vị rượu tiêu chuẩn

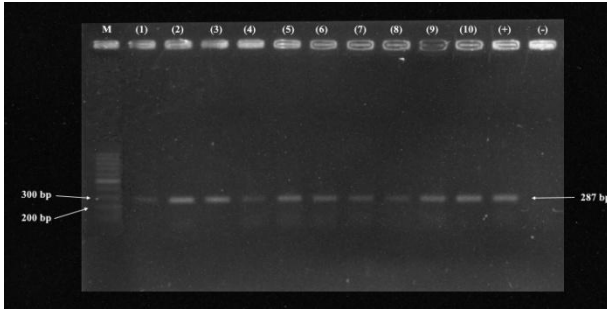
*1 đơn vị cồn = 10 g cồn nguyên chất  
chứa trong dung dịch nước uống, tương đương*



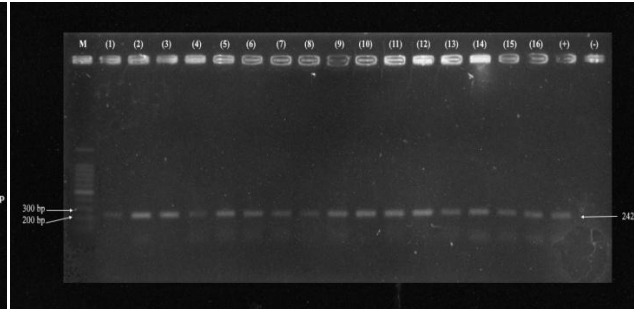
## PHỤ LỤC 7

### Hình ảnh điện di các exon của gen *CDH1*

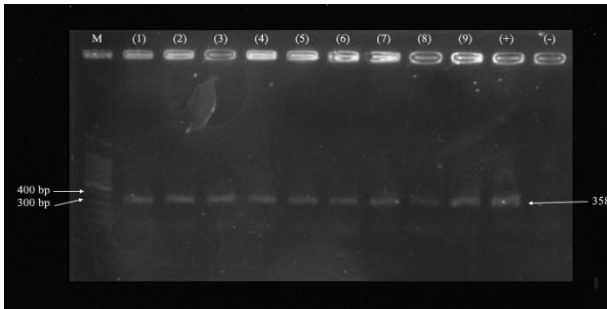
Hình ảnh điện di Exon 1 (287bp)



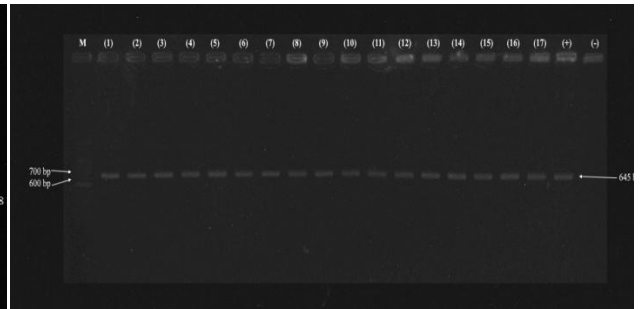
Hình ảnh điện di Exon 2 (242bp)



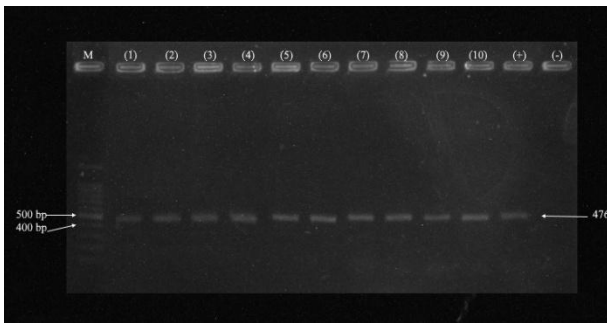
Hình ảnh điện di Exon 3 (358bp)



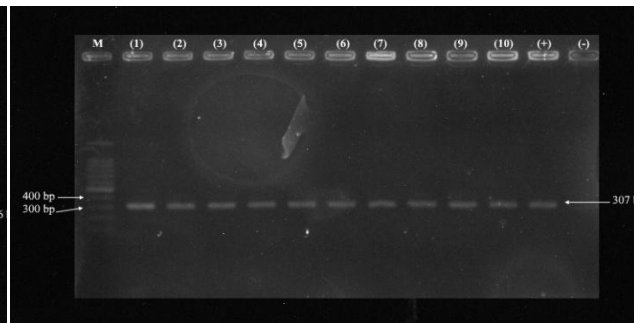
Hình ảnh điện di E4E5 (645bp)



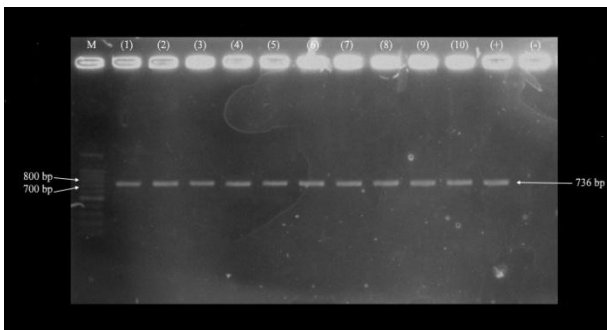
Hình ảnh điện di Exon 6 (476bp)



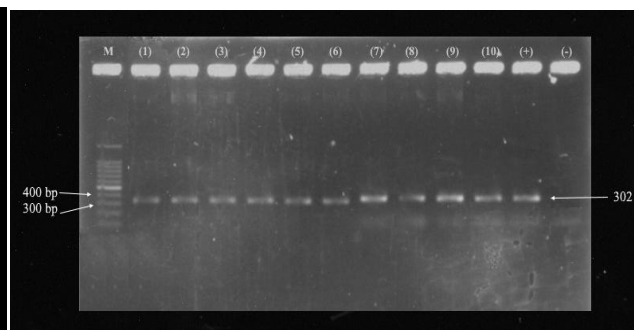
Hình ảnh điện di Exon 7 (307bp)



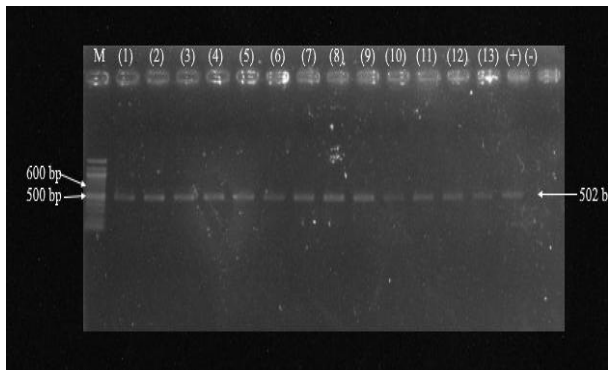
Hình ảnh điện di Exon 8 (736bp)



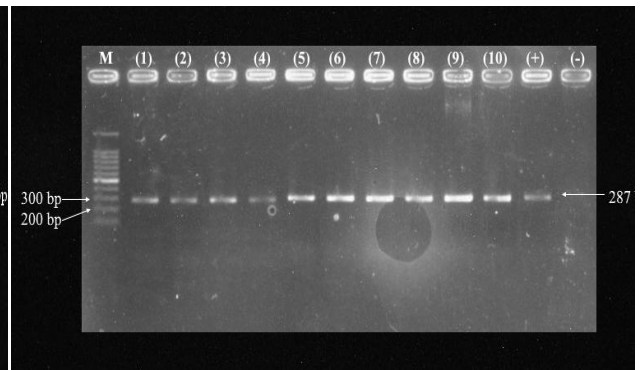
Hình ảnh điện di Exon 9 (302bp)



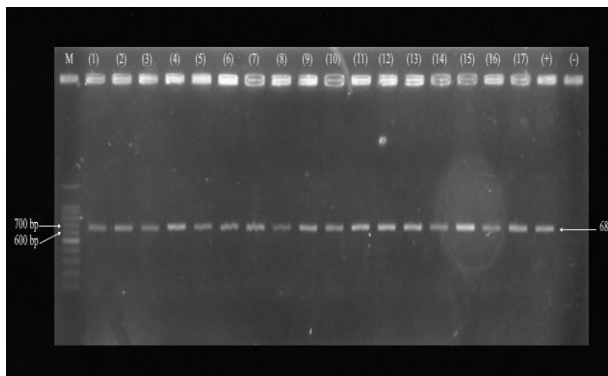
Hình ảnh điện di Exon 10 (502bp)



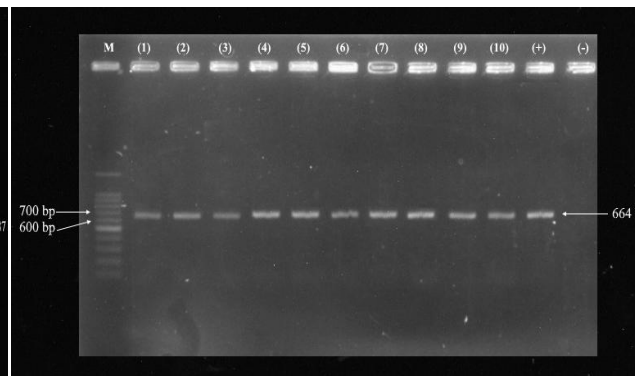
Hình ảnh điện di Exon 11 (287bp)



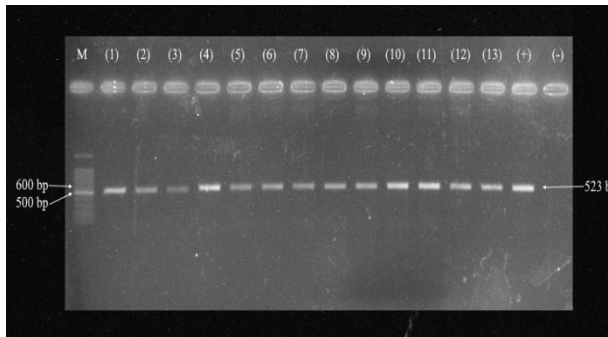
Hình ảnh điện di Exon 12 (687bp)



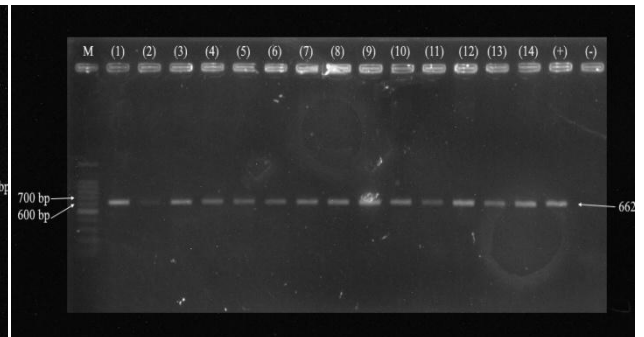
Hình ảnh điện di Exon 13 (664bp)



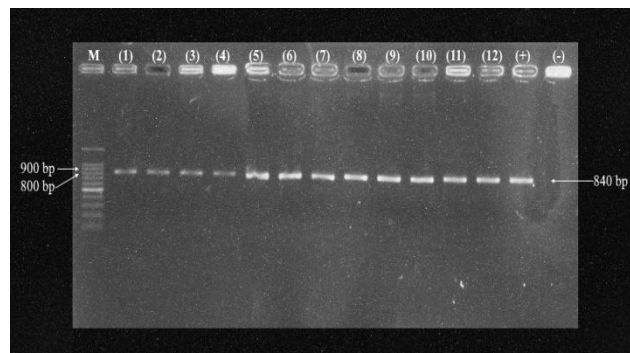
Hình ảnh điện di Exon 14 (523bp)



Hình ảnh điện di Exon 15 (662bp)



Hình ảnh điện di Exon 16 (840bp)



## PHỤ LỤC 8

*Bảng tổng hợp các đột biến và SNP của gen CDHI được tìm thấy trong nghiên cứu*

Mã BN	Exon/ Intron	Đột biến/SNP	n	Thể đột biến	Chú thích	Ý nghĩa
<b>B04</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	<b>E5</b>	<b>c.639 G&gt;A (p.W213*)</b>		<b>Dị hợp</b>	<b>Mới</b>	<b>Gây bệnh</b>
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B151</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	<b>E13</b>	<b>c.1990A&gt;C (p. K664Q)</b>		<b>Dị hợp</b>	<b>Mới</b>	<b>Chưa rõ</b>
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B532</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	I7	c.1008+131 delGinsATC		-	-	Chưa rõ
	<b>E9</b>	<b>c.1298 A&gt;G (D433G)</b>		<b>Dị hợp</b>	<b>Mới</b>	<b>Chưa rõ</b>
	I11	c.1711+47G>A (rs35667437)		Dị hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B732</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	I7	c.1008+131 delGinsATC		-	Mới	Chưa rõ
	<b>I12</b>	<b>c.1937-13T&gt;C</b>		<b>Dị hợp</b>	<b>DV</b>	<b>Gây bệnh</b>
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B144</b> <b>B158</b> <b>B169</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	3	Đồng hợp	SNP	Lành tính
I11	c.1711+47G>A (rs35667437)	Dị hợp		SNP	Lành tính	
E13	c.2076 T>C (rs1801552)	Dị hợp		SNP	Lành tính	
<b>B729</b> <b>B738</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	2	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	I7	c.1008+131 delGinsATC		-	Mới	Chưa rõ
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Dị hợp	SNP	Lành tính
	E16	*54 C>T (rs1801026)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B284</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Dị hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Đồng hợp	SNP	Lành tính
	E14	c.2253 C>T (rs33964119)		Dị hợp	SNP	Lành tính
	E16	*54 C>T (rs1801026)		Đồng hợp	SNP	Lành tính
<b>B725</b>	E8	c.1020 G>A (rs61747632)	1	Dị hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Đồng hợp	SNP	Lành tính
	I13	c.2164+17dupA (rs34939176)			SNP	Lành tính

	E14	c.2253 C>T (rs33964119)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B39</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	I7	c.1008+131 delGinsATC		-	Mới	Chưa rõ
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B295</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Dị hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Đồng hợp	SNP	Lành tính
	E16	*54 C>T (rs1801026)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B718</b>	E13	c.2076 T>C (rs1801552)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	E14	c.2253 C>T (rs33964119)		Dị hợp	SNP	Lành tính
	E16	*54 C>T (rs1801026)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B730</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Dị hợp	SNP	Lành tính
	I11	c.1712-54dupT		-	Mới	Chưa rõ
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Đồng hợp	SNP	Lành tính
<b>B733</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	I11	c.1711+47G>A (rs35667437)		Dị hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Đồng hợp	SNP	Lành tính
<b>B734</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Đồng hợp	SNP	Lành tính
	I13	c.2165-15C>A(rs552874184)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B737</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Đồng hợp	SNP	Lành tính
	E16	*54 C>T (rs1801026)		Đồng hợp	SNP	Lành tính
<b>B285,B308 B717,B720 B726,B731</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	6	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Đồng hợp	SNP	Lành tính
<b>B277,B341 B519,B163 B735</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	5	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B367,B486 B719,B728</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	4	Dị hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2076 T>C (rs1801552)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B445</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	E14	c.2253 C>T (rs33964119)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B668</b>	E13	c.2076 T>C (rs1801552)	1	Dị hợp	SNP	Lành tính
	I11	c.1711+47G>A (rs35667437)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B723</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Dị hợp	SNP	Lành tính



	I7	c.1008+131 delGinsATC		-	Mới	Chưa rõ
<b>B193,B462 B551,B736</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	4	Đồng hợp	SNP	Lành tính
<b>B38 B724</b>	E13	c.2076 T>C (rs1801552)	2	Đồng hợp	SNP	Lành tính
<b>B279</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B22</b>	E13	c.2076 T>C (rs1801552)	1	Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>B722</b>	I1	c.48+6 C>T (rs3743674)	1	Đồng hợp	SNP	Lành tính
	E13	c.2103 C>T (rs730881656)		Dị hợp	SNP	Lành tính
<b>Tổng</b>			45			