

BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ TÌNH TRẠNG ĐỘT BIẾN GENE *TERT* PROMOTER Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ TUYẾN GIÁP THỂ BIỆT HÓA KHÁNG IÓT PHÓNG XẠ BẰNG PHƯƠNG PHÁP REAL-TIME PCR

Lê Thị Tuyết Nhung^{1,2}, *Lê Ngọc Hà*³, *Hoàng Văn Tổng*⁴
*Đào Phương Giang*⁵, *Nghiêm Xuân Hoàn*^{6*}

Tóm tắt

Mục tiêu: Tối ưu phương pháp real-time PCR phát hiện đột biến vùng khởi động gene telomerase reverse transcriptase (*TERT*) promoter và đánh giá bước đầu tỷ lệ đột biến này trên bệnh nhân (BN) ung thư tuyến giáp thể biệt hóa kháng iốt phóng xạ (radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer - RAIR-DTC) tại Việt Nam. **Phương pháp nghiên cứu:** Phương pháp real-time PCR được thiết kế đặc hiệu để phát hiện hai đột biến *TERT* promoter, kiểm chứng bằng phương pháp Sanger sequencing trên 20 mẫu mô đúc khối nền (formalin-fixed paraffin-embedded - FFPE). Sau đó, phương pháp này được áp dụng để khảo sát tình trạng đột biến trên 30 BN RAIR-PTC điều trị tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. **Kết quả:** Phương pháp real-time PCR cho độ nhạy 90% và độ đặc hiệu 100%. Trong 30 BN RAIR-PTC, tỷ lệ đột biến *TERT* promoter là 43,3%. Sự hiện diện đột biến có mối liên quan ý nghĩa với độ tuổi ≥ 55 ($p = 0,012$) và nồng độ Tg huyết thanh trước điều trị > 10 ng/mL ($p = 0,007$), cho thấy giá trị tiên lượng xấu. **Kết luận:** Phương pháp real-time PCR thiết lập có độ chính xác cao, phù hợp ứng dụng trong thực hành lâm sàng. Tỷ lệ đột biến cao và mối liên hệ với các yếu tố tiên lượng bất lợi khẳng định vai trò tiềm năng của đột biến *TERT* promoter trong tiên lượng và định hướng điều trị cá thể hóa cho BN RAIR-DTC.

Từ khóa: Đột biến gene *TERT* promoter; Ung thư tuyến giáp thể biệt hóa kháng iốt phóng xạ; Ung thư tuyến giáp thể biệt hóa; Phương pháp real-time PCR; Dấu ấn phân tử.

¹Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

²Trung tâm Ung bướu, Bệnh viện 198 - Bộ Công an

³Khoa Y học hạt nhân, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

⁴Viện nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

⁵Trung tâm tư vấn Di truyền và Sàng lọc sớm Ung thư, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

⁶Phòng Khoa học Quân sự, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

*Tác giả liên hệ: Nghiêm Xuân Hoàn (nghiemxuanhoan@gmail.com)

Ngày nhận bài: 14/6/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 12/8/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i7.1397>

PRELIMINARY EVALUATION OF *TERT* PROMOTER MUTATIONS IN RADIOIODINE-REFRACTORY DIFFERENTIATED THYROID CANCER USING REAL-TIME PCR

Abstract

Objectives: To establish and optimize a reliable real-time PCR method for detecting telomerase reverse transcriptase (*TERT*) promoter mutations and to preliminarily evaluate the mutation prevalence in Vietnamese radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer (RAIR-DTC) patients. **Methods:** A real-time PCR assay was designed using specific primers and dual-labeled probes targeting *TERT* promoter mutations. The method was validated against Sanger sequencing on FFPE samples from 20 confirmed cases. The validated protocol was then applied to analyze *TERT* promoter mutation status in 30 RAIR-DTC patients treated at 108 Military Central Hospital. **Results:** The real-time PCR method demonstrated 90% sensitivity and 100% specificity in comparison with Sanger sequencing. Among the 30 RAIR-DTC patients, the *TERT* promoter mutation rate was 43.3%. The presence of mutations was significantly associated with age ≥ 55 years ($p = 0.012$) and pre-therapeutic serum Tg > 10 ng/mL ($p = 0.007$), indicating a potential link to poor prognosis. **Conclusion:** The established real-time PCR assay is a sensitive and specific method for detecting *TERT* promoter mutations in clinical samples. The high mutation rate and its correlation with unfavorable clinical features suggest that *TERT* promoter status may serve as a valuable prognostic biomarker, aiding in the personalization of treatment strategies for RAIR-DTC patients.

Keywords: *TERT* promoter mutation; Radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer; Differentiated thyroid carcinoma; Real-time PCR; Molecular biomarker.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư tuyến giáp thể biệt hóa (UTTGBH) chiếm tỷ lệ cao nhất (80 - 85%) trong ung thư tuyến giáp và thường có tiên lượng tốt [1]. Tuy nhiên, khoảng 10 - 30% BN sẽ tiến triển thành RAIR-DTC dẫn tới tình trạng điều trị thất bại và tiên lượng rất xấu với tỷ lệ sống thêm 10 năm chỉ dưới 10% [2]. Nghiên cứu về cơ chế phân tử của

RAIR-DTC với nhiều đột biến gene được xác định là có liên quan tới khả năng kháng iốt và tiên lượng xấu [3]. Một trong số đó là đột biến vùng khởi động của gene *TERT* promoter. Các nghiên cứu đã chứng minh đột biến *TERT* promoter (đặc biệt là các đột biến tại vị trí C228T và C250T) có tần suất cao trong UTTGBH và liên quan tới các đặc điểm lâm sàng bất lợi, nguy cơ tái

phát cao, di căn xa và giảm khả năng đáp ứng với liệu pháp iốt phóng xạ [4]. Vì vậy, việc thiết lập và chuẩn hóa một phương pháp phát hiện đột biến gene *TERT* promoter chính xác, tin cậy và có tính ứng dụng cao là cần thiết. Hơn nữa, việc đánh giá bước đầu về tần suất đột biến này trên nhóm ung thư tuyến giáp ở Việt Nam sẽ cung cấp thêm dữ liệu cơ sở quan trọng, là tiền đề cho các nghiên cứu mở rộng về sau, giúp hoàn thiện các phác đồ điều trị cá thể hóa cho người bệnh RAIR-DTC tại Việt Nam. Tuy nhiên, các nghiên cứu về vấn đề này còn nhiều hạn chế. Từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với tiêu đề "Bước đầu đánh giá tình trạng đột biến gene *TERT* promoter ở BN RAIR-DTC bằng phương pháp real-time PCR" nhằm: *Góp phần nâng cao chất lượng chẩn đoán, tiên lượng và điều trị UTTGBH tại Việt Nam.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 30 BN được chẩn đoán là RAIR-DTC điều trị và quản lý tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

* *Tiêu chuẩn lựa chọn*: Chẩn đoán mô bệnh học sau phẫu thuật cắt toàn bộ tuyến giáp là UTTGBH theo tiêu chuẩn của WHO (2022); có đặc điểm kháng iốt phóng xạ theo Hướng dẫn ATA (2015); có mẫu bệnh phẩm hạch tái phát

hoặc di căn vùng cổ được bảo quản dưới dạng FFPE.

* *Tiêu chuẩn loại trừ*: Các dạng ung thư tuyến giáp không phải thể biệt hóa; mắc kèm theo các bệnh ung thư khác; thiếu thông tin lâm sàng đầy đủ hoặc không đồng ý tham gia.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế và tối ưu hóa phương pháp xét nghiệm phát hiện đột biến gene *TERT* promoter bằng real-time PCR*:

- Thiết kế Primer và Probe:

Primer và Probe được thiết kế đặc hiệu để phát hiện hai đột biến C228T và C250T ở vùng promoter của gene *TERT*:

Primer Forward:

5'-CCTGCCCCCTTCACCTTCCAG-3'

Primer Reverse:

5'-AGAGCGGAAAGGAAGGGGA-3'

Probe mutant:

5'-FAM/CCC+C+T+T+CCGG/3IABkFQ/-3'

Probe wild-type:

5'-HEX/CCC+C+C+T+CCGG/3IABkFQ/-3'

- Chuẩn bị mẫu DNA: DNA được chiết xuất từ mẫu mô FFPE bằng bộ kit GeneJET FFPE DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Nồng độ DNA được đo và hiệu chỉnh về 50 ng/mẫu để đưa vào phản ứng.

- Tối ưu hóa các điều kiện phản ứng real-time PCR: Các thành phần của phản ứng và điều kiện nhiệt được tối ưu hóa để đạt hiệu quả khuếch đại cao và độ đặc hiệu tốt nhất.

Bảng 1. Các thông số tối ưu của phản ứng real-time PCR phát hiện đột biến gene *TERT* promoter.

Thành phần phản ứng	Thể tích tối ưu	Nồng độ cuối cùng
DNA mẫu	50ng	-
Primer Forward	0,4 μ M	400nM
Primer Reverse	0,4 μ M	400nM
Probe mutant	0,2 μ M	200nM
Probe wild-type	0,2 μ M	200nM
Q-Solution	1x	-
QuantiTect Probe RT-PCR Mastermix	1x	-
Thể tích phản ứng cuối cùng	20 μ L	-

- Chu kỳ nhiệt tối ưu: Hoạt hóa enzyme ở 95°C trong 15 phút. 50 chu kỳ khuếch đại: Biến tính 94°C trong 30 giây và lai ghép/kéo dài 64°C trong 60 giây. Kết thúc phản ứng: 98°C trong 10 phút.

* *Đánh giá bước đầu hiệu suất, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp real-time PCR:*

Để xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp real-time PCR, nhóm nghiên cứu tiến hành đánh giá trên 20 mẫu bệnh phẩm FFPE đã biết trước tình trạng đột biến (sử dụng phương pháp real-time PCR tiêu chuẩn và được xác nhận lại bằng phương pháp Sanger sequencing).

Sau đó, sử dụng phương pháp real-time PCR mà nhóm tối ưu và thiết lập để đánh giá bước đầu tình trạng đột biến trên một nhóm nhỏ gồm 30 BN ung thư tuyến giáp thể biệt hóa kháng iốt. Mẫu

bệnh phẩm là những mẫu bệnh phẩm hạch tái phát hoặc khối ung thư di căn vùng cổ được lấy sau phẫu thuật.

* *Xử lý số liệu:* Dữ liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS 25.0. Đặc điểm dịch tễ, lâm sàng và phân bố đột biến gene được mô tả dưới dạng tần số, phần trăm, trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD) hoặc trung vị (Median). Kiểm định thống kê phù hợp được sử dụng để phân tích mối liên quan với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

3. Đạo đức nghiên cứu

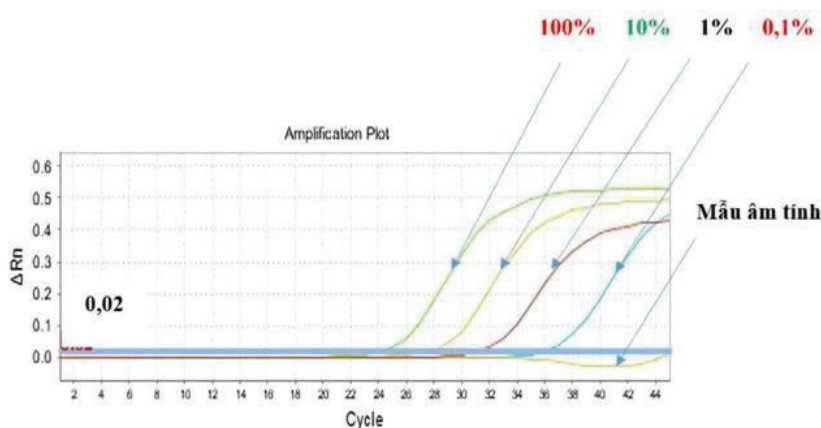
Nghiên cứu được thông qua Hội đồng Đạo đức của Học viện Quân y theo Quyết định số 734/CNChT-HĐĐĐ ngày 31/3/2021. Số liệu nghiên cứu được Bệnh Trung ương Quân đội 108 cho phép cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

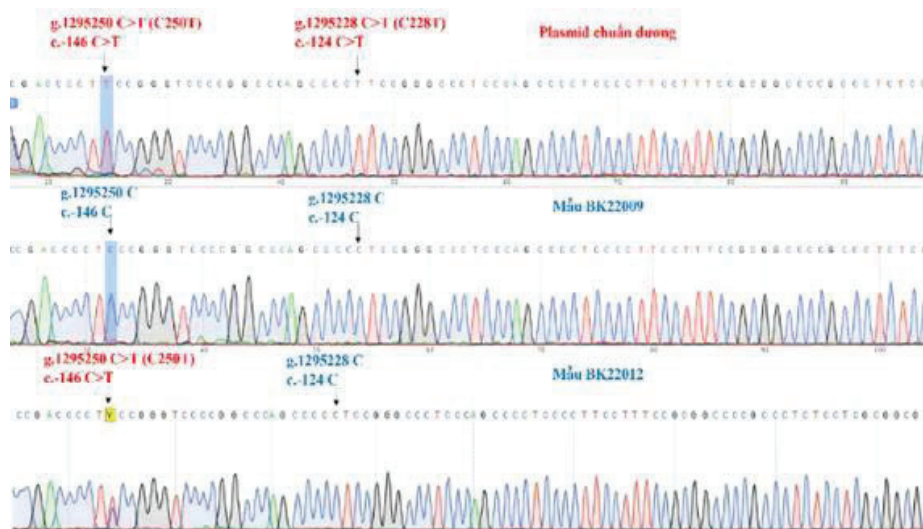
1. Thiết lập phương pháp phát hiện đột biến gene *TERT* promoter bằng kỹ thuật real-time PCR

* Kết quả tối ưu hóa quy trình real-time PCR:

Chúng tôi đã xây dựng và tối ưu hóa thành công phương pháp real-time PCR nhằm phát hiện các đột biến tại vị trí C228T và C250T của vùng promoter gene *TERT* trên các mẫu bệnh phẩm FFPE.



Hình 1. Hình ảnh phản ứng real-time PCR plasmid standard chuẩn dương mang đột biến gene *TERT* C228T và C250T.



Hình 2. Hình ảnh giải trình tự vùng gene khởi động gene *TERT* mẫu đột biến và mẫu thể đại.

** Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp:*

Chúng tôi tiến hành đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu và độ ổn định của phương pháp real-time PCR mới thiết lập trên 20 mẫu DNA được tách chiết từ mô bệnh phẩm FFPE đã biết rõ trạng thái đột biến, trong đó có 10 mẫu dương tính và 10 mẫu âm tính.

Bảng 2. Độ nhạy, độ đặc hiệu và độ ổn định của phương pháp.

Phương pháp	Dương tính	Âm tính	Độ nhạy	Độ đặc hiệu
Đột biến <i>TERT</i> promoter	9	1	90%	100%
Không đột biến <i>TERT</i>	0	10		

Phương pháp real-time PCR mà nhóm nghiên cứu thiết lập có độ nhạy 90%, độ đặc hiệu đạt 100%, chứng tỏ tính ứng dụng tốt, phù hợp cho các xét nghiệm chẩn đoán lâm sàng thường quy.

2. Kết quả bước đầu đánh giá đột biến gene *TERT* promoter trên 30 BN RAIR-PTC

** Đặc điểm chung của BN nghiên cứu:*

Các đặc điểm chung của 30 BN RAIR-PTC được trình bày trong bảng sau:

Bảng 3. Đặc điểm chung của nhóm BN nghiên cứu (n = 30).

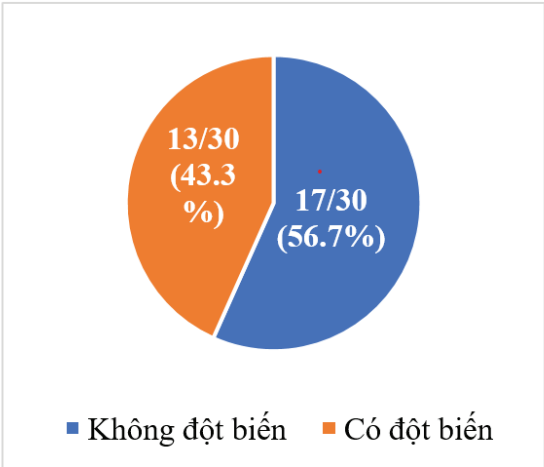
Đặc điểm	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%) hoặc giá trị trung bình
Tuổi (Mean $\pm$ SD)	-	50,67 $\pm$ 12,65
Nam/nữ (%)	10/20	33,3/66,7
Thời gian tái phát trung bình (tháng)	-	36,5 (19,5 - 63,75) (Min - Max: 7 - 210)
Tái phát tại hạch cổ (%)	29	96,7
Di căn xa (%)	4	13,3
Trung vị Tg trước điều trị ¹³¹ I (ng/mL)	-	14,76 (1,89 - 57,21) (Min - Max: 0,01 - 353,5)

BN ung thư tuyến giáp được chẩn đoán ở độ tuổi 50,67 $\pm$ 12,65. Tỷ lệ mắc ở nữ giới cao gấp 2 lần nam giới. Trung vị nồng độ Tg kích thích trước điều trị ¹³¹I lần

đầu là 14,76 ng/mL. BN xuất hiện tái phát, di căn sau khi điều trị thời gian trung bình là 36,5 tháng. Vị trí tái phát thường gặp tại hạch cổ chiếm 96,7%; di căn xa chiếm 13,3%.

** Tỷ lệ và phân bố đột biến gene TERT promoter:*

Kết quả xét nghiệm phát hiện đột biến *TERT* promoter bằng phương pháp real-time PCR trên nhóm 30 BN được thể hiện trong biểu đồ sau:



Hình 3. Tỷ lệ đột biến *TERT* promoter trên BN nghiên cứu (n = 30).

Trong 30 BN được nghiên cứu ban đầu, tỷ lệ đột biến gene *TERT* promoter là 43,3%.

** Mối liên quan giữa đột biến TERT promoter và đặc điểm lâm sàng:*

Chúng tôi đánh giá mối liên quan giữa sự hiện diện của đột biến gene *TERT* promoter và các đặc điểm lâm sàng ở nhóm BN nghiên cứu.

Bảng 4. Mối liên quan giữa đột biến *TERT* promoter với đặc điểm lâm sàng.

Đặc điểm	Có đột biến (n = 13)	Không đột biến (n = 17)	p
Tuổi (≥ 55 tuổi)	9 (69,2%)	4 (23,5%)	0,012
Giới tính (Nam)	6 (46,2%)	4 (23,5%)	0,255
Di căn xa	3 (23,1%)	1 (5,9%)	0,290
Tg huyết thanh (> 10 ng/mL)	11 (84,6%)	6 (35,3%)	0,007

BN mang đột biến *TERT* promoter có liên quan đáng kể đến độ tuổi mắc bệnh ≥ 55 tuổi ($p = 0,012 < 0,05$) và nồng độ Tg huyết thanh cao trước điều trị ^{131}I lần đầu ($p = 0,007 < 0,05$).

BÀN LUẬN

Phương pháp real-time PCR đã được thiết lập thành công với độ chính xác cao. Đánh giá ban đầu trên 30 BN RAIR-DTC cho thấy đột biến *TERT* promoter khá phổ biến và có liên quan rõ rệt tới độ tuổi và nồng độ Tg huyết thanh cao, là cơ sở quan trọng để triển khai kết quả này với số lượng mẫu lớn hơn và tiến tới ứng dụng trong thực tiễn lâm sàng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng và tối ưu hóa thành công phương pháp real-time PCR phát hiện các đột biến phổ biến của gene *TERT* promoter (C228T và C250T). So với các phương pháp xét nghiệm phân tử truyền thống như Sanger sequencing, phương pháp real-time PCR có nhiều ưu điểm nổi bật, đặc biệt là khả năng phát hiện nhanh chóng, độ đặc hiệu cao và hiệu quả về mặt chi phí cũng như thời gian thực hiện. Phương pháp real-time PCR cũng có khả năng thực hiện đồng thời trên số lượng lớn mẫu bệnh phẩm, tiết kiệm đáng kể thời gian và chi phí, rất phù hợp trong điều kiện ở các bệnh viện lớn. Tuy nhiên, phương pháp xét nghiệm này cũng có một số hạn chế cần được cân nhắc. Chất lượng DNA thu được từ các mẫu FFPE thường bị ảnh hưởng bởi tình trạng thoái biến, có thể làm giảm hiệu quả khuếch đại và độ nhạy trong một số trường hợp nhất định. Hơn nữa, dù real-time PCR có ưu thế vượt trội trong phát hiện các đột biến đã

biết trước, phương pháp này lại giới hạn trong việc phát hiện các đột biến mới hoặc hiếm gặp mà không nằm trong phạm vi thiết kế ban đầu. Trong tương lai, việc kết hợp kỹ thuật real-time PCR với các kỹ thuật khác như digital PCR (PCR kỹ thuật số) hoặc giải trình tự thế hệ mới (next generation sequencing - NGS) có thể giúp khắc phục hạn chế này. Đột biến *TERT* promoter được ghi nhận là yếu tố tiên lượng quan trọng, đặc biệt trong các trường hợp RAIR-PTC. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ đột biến *TERT* promoter bước đầu xác định là 43,3%, tương đồng với kết quả của một số nghiên cứu lớn trên thế giới, như nghiên cứu của Liu và CS (Trung Quốc, 2020) [5] báo cáo tỷ lệ từ 30 - 50%, hay nghiên cứu của Melo và CS (Hoa Kỳ, 2014) [6] với tỷ lệ khoảng 40%. Những tương đồng này cho thấy việc sử dụng kỹ thuật real-time PCR để sàng lọc và phát hiện đột biến *TERT* promoter là phù hợp và đáng tin cậy. Phát hiện đột biến *TERT* promoter có ý nghĩa quan trọng trong xác định tiên lượng và xây dựng chiến lược điều trị cá thể hóa cho BN. Các kết quả phân tích trong nghiên cứu này đã cho thấy mối liên quan rõ rệt giữa đột biến *TERT* promoter với độ tuổi cao, tiến triển bệnh và xu hướng di căn xa. Các phát hiện này phù hợp với các kết quả quốc tế đã được công bố và cho thấy giá trị tiên lượng mạnh mẽ của đột biến này. Nhìn chung, việc phát triển

phương pháp xét nghiệm đột biến gene *TERT* promoter tại Việt Nam không chỉ tạo điều kiện thuận lợi cho việc ứng dụng vào thực hành lâm sàng mà còn là cơ sở cho các nghiên cứu nhằm làm rõ đặc điểm di truyền và tiên lượng của ung thư tuyến giáp tại Việt Nam.

KẾT LUẬN

Phương pháp real-time PCR phát hiện đột biến gene *TERT* promoter được thiết kế và tối ưu hóa trong nghiên cứu này cho thấy hiệu quả cao với độ đặc hiệu tuyệt đối và độ nhạy rất tốt, phù hợp ứng dụng trong thực hành chẩn đoán và điều trị lâm sàng. Kết quả bước đầu nghiên cứu trên 30 BN cho thấy tỷ lệ đột biến *TERT* promoter khá cao (43,3%), thể hiện mối liên hệ rõ rệt với các yếu tố tiên lượng xấu ở RAI-DTC. Những kết quả này củng cố thêm giá trị quan trọng của xét nghiệm phát hiện đột biến *TERT* promoter trong quản lý lâm sàng, hỗ trợ định hướng chiến lược điều trị cá thể hóa và nâng cao hiệu quả điều trị ở BN RAI-DTC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Laha D, Nilubol N, Boufraquech M. New therapies for advanced thyroid cancer.

Front Endocrinol (Lausanne). 2020; 11:82. DOI: 10.3389/fendo.2020.00082.

2. Spitzweg C, Bible KC, Hofbauer LC, Morris JCJTID, endocrinology. Advanced radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer: The sodium iodide symporter and other emerging therapeutic targets. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. 2014; 2(10):830-842.

3. Fagin JA, Wells SA, Jr. Biologic and clinical perspectives on thyroid cancer. *N Engl J Med*. Dec 8 2016; 375(23):2307. DOI: 10.1056/NEJMc1613118.

4. Yang X, Li J, Li X, al. e. *TERT* promoter mutation predicts radioiodine-refractory character in distant metastatic differentiated thyroid cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2017; 58(2):258-265.

5. Liu J, Liu R, Shen X, Zhu G, Li B, Xing MJJoNM. The genetic duet of BRAF V600E and *TERT* promoter mutations robustly predicts loss of radioiodine avidity in recurrent papillary thyroid cancer. 2020; 61(2):177-182.

6. Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, et al. *TERT* promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. 2014; 99(5):E754-E765.