

MỐI LIÊN HỆ GIỮA ĐỘT BIẾN GEN PROC VÀ NỒNG ĐỘ PROTEIN C HUYẾT TƯƠNG Ở BỆNH NHÂN HUYẾT KHỐI TÍNH MẠCH SÂU VÔ CĂN

Đỗ Đức Minh¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Yếu tố di truyền đóng một vai trò quan trọng trong bệnh lý thuyên tắc huyết khối tĩnh mạch. Ở người châu Á, các bất thường đông máu có tính di truyền liên quan đến bất thường protein C khá phổ biến. Thông qua nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát các bất thường của gen PROC và sự thay đổi nồng độ protein C trên bệnh nhân huyết khối tĩnh mạch sâu (HKTMS) vô căn người Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp: 50 đối tượng được chẩn đoán HKTMS vô căn được giải trình tự toàn bộ các exon mã hoá và vùng intron lân cận của gen PROC và định lượng nồng độ protein C trong huyết tương.

Kết quả: Chúng tôi phát hiện 17/50 bệnh nhân tham gia nghiên cứu có đột biến gen PROC. Biến thể thường gặp nhất là đột biến c.565C>T (p.R189W). Ngoài ra, đột biến c.577_579delAAG (p.K193del) không có liên quan đến tình trạng giảm nồng độ protein C.

Kết luận: Đột biến gen PROC được phát hiện ở 34% bệnh nhân HKTMS vô căn và không có mối liên quan giữa tình trạng đột biến và nồng độ protein C huyết tương.

Từ khóa: huyết khối tĩnh mạch sâu, gen PROC, protein C

ABSTRACT

ASSOCIATION BETWEEN PROC MUTATIONS AND PLASMA PROTEIN C CONCENTRATION IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC VENOUS THROMBOSIS

Do Duc Minh

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 25 - No. 2 - 2021: 239 - 244

Background: Genetic factors play important role pathophysiology of venous thrombo-embolism. It has been reported that PROC mutations were the major genetic disorder in Asian patients with venous thrombosis. The aim of this study was to assess plasma protein C concentration together with mutational status of PROC gene in Vietnamese patients diagnosed with idiopathic deep venous thrombosis.

Objectives and methods: All coding exons and flanking intron regions of PROC gene were sequenced and protein C concentration was quantified in 50 Vietnamese patients diagnosed with idiopathic deep venous thrombosis.

Results: Mutations of PROC were detected in 17 out of 50 participants. The most prevalent mutation was c.565C>T (p.R189W) while the mutation c.577_579delAAG (p.K193del) was not associated with lower plasma protein C level.

Conclusion: Mutations of PROC contributed to 34% of idiopathic deep venous thrombosis etiology and the association between mutational status and plasma protein C concentration was not statistical significance in this study.

Keywords: venous thrombosis, PROC gene, mutation, protein C

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự bất thường di truyền dẫn đến thiếu hụt

protein S, protein C là các yếu tố nguy cơ đã được mô tả rõ trong bệnh lý huyết khối tĩnh

¹Trung tâm Y sinh học phân tử, ĐHY Dược TP. Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: TS. Đỗ Đức Minh ĐT: 0932 999989

Email: ducminh@ump.edu.vn

mạch sâu (HKTMS)^(1,2). Tuy nhiên, ở quần thể người da trắng, các bất thường di truyền chính liên quan đến HKTMS bao gồm yếu tố V Leiden và prothrombin G20210A⁽³⁾. Trong hai bất thường di truyền này, yếu tố V Leiden hoàn toàn không xuất hiện trong quần thể bệnh nhân HKTMS Việt Nam qua nghiên cứu của tác giả Hoàng Anh Vũ⁽⁴⁾. Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy ở các chủng tộc khác nhau, đột biến di truyền liên quan đến bệnh lý HKTMS có nhiều sự phân bố khác biệt⁽⁵⁾. Gần đây, các đột biến trên gen *PROC* bao gồm p.R189W, p.K193del và p.R211W là các đột biến phổ biến nhất ở dân số HKTMS Thái Lan, Trung Quốc và Hàn Quốc^(6,7).

Các đột biến trên gen *PROC* thường dẫn đến tình trạng thiếu hụt các sản phẩm protein đích phục vụ cho quá trình đông máu là protein C. Protein C là một enzyme serine protease tiền thân của protein C hoạt hóa (APC: activated protein C). Protein C được hoạt hóa nhờ thrombin xảy ra tại bề mặt màng trong của tế bào và cần sự tham gia của thrombomodulin và thụ thể của protein C trên tế bào nội mạc mạch máu. Cùng với sự tham gia của protein S (như là một cofactor), phospholipid và calcium, APC bất hoạt các yếu tố Va và VIIIa bằng cách cắt các phân tử này tại các vị trí amino acid arginine đặc hiệu. Chỉ có protein S tự do (khoảng 40% protein S tổng số) tham gia vào quá trình này như một cofactor của protein C. Hàm lượng protein C trong máu thấp được mô tả bởi Griffin vào năm 1981^(8,9). Sự thiếu hụt protein này liên quan đến tình trạng tái phát bệnh HKTMS. Sự thiếu hụt protein này được di truyền theo kiểu di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường. Trong phần lớn trường hợp, yếu tố gây bệnh là một đột biến dị hợp tử. Thiếu hụt protein C do các đột biến đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép hiếm gặp và thường gây huyết khối tối cấp, biểu hiện vài giờ sau khi sinh và có thể dẫn đến tử vong ở trẻ em.

Thiếu hụt protein C được phân thành 2 dạng: dạng I thể hiện qua sự giảm hàm lượng protein C trong máu và hoạt tính protein C cũng

giảm, dạng II thể hiện qua sự giảm hoạt tính protein C mà không giảm nồng độ protein C trong máu⁽¹⁰⁾. Vì có nhiều dạng bất thường liên quan đến rối loạn protein C nên các xét nghiệm định lượng protein C trong máu người bệnh HKTMS có thể cho kết quả âm tính giả. Ngoài ra, một nghiên cứu còn cho thấy tính phức tạp của bệnh lý HKTMS do di truyền khi cùng một đột biến gen *PROC* trong gia đình lại dẫn đến nhiều mức độ rối loạn đông máu khác nhau⁽¹¹⁾. Chính vì những hạn chế này, việc thực hiện giải trình tự gen nhằm xác định các đột biến trên gen *PROC* đồng thời với định lượng nồng độ protein C của bệnh nhân không chỉ có ý nghĩa trong việc chẩn đoán nguyên nhân mà còn đóng góp rất lớn cho quá trình tư vấn di truyền cho dân số có nguy cơ di truyền cao mắc HKTMS.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân HKTMS thỏa tiêu chuẩn chẩn đoán của hiệp hội tim mạch Châu Âu⁽¹²⁾, với các triệu chứng lâm sàng đặc trưng như đau, đỏ, sưng phù chi dưới được chẩn đoán xác định bằng siêu âm Doppler mạch máu, sẽ được thu thập các thông tin lâm sàng có liên quan đến bệnh lý bao gồm tuổi, giới, tiền căn gia đình, vị trí bị HKTMS.

Tiêu chuẩn loại trừ

Các bệnh nhân có yếu tố nguy cơ gây HKTMS bao gồm:

- Gãy xương lớn (chậu, đùi....).
- Thay khớp gối hay khớp háng.
- Vừa trải qua phẫu thuật lớn.
- Chấn thương.
- Chấn thương cột sống.
- Đang có bệnh lý ác tính.
- Đang hóa trị.
- Đang điều trị liệu pháp hormon.
- Đang uống thuốc ngừa thai.
- Nằm bất động trên giường >3 ngày.
- Béo phì.
- Có thai.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu cắt ngang mô tả.

Cỡ mẫu

50 bệnh nhân HKTMS thỏa tiêu chuẩn chọn và tiêu chuẩn loại trừ

Phương pháp thực hiện

Giải trình tự gen PROC

Quy trình giải trình tự gen PROC đã được nghiên cứu và chuẩn hóa trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi⁽¹³⁾ với các bước:

- Tách chiết DNA bộ gene:

Bệnh nhân được thu thập lấy 2 ml máu tĩnh mạch, cho vào ống chống đông có EDTA, lắc đều nhẹ nhàng. Genomic DNA của các tế bào bạch cầu trong máu toàn phần được tách chiết bằng bộ kit GeneJet™ whole blood genomic DNA purification (Thermo Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

- Phản ứng PCR khuếch đại và giải trình tự gen mục tiêu:

Điều kiện và cặp mồi cho phản ứng PCR và giải trình tự gen của toàn bộ các exon và vùng lân cận trên gen PROC đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi.

- Phân tích kết quả:

Kết quả giải trình tự được xem là có bất thường khi có sự thay đổi các nucleotide so với trình tự tiêu chuẩn của gen PROC mang mã số NG_016323.1 trong kho dữ liệu của Genbank.

Định lượng nồng độ protein C huyết tương

Nồng độ protein C huyết tương được định lượng bằng bộ kit Human Protein C ELISA Kit (Abcam, Cambridge, Anh) bằng kỹ thuật ELISA theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

Định nghĩa các biến số

Tuổi và nồng độ protein C huyết tương là các biến liên tục, được mô tả bằng trung bình và độ lệch chuẩn.

Giới, vị trí HKTMS, tiền căn gia đình và kết quả đột biến gen PROC là các biến định tính,

được biểu diễn bằng tỷ lệ phần trăm.

Phân tích thống kê

Các số liệu sau đó sẽ được phân tích với các phép kiểm thống kê là t-test và chi bình phương với ngưỡng giá trị p được xem là có ý nghĩa thống kê khi bé hơn hoặc bằng 0,05.

Ý đức

Nghiên cứu đã được sự chấp thuận của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, số 452/ĐHYD-HĐĐĐ ngày 18 tháng 12 năm 2018.

KẾT QUẢ

Các đặc điểm cơ bản của bệnh nhân tham gia nghiên cứu

Chúng tôi đã tiến hành chọn được 50 bệnh nhân được chẩn đoán HKTMS phù hợp với tiêu chuẩn chọn mẫu với đầy đủ các thông tin lâm sàng và cận lâm sàng

Các đặc điểm cơ bản của 50 bệnh nhân được chẩn đoán HKTMS tham gia nghiên cứu được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của 50 bệnh nhân HKTMS

Đặc điểm	Giá trị
Tuổi (TB ± ĐLC)	44,9 ± 14,9
Giới	
Nam (%)	30%
Nữ (%)	70%
Chân bị HKTMS	
Chân P	36%
Chân T	54%
Hai chân	10%
Tiền căn gia đình	
Có	8%
Không	92%
Nồng độ protein C (g/L) (TB ± ĐLC)	1,7 ± 1,4
Kết quả đột biến gen PROC	
Có	34%
Không	66%

Các đột biến gen PROC và nồng độ protein C huyết tương của bệnh nhân HKTMS

Kết quả giải trình tự toàn bộ các exon mã hoá và vùng intron lân cận gen PROC của 50 bệnh nhân HKTMS cho thấy có 4 loại đột biến được phát hiện trên 17 bệnh nhân bao gồm 11 bệnh

nhân mang biến thể dị hợp tử c.565C>T, 2 bệnh nhân mang biến thể c.565C>T đồng hợp tử, 2 bệnh nhân mang biến thể c.577_579delAAG (p.K193del), 1 bệnh nhân mang biến thể c.323A>C (p.H108P) và một bệnh nhân mang biến thể c.532G>C (p.A178P). Kết quả đột biến và nồng độ protein C tương ứng được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2: Tình trạng đột biến gen PROC và nồng độ protein C huyết tương tương ứng của 17 bệnh nhân có đột biến gen PROC

Bệnh nhân	Tình trạng đột biến gen PROC	Nồng độ protein C (g/L) (bình thường: 1,20 – 5,00)
HK06	c.565C>T (p.R189W)	4,14
HK07	c.565C>T (p.R189W)	2,02
HK08	c.565C>T (p.R189W)	2,15
HK11	c.565C>T (p.R189W)	0,95
HK14	c.565C>T (p.R189W) đồng hợp tử	0,00
HK16	c.565C>T (p.R189W)	0,00
HK18	c.565C>T (p.R189W)	0,00
HK21	c.565C>T (p.R189W)	0,64
HK22	c.323A>C (p.H108P)	1,46
HK24	c.532G>C (p.A178P)	1,57
HK27	c.565C>T (p.R189W)	0,48
HK35	c.565C>T (p.R189W) đồng hợp tử	0,00
HK40	c.del577_579AAG (p.K193del)	4,22
HK43	c.del577_579AAG (p.K193del)	4,54
HK45	c.565C>T (p.R189W)	3,66
HK48	c.565C>T (p.R189W)	1,44
HK49	c.565C>T (p.R189W)	0,00

Có thể nhận thấy hầu hết các đột biến trên gen PROC đều có liên quan đến tình trạng giảm nồng độ protein C hoặc nồng độ protein C ở gần mức giới hạn dưới. Tình trạng đột biến đồng hợp tử c.565C>T (p.R189W) có liên quan chặt chẽ với việc thiếu hụt toàn bộ protein C. Tuy nhiên vẫn có một số bệnh nhân mang đột biến c.del577_579AAG (p.K193del) có nồng độ protein C trong giới hạn bình thường.

Mối liên hệ giữ tình trạng đột biến gen PROC và các yếu tố liên quan

Chúng tôi tiến hành so sánh các biến số lâm sàng cũng như cận lâm sàng ở 2 nhóm bệnh

nhân có và không có mang đột biến gen PROC. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3: Mối liên quan giữa tình trạng đột biến gen và các yếu tố liên quan

Biến số	Nhóm có đột biến (N=17)	Nhóm không đột biến (N=33)	Trị số p
Tuổi (TB ± ĐLC)	36,9 ± 14,7	49,1 ± 14,1	0,004
Giới			
Nam	6	9	0,56
Nữ	11	24	
Chân bị HKTMS			
Chân P	5	12	0,87
Chân T	10	18	
Hai chân	2	3	
Tiền căn gia đình			
Có	2	3	0,77
Không	15	30	
Nồng độ protein C (g/L) (TB ± ĐLC)	1,69 ± 1,5	1,36 ± 1,5	0,23

Có thể thấy các bệnh nhân HKTMS có bất thường gen PROC có độ tuổi khởi phát bệnh sớm hơn có ý nghĩa thống kê so với người không mang đột biến. Ngoài ra, các yếu tố như giới tính, vị trí huyết khối, tiền sử gia đình và nồng độ protein C khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm bệnh nhân.

BÀN LUẬN

Trong tổng số 50 bệnh nhân tham gia nghiên cứu, số bệnh nhân có mang đột biến gen PROC là 17 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 34%. Kết quả đột biến gen chủ yếu xảy ra ở 2 vị trí là c.565C>T (p.R189W) và c.del577_579AAG (p.K193del). Protein C được cấu thành từ một domain giàu γ -carboxyglutamic acid (Gla), domain EGF (epidermal growth factor)-like, một cuối pep tide kích hoạt ngắn và vùng domain serine protease.

Đột biến gây bệnh phổ biến phát hiện trong quần thể bệnh nhân nghiên cứu là đột biến c.565C>T (p.R189W), với tần suất 76% cho gen PROC và 26% cho toàn bộ dân số nghiên cứu. Đây là một đột biến gây bệnh phổ biến đã được báo cáo trên quần thể bệnh nhân Châu Á, bao gồm Thái Lan và Trung Quốc^(14,15). Trong các đột biến này, đặc biệt có hai bệnh nhân mang đột biến p.R189W dưới dạng đồng hợp tử. Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy người

mang biến thể đồng hợp tử sẽ có nồng độ protein C thấp hơn so với dị hợp tử. Đột biến p.R189W nằm trong vùng bám của APC với yếu tố Va và rất có thể thay đổi cấu trúc tại vị trí này làm cho khả năng bám của APC không còn hiệu quả dẫn đến kiểu hình HKTMS⁽¹⁶⁾. Ngoài ra, chúng tôi còn phát hiện các bất thường di truyền bao gồm c.del577_579AAG (p.K193del), c.323A>C (p.H108P), c.532G>C (p.A178P). Trong các bất thường di truyền này, đột biến tại các vị trí codon 178 đã được mô tả là các đột biến gây bệnh, ảnh hưởng đến chức năng của Protein C⁽¹⁷⁾. Trong khi đó, đột biến c.del577_579AAG là một đột biến phổ biến liên quan đến HKTMS và cả thuyên tắc phổi đã được mô tả rõ trên quần thể người Trung Quốc trước đây^(14,18). Một điểm lý thú đối với đột biến này là nó không ảnh hưởng đến nồng độ protein C cũng như hoạt tính của protein C, sự tương quan này cũng được quan sát thấy trên các bệnh nhân mang đột biến này tại Nhật Bản và Trung Quốc^(19,20). Điều này một lần nữa cho thấy sự hạn chế của việc chỉ đo nồng độ protein C trong chẩn đoán nguyên nhân HKTMS vì nó có khả năng dẫn đến âm tính giả và giải thích được lý do tại sao không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê nồng độ protein C giữa 2 nhóm bệnh nhân có và không có mang đột biến gen PROC. Cuối cùng, đột biến c.323A>C (p.H108P) là một đột biến mới lần đầu tiên được mô tả trong nghiên cứu này. Đột biến thay thế histidine tại codon 108 bằng acid aspartic đã được báo cáo là làm giảm quá trình sinh tổng hợp, bài tiết và tính ổn định của protein C⁽²¹⁾. Chúng tôi đã dùng 2 phần mềm dự đoán là SIFT và Polyphen-2 để dự đoán khả năng gây bệnh của biến thể p.H108P và các chỉ số dự đoán của SIFT và Polyphen-2 lần lượt là 0.14 (dung nạp) và 0.94 (có thể tổn thương)^(22,23).

Như vậy có thể thấy, đối với gen PROC, người Việt Nam có mang một đột biến hot spot đó là p.R189W, điều này gợi ý cho việc thiết kế một phản ứng PCR nhằm phát hiện nhanh đột biến này trên quần thể người Việt Nam khi cần

tầm soát nguyên nhân di truyền của bệnh lý HKTMS.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu này cho thấy đột biến gây bệnh trên gen PROC là phổ biến ở các bệnh nhân HKTMS vô căn, trong đó, đột biến c.565C>T (p.R189W) là một đột biến có tần suất xuất hiện cao. Từ đó, chúng tôi đề xuất xây dựng quy trình PCR phát hiện nhanh đột biến này để làm công cụ tầm soát bất thường di truyền cho các bệnh nhân HKTMS vô căn Việt Nam

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. osendaal FR, Reitsma PH (2009). Genetics of venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 7(S1):301-304.
2. Seligsohn U, Zivelin A (1997). Thrombophilia as a multigenic disorder. *Thromb Haemost*, 78(1):297-301.
3. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, Leone G (2002). Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. *Haematologica*, 87(10):1095-1108.
4. Hoàng Anh Vũ, Nguyễn Đức Bách, Phạm Văn Dũng, Nguyễn Hoài Nam (2014). Khảo sát yếu tố V Leiden trên bệnh nhân huyết khối tĩnh mạch. *Y học Thành Phố Hồ Chí Minh*, 18(5):124-129.
5. International HapMap Consortium (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063):1299-1320.
6. Kimura R, Honda S, Kawasaki T, et al (2006). Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood*, 107(4):1737-1738.
7. Kim HJ, Seo JY, Lee KO, et al (2014). Distinct frequencies and mutation spectrums of genetic thrombophilia in Korea in comparison with other Asian countries both in patients with thromboembolism and in the general population. *Haematologica*, 99(3):561-569.
8. Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO (2012). Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol*, 95(4):333-345.
9. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT (1984). Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest*, 74(6):2082-2088.
10. Broekmans AW (1985). Hereditary protein C deficiency. *Haemostasis*, 15(4):233-240.
11. Gandrille S, Jude B, Alhenc-Gelas M, Millaire A, Aiach M (1993). Compound heterozygosity in a family with protein C deficiency illustrating the complexity of the underlying molecular mechanism. *Thromb Haemost*, 70(5):747-752.
12. Mazzolai L, Aboyans V, Ageno W, et al (2018). Diagnosis and management of acute deep vein thrombosis: a joint consensus document from the European Society of Cardiology working groups of aorta and peripheral vascular diseases and pulmonary circulation and right ventricular function. *Eur Heart J*, 39(47):4208-4218.
13. Lê Gia Hoàng Linh, Phạm Văn Dũng, Nguyễn Hoài Nam, et al (2020). Khảo sát bất thường di truyền gen PROC trong bệnh lý huyết khối tĩnh mạch. *Y học Thành Phố Hồ Chí Minh*, 24(4):70-75.

14. Tang L, Guo T, Yang R, et al (2012). Genetic background analysis of protein C deficiency demonstrates a recurrent mutation associated with venous thrombosis in Chinese population. *PLoS ONE*, 7(4):e35773.
15. Rojnuckarin P, Settapiboon R, Akkawat B, Teocharoen S, Suksut A, Uaprasert N (2019). Natural anticoagulant deficiencies in Thais: A population-based study. *Thromb Res*, 178:7-11.
16. Mesters RM, Heeb MJ, Griffin JH (1993). A novel exosite in the light chain of human activated protein C essential for interaction with blood coagulation factor Va. *Biochemistry*, 32(47):12656-12663.
17. Yue Y, Liu S, Han X, et al (2019). Pathogenic variants of PROC gene caused type I activity deficiency in a familial Chinese venous thrombosis. *J Cell Mol Med*, 23(10):7099-7104. doi:10.1111/jcmm.14563
18. Wang Z, Wang T, Chang J, et al (2016). Genetic association of PROC variants with pulmonary embolism in Northern Chinese Han population. *SpringerPlus*, 5:147. doi:10.1186/s40064-016-1801-9
19. Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, et al (2008). Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res*, 124(1):14-18.
20. Tang L, Lu X, Yu JM, et al (2012). PROC c.574_576del polymorphism: a common genetic risk factor for venous thrombosis in the Chinese population. *J Thromb Haemost JTH*, 10(10):2019-2026.
21. Millar DS, Johansen B, Berntorp E, et al (2000). Molecular genetic analysis of severe protein C deficiency. *Hum Genet*, 106(6):646-653.
22. Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*, 4(7):1073-1081.
23. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7(4):248-249.

Ngày nhận bài báo: 13/09/2020

Ngày nhận phản biện nhận xét bài báo: 01/02/2021

Ngày bài báo được đăng: 10/03/2021