

Phát hiện đột biến gen *G6PD* ở bệnh nhân thuộc dân tộc Nùng thiếu hụt enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase

Trần Thị Mai Anh¹, Ngô Thị Thảo¹, Đinh Thùy Linh², Trần Văn Khánh^{1*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, 929 đường La Thành, phường Ngọc Khánh, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 29/6/2022; ngày chuyển phản biện 4/7/2022; ngày nhận phản biện 25/7/2022; ngày chấp nhận đăng 28/7/2022

Tóm tắt:

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) là enzyme then chốt mở đầu cho chu trình pentose phosphate trong chuyển hóa glucose, về mặt sinh lý con đường này là nguồn gốc chủ yếu cung cấp nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) cho hồng cầu. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định đột biến trên gen *G6PD* ở bệnh nhân người dân tộc Nùng được chẩn đoán thiếu hụt enzyme G6PD. 18 bệnh nhi dân tộc Nùng được chẩn đoán thiếu enzyme G6PD tại Bệnh viện Nhi Trung ương, được ứng dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen để phát hiện đột biến trên gen *G6PD*. Kết quả có 8 dạng đột biến được xác định trên gen *G6PD*, trong đó đột biến chiếm ưu thế là *G6PD* Kaiping (c.1388G>A) với tỷ lệ 44,4%. Tiếp theo là các đột biến Canton (c.1376G>T), Viangchan (c.871G>A), Union (c.1360C>T), Gaohe (c.95A>G), Orissa (c.131C>G) và Chinese-5 (c.1024C>T). Cuối cùng là 3 trường hợp (Silent) có thêm biến đổi ở vị trí 1311C>T.

Từ khóa: Canton, dân tộc Nùng, đột biến gen *G6PD*, Kaiping, thiếu G6PD.

Chỉ số phân loại: 3.1

Identification of mutation in *G6PD* gene in Nung ethnic patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency

Thi Mai Anh Tran¹, Thi Thao Ngo¹, Thuy Linh Dinh², Van Khanh Tran^{1*}

¹Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²National Hospital of Obstetrics and Gynecology, 929 La Thanh Street, Ngoc Khanh Ward, Ba Dinh District, Hanoi, Vietnam

Received 29 June 2022; revised 25 July 2022; accepted 28 July 2022

Abstract:

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is the key enzyme that initiates the pentose phosphate cycle in glucose metabolism. Physiologically, this pathway is the main source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) for red blood cells. This study aims to identify glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Nung ethnic patients with G6PD deficiency. 18 pediatric patients of the Nung ethnic group were diagnosed with G6PD enzyme deficiency at the Vietnam National Children's Hospital and applied PCR and gene sequencing to detect mutations in the *G6PD* gene. 8 types of mutation were detected in the *G6PD* gene in which the most common mutation was Kaiping (c.1388G>A) with 44.4%, followed by Canton (c.1376G>T), Viangchan (c.871G>A), Union (c.1360C>T), Gaohe (c.95A>G), Orissa (c.131C>G), and Chinese-5 (c.1024C>T). Silent mutations at the 1311C>T location were found in 3 cases.

Keywords: Canton, G6PD deficiency, Kaiping, mutation in *G6PD* gene, Nung ethnic.

Classification number: 3.1

1. Đặt vấn đề

G6PD là enzyme then chốt mở đầu cho chu trình pentose phosphate trong chuyển hóa glucose, về mặt sinh lý con đường này là nguồn gốc chủ yếu cung cấp NADPH cho hồng cầu. NADPH là coenzyme khử, có liên quan mật thiết với chuỗi phản ứng tiếp theo giúp bảo vệ các nhóm sulphhydryl của haemoglobin, ngăn cản quá trình peroxide của các cấu tử hồng cầu. Hồng cầu của người bị thiếu G6PD

sẽ bị tán huyết nhanh chóng dưới tác dụng của các tác nhân oxy hoá, với biểu hiện lâm sàng như vàng da, tan máu, trong đó thiếu máu, tan máu nặng là một trong những triệu chứng nguy hiểm nhất [1].

Enzyme G6PD là sản phẩm mã hóa của gen *G6PD* nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể giới tính X tại vị trí Xq28. Gen dài khoảng 18,5 kb gồm 25861 nucleotide, khung đọc mở dài 1545 nucleotide với 13 exon và 12 intron. Exon 1

*Tác giả liên hệ: Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

và đầu 5' của exon 2 không mã hóa. Bộ 3 mã hóa đầu tiên nằm trên exon 2 [2]. Đột biến trên gen *G6PD* dẫn đến giảm hoặc ngừng quá trình tổng hợp enzyme, gây ra bệnh thiếu enzyme G6PD. Đến nay, hơn 200 đột biến G6PD phân bố dọc trên 13 exon của gen đã được xác định. Trong đó, sự thay thế nucleotide đơn lẻ được mô tả thường xuyên nhất, đột biến mất đoạn và đột biến intron được báo cáo với tỷ lệ thấp [3]. Trên thế giới, tỷ lệ mắc bệnh cao nhất là các khu vực Địa Trung Hải, châu Phi và Nam Á. Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc bệnh dao động khoảng 0,3-9% [4]. Sự phân bố các dạng đột biến mang tính đặc trưng theo vùng địa lý và dân tộc [1, 2]. Việc nghiên cứu khảo sát đột biến gây ra sự thiếu hụt G6PD đóng góp vào sự hiểu biết về phổ đột biến trên gen *G6PD*, mở ra những cơ hội mới để chẩn đoán và điều trị bệnh trong tương lai. Mục tiêu tiến hành nghiên cứu của chúng tôi là xác định đột biến trên gen *G6PD* ở bệnh nhân người dân tộc Nùng đã được chẩn đoán thiếu hụt enzyme G6PD.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

18 bệnh nhân người dân tộc Nùng được chẩn đoán thiếu enzyme G6PD tại Bệnh viện Nhi Trung ương trong thời gian từ tháng 6/2019 đến tháng 9/2019.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Bệnh nhân được chẩn đoán thiếu G6PD có kết quả định lượng hoạt độ enzyme G6PD dưới 200 U/10¹² hồng cầu. Bệnh nhân thuộc dân tộc Nùng.

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân thuộc các nhóm dân tộc ngoài Nùng, hoặc không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA: 2 ml máu ngoại vi của bệnh nhân được thu thập vào ống chống đông EDTA. DNA tổng số được tách chiết từ máu toàn phần theo kit The Wizard® Genomic DNA Purification Kit của Hãng Promega (Mỹ). Tất cả các mẫu sau tách chiết được tiến hành đo nồng độ và độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ Nanodrop đảm bảo đủ yêu cầu sử dụng để phân tích gen.

Kỹ thuật PCR: Thành phần của phản ứng PCR (thể tích 10 µl) gồm: 1 µl DNA mẫu, 0,5 µl mỗi xuôi 10 pM/µl và 0,5 µl mỗi ngược 10 pM/µl, GoTaq G2 Hot Start master mix (2X) 5 µl, H₂O 3 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/2 phút, 35 chu kỳ nhiệt [94°C/30 giây, 60°C/25 giây, 72°C/40 giây], 72°C/5 phút. Bảo quản mẫu ở 4°C. Trình tự mỗi khuếch đại gen *G6PD* mỗi F1-F5 tham khảo theo trình tự mỗi trong nghiên cứu của N.T. Hue và cs (2009) [4].

Mỗi F6-F8 được thiết kế sử dụng bằng phần mềm Primer - BLAST dựa trên trình tự gen *G6PD* trên ngân hàng gen mã NG_009015 (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự mỗi khuếch đại các exon trên gen *G6PD*.

Tên mỗi	Trình tự mỗi (5'→3')	Exon	T _m (°C)	Kích thước (bp)
F1F	5'-CTCAAGAAAGGGGCTAACTTCTCAA-3'	2	63,5	241
F1R	5'-GCACTTCCTGGCTTTTAAGATTGGG-3'		63,1	
F2F	5'-AGGTCGTGTCCCGAGCCACT-3'	3, 4	62,0	641
F2R	5'-GCACAGACACTGCCCCAGGC-3'		63,1	
F3F	5'-GGGCACCTCCCTGGACCTC-3'	5	61,5	491
F3R	5'-TCGTGGAGCAACGCTGCCAC-3'		60,7	
F4F	5'-ACTCCCCGAAGAGGGGTCAAGG-3'	6, 7	62,5	561
F4R	5'-GCTCTGCCACCTGTGCCAG-3'		62,8	
F5F	5'-ACACAGCCAAGCACCCACG-3'	8	62,1	607
F5R	5'-CAGGGCCCCCTCCCTGAGGAC-3'		63,1	
F6F	5'-GACTCGAGATGGACCAGGGTG-3'	9, 10	61,9	977
F6R	5'-CTCGAAGGCATCACCTACCATCC-3'		62,7	
F7F	5'-GGCCGTGTACACCAAGATGAT-3'	11, 12	60,4	566
F7R	5'-AGAGTGACGGGTGGAGGAGAG-3'		62,7	
F8F	5'-TATGGCAGGTGAGGAAAGGGT-3'	13	60,8	297
F8R	5'-AATGTGCAGCTGAGGTCAATG-3'		59,2	

2.3. Kỹ thuật giải trình tự gen

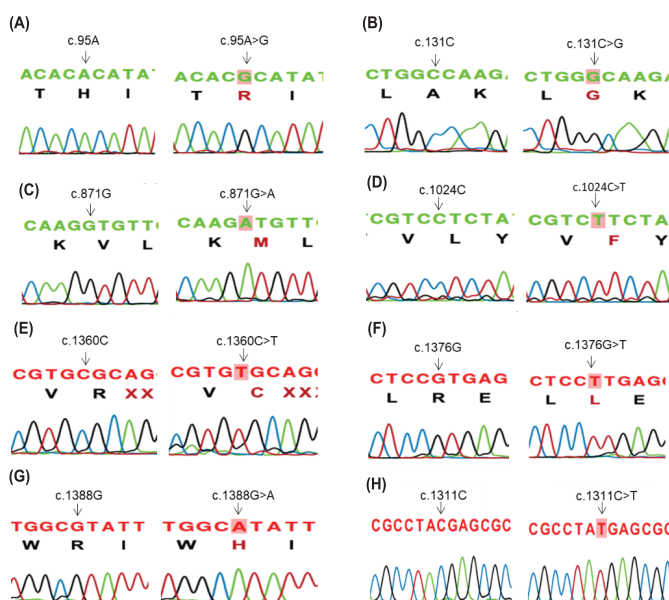
Thành phần phản ứng PCR giải trình tự gen gồm: Buffer Big dye 5X, Big dye Terminator v3.1, mỗi xuôi hoặc mỗi ngược, sản phẩm PCR các exon gen *G6PD*. Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng cho bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, Mỹ). Sản phẩm PCR giải trình tự gen sau khuếch đại được tinh sạch và điện di trên hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer. Kết quả giải trình tự các exon gen *G6PD* được so sánh với trình tự tham chiếu NG_009015 trên ngân hàng gen bằng phần mềm CLC Main Workbench để phát hiện các trình tự bị thay đổi.

3. Kết quả

Kết quả bảng 2 cho thấy, 100% bệnh nhân có đột biến trên gen *G6PD*, với 8 loại đột biến điểm được xác định. Trong đó, đột biến Kaiping chiếm ưu thế nhất. Các đột biến gặp với tỷ lệ thấp hơn lần lượt là Canton, Viangchan, Union. Mỗi đột biến Gaohe, Orissa và Chinese-5 xuất hiện ở 1 trường hợp. Ghi nhận 3 trường hợp có thêm biến đổi ở vị trí 1311C>T. Hình ảnh kết quả giải trình tự các đột biến trên gen *G6PD* ở người bình thường - bệnh nhân mang đột biến được thể hiện ở hình 1.

Bảng 2. Kết quả xác định đột biến gen của đối tượng nghiên cứu.

TT	Tên đột biến	Vị trí đột biến	Biến đổi acid amin	Exon	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Hoạt độ enzyme (U/10 ¹² hồng cầu)
Thuộc phân lớp II: 83,3%							
1	Kaiping	c.1388G>A	R463H	12	8	44,4	8,9-97,4
2	Canton	c.1376G>T	R459L	12	3	16,6	22,8-36,3
3	Viangchan	c.871G>A	V291M	9	2	11,1	45,6-78,8
4	Union	c.1360C>T	R454C	11	2	11,1	0-7,01
Thuộc phân lớp III: 16,7%							
1	Gaohe	c.95A>G	H32A	2	1	5,6	64,3
2	Orissa	c.131C>G	A44G	3	1	5,6	28,3
3	Chinese-5	c.1024C>T	L342F	9	1	5,6	19,26
Tổng					18	100	
	Silent	c.1311C>T	T437T	11	3	16,6	28,3-78,8



Hình 1. Hình ảnh kết quả giải trình tự các đột biến trên gen *G6PD*. (A) Gaohe (c.95A>G); (B) Orissa (c.131C>G); (C) Viangchan (c.871 G>A); (D) Chinese-5 (c.1024C>T); (E) Union (c.1360C>T); (F) Canton (c.1376G>T); (G) Kaiping (c.1388G>A); (H) Silent (c.1311C>T). Kết quả giải trình tự: người bình thường - bệnh nhân mang đột biến.

4. Bàn luận

Thiếu G6PD là bệnh lý di truyền về enzyme phổ biến nhất ở người, ảnh hưởng tới gần 5% dân số thế giới và gây ra các bệnh lý liên quan tới hồng cầu. Các đột biến xảy ra trên gen *G6PD* là nguyên nhân dẫn đến việc giảm hoặc ngừng quá trình tổng hợp enzyme, gây ra bệnh thiếu enzyme G6PD. Do đó, việc nghiên cứu khảo sát đột biến gen *G6PD* mở ra những cơ hội mới để chẩn đoán và điều trị bệnh trong tương lai. Nghiên cứu tiến hành trên 18 bệnh nhi dân tộc Nùng, sinh sống chủ yếu tại các tỉnh miền núi phía Bắc. Nhờ phương pháp định lượng hoạt độ enzyme,

các bệnh nhi được chẩn đoán thiếu hụt enzyme G6PD tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Kết quả phân tích gen cho thấy, tất cả các đối tượng nghiên cứu đều mang đột biến trên gen *G6PD*. Với 8 dạng đột biến điểm được xác định, trong đó 7 dạng đột biến dẫn đến thay thế acid amin này bằng một acid amin khác làm thay đổi cấu trúc protein và một biến đổi im lặng (Silent). Đây đều là các đột biến đã được ghi nhận tại Việt Nam trong các nghiên cứu trước đây, không ghi nhận đột biến mới [4, 5]. Đột biến gặp nhiều nhất trong nghiên cứu là Kaiping (c.1388G>A) với tỷ lệ là 44,4%. Tiếp theo là đột biến Canton (c.1376G>T) với tỷ lệ 16,6%. Theo các nghiên cứu trước khảo sát tại Việt Nam, biến đổi c.1388G>A được ghi nhận trong nhóm người Kinh nhưng với tần suất thấp hơn, dao động 6,6-16%. Tuy nhiên, biến đổi c.1376G>T lại gặp với tỷ lệ cao hơn (26,67%) [4, 5]. Đây cũng là những đột biến phổ biến nhất trong quần thể người thiếu G6PD tại Trung Quốc. Cụ thể Y. Chen và cs (2018) [6] nghiên cứu trên 904 trẻ thiếu hụt G6PD tại Phúc Kiến, Trung Quốc xác định được 17 loại đột biến, trong đó 3 đột biến c.1376G>T, c.1388G>A và c.95A>G chiếm 72,6%. Tỷ lệ này trong nghiên cứu của chúng tôi là 66,6%. Ngoài ra, nghiên cứu của chúng tôi cũng ghi nhận 2 đột biến Viangchan (c.871G>A) và Union (c.1360C>T) với tỷ lệ bằng nhau (11,1%). Viangchan được xem là đột biến chủ yếu gây bệnh trên quần thể người Kinh tại TP Hồ Chí Minh (43,3%) và cũng là nguyên nhân gây ra phần lớn trường hợp thiếu G6PD tại các nước Đông Nam Á như Lào (100%) và Campuchia (97,9%) [4, 7, 8]. Trong khi đó, đột biến Union được ghi nhận ở 12% quần thể người Kinh và gặp với tỷ lệ 9,5% người Thái Lan [4, 5]. Nghiên cứu cũng xác định được 3 đột biến Gaohe (c.95A>G), Orissa (c.131C>G) và Chinese-5 (c.1024C>T), với mỗi đột biến ghi nhận 1 trường hợp. Đây đều là các đột biến có nguồn gốc từ Trung Quốc [6]. Người Nùng được xem là có quan hệ gần gũi với người Tày và người Tráng sống dọc biên giới với Trung Quốc, đây có thể là nguyên nhân dẫn tới sự tương đồng về đặc điểm dịch tễ đột biến.

Các đột biến được xác định trong nghiên cứu nằm trên exon 2, 3, 9, 11 và 12 với 88,8% các đột biến xảy ra trên exon 9, 11 và 12. Tỷ lệ đột biến phát hiện trên 3 exon này trên đối tượng người Việt Nam theo khảo sát của N.T. Hue và cs (2009) [4], N.M. Hung và cs (2009) [9] lần lượt là 93,4 và 92,3%. Đây được xem là một trong những vùng exon trọng điểm trên gen *G6PD* chứa nhiều đột biến hay gặp ở người Việt Nam, vì vậy đã được nhóm nghiên cứu ưu tiên khảo sát trước tiên trong quá trình xác định đột biến.

Hoạt độ enzyme của các bệnh nhân trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 2 cho thấy, các bệnh nhân thiếu hụt enzyme ở mức độ từ trung bình tới nặng, với hoạt độ enzyme dao động trong khoảng khá rộng (0-97,4 U/10¹² hồng cầu). Trong đó, Kaiping, đột biến gặp nhiều nhất trong nghiên cứu, cho thấy sự chênh lệch về hoạt độ enzyme giữa các đối tượng nghiên cứu là lớn nhất, điều này thể hiện tồn tại sự biểu hiện khác nhau giữa kiểu gen và kiểu hình. Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã chia các biến thể của bệnh lý thiếu hụt G6PD thành 5 lớp, dựa vào hoạt độ của enzyme trong hồng cầu và biểu hiện lâm sàng của chúng [1, 2]. 83,3% trường hợp trong nghiên cứu mang đột biến thuộc phân lớp II, 16,7% thuộc phân lớp III. Phân lớp II được mô tả thiếu hụt enzyme G6PD ở mức độ nghiêm trọng với hoạt độ enzyme <10% so với bình thường. Cụ thể, 2 đột biến phổ biến nhất trong nghiên cứu là Kaiping và Canton có vị trí tương đối gần nhau trên exon 12, đều được xếp vào phân lớp này. 2 đột biến xảy ra làm thay đổi bộ 3 mã hóa cho acid amin Arginine ở vị trí 456 và 463 thành bộ 3 mã hóa cho Leucine và Histidine. Các acid amin này có vị trí gần với những vùng (Lys 386 - Arg 387) là những domain trực tiếp gắn NADPH, do đó có thể làm thay đổi hoạt tính và khả năng bảo vệ hồng cầu của G6PD [6]. Bệnh nhân có hoạt độ enzyme thấp nhất trong nghiên cứu của chúng tôi mang đột biến Union. Vị trí nucleotide c.1360 ở người bình thường trên gen G6PD là C, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân có trình tự là T. Sự thay đổi này làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 454 từ Arginin thành Cystein. Đột biến về cấu trúc của biến đổi này gây ra sự thay đổi tính đặc hiệu của cơ chất enzyme, với hoạt độ G6PD chỉ khoảng 10% so với bình thường [2].

Mặt khác, có 3 đối tượng trong nghiên cứu ngoài đột biến gây bệnh đã xác định được còn ghi nhận có thêm sự biến đổi ở vị trí nucleotide c.1311C>T ở exon 11. Cụ thể là 2 trường hợp mang đột biến Viangchan và 1 trường hợp mang đột biến Orissa. Tuy nhiên, do bộ ba TAC → TAT cùng mã hoá cho acid amin Tyrosine nên biến đổi tại vị trí 1311 này được coi là không ảnh hưởng đến sự mã hóa acid amin trong cấu trúc G6PD. Nghiên cứu của Y. Chen và cs (2018) [6] trên 904 trường hợp thiếu G6PD và 904 người đối chứng cho thấy tần suất xuất hiện của đa hình c.1311C>T trên gen G6PD ở nhóm bệnh nhân thiếu enzyme cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng. Sự tồn tại của c.1311C>T cùng các đột biến khác trên gen *G6PD* đã được quan sát trong các quần thể trên toàn thế giới và cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước tại Việt Nam. Tuy nhiên, mức độ ảnh hưởng của sự kết hợp này đối với cơ chế sinh bệnh thì cần được nghiên cứu ở mức sâu hơn.

5. Kết luận

Qua phân tích gen *G6PD* ở 18 bệnh nhân thuộc dân tộc Nùng bằng phương pháp giải trình tự gen xác định được 8 dạng đột biến trên gen *G6PD*. Đột biến chiếm ưu thế nhất là G6PD Kaiping (c.1388G>A). Tiếp theo là các đột biến Canton (c.1376G>T), Viangchan (c.871G>A), Union (c.1360C>T), Gaohe (c.95A>G), Orissa (c.131C>G) và Chinese-5 (c.1024C>T). Ghi nhận 3 trường hợp có thêm biến đổi ở vị trí 1311C>T.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. Takizawa, I. Huang, T. Ikuta, et al. (1986), "Human glucose6-phosphate dehydrogenase: Primary structure and cDNA cloning", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**(12), pp.4157-4161, DOI: 10.1073/pnas.83.12.4157.
- [2] L. Luzzatto, C. Nannelli, R. Notaro (2016), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency", *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, **30**(2), pp.373-393, DOI: 10.1016/j.hoc.2015.11.006.
- [3] S.G. Manzo, J.M. Quino, A.V. Carlo, et al. (2016), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Update and analysis of new mutations around the world", *Int. J. Mol. Sci.*, **17**(12), DOI: 10.3390/ijms17122069.
- [4] N.T. Hue, J.P. Charlier, T.T.H. Chau, et al. (2009), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations and haemoglobinuria syndrome in the Vietnamese population", *Malaria Journal*, **8**(1), DOI: 10.1186/1475-2875-8-152.
- [5] T.T.M. Anh, N.T. Phuong, T.V. Khanh (2020), "Identifying mutations in some key regions of the *G6PD* gene in patients with G6PD enzyme deficiency", *Vietnam Medical Journal*, **493**(2), pp.128-131 (in Vietnamese).
- [6] Y. Chen, W. Xiu, Y. Dong, et al. (2018), "Mutation of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Chinese Han children in eastern Fujian", *Medicine (Baltimore)*, **97**(30), DOI: 10.1097/MD.00000000000011553.
- [7] C. Louicharoen, I. Nuchprayoon (2005), "G6PD Viangchan (871G>A) is the most common G6PD-deficient variant in the Cambodian population", *J. Hum. Genet.*, **50**(9), pp.448-452, DOI: 10.1007/s10038-005-0276-2.
- [8] I. Nuchprayoon, S. Sanpavat, S. Nuchprayoon (2002), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population", *Hum. Mutat.*, **19**(2), DOI: 10.1002/humu.9010.
- [9] N.M. Hung, T.T. Tinh, H. Matsuoka (2009), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutation in 3 ethnic groups Muong, Tay, Thai in Vietnam", *Journal of Medical Research Studies*, **62**(3), pp.10-14, DOI: 10.51298/vmj.v513i2.2468 (in Vietnamese).