

# NGHIÊN CỨU SỰ ĐA HÌNH PROTEIN BỀN NHIỆT TRONG DỊCH MÀNG BỤNG VÀ GIỚI HẠN PHÁT HIỆN ĐỊNH LƯỢNG PROTEIN NHẪM THAY THẾ CHO XÉT NGHIỆM ĐỊNH TÍNH RIVALTA

VŨ XUÂN TẠO<sup>1</sup>, NGUYỄN GIA BÌNH<sup>2</sup>, LƯƠNG THỊ HỒNG VÂN<sup>3</sup>

1. Trung tâm Nghiên cứu & Chuyển giao Công nghệ Sinh học - Công ty CP Ứng dụng Khoa học Kỹ thuật Việt Nam

2. Khoa Sinh Hóa - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

3. Viện Khoa học Sự sống - Đại học Thái Nguyên

## TÓM TẮT:

Các tác giả tiến hành nghiên cứu phân tích định tính, định lượng và xác định sự đa hình protein bền nhiệt trong dịch màng bụng của các bệnh nhân lao, ung thư, xơ gan, suy tim... có tràn dịch. Kết quả nghiên cứu trên 100 mẫu dịch màng bụng cho thấy hàm lượng protein tổng số rất cao, trung bình là  $33,990 \pm 15,707$ g/L. Trong đó: 27% mẫu cho kết quả xét nghiệm Rivalta âm tính tương ứng với hàm lượng protein trung bình là  $18,185 \pm 6,961$ g/L; 73% mẫu cho kết quả xét nghiệm Rivalta dương tính tương ứng với hàm lượng protein trung bình là  $46,159 \pm 13,907$ g/L. Kết quả điện di protein bền nhiệt theo phương pháp SDS – PAGE cho thấy hệ protein bền nhiệt trong dịch màng bụng rất đa dạng. Số lượng băng (vạch protein) thu được dao động từ 5 đến 8 băng. Mẫu dịch màng bụng có hàm lượng protein là 21 g/L và âm tính Rivalta cho kết quả điện di xuất hiện 5 băng. Các mẫu còn lại có kết quả Rivalta dương tính với lượng protein là 37 và 42 g/L xuất hiện 8 băng.

**Từ khóa:** Protein bền nhiệt, dịch màng bụng, đa hình, Rivalta, dịch thấm, dịch tiết.

## SUMMARY:

RESEARCHING ON THE POLYMORPHISM OF HEAT-RESISTANT PROTEINS IN PERITONEAL FLUID AND DETECTING PROTEIN QUANTITATIVE TEST THAT WILL BE USED INSTEAD OF RIVALTA QUALITATIVE TEST

The authors carried out a research on quantitative, qualitative analysis and determine the polymorphism of heat-resistant proteins in peritoneal fluid of patients who got peritoneal effusion diseases such as: tuberculosis, cancer, cirrhosis, congestive heart failure. The result gained through research on 100 peritoneal fluid samples revealed that the total protein content was very high in comparison with the average of  $33.990 \pm 15.707$  g/L. Of that, 27% samples gained the negative Rivalta test result relatively to the  $18.185 \pm 6.961$ g/L average protein content; 73% of the samples gained positive with the Rivalta test correspondingly to  $46.159 \pm 13.907$ g/L average protein content. The electrophoresis results that were made by SDS – PAGE way showed the variety of heat-resistant proteins in peritoneal fluid. The gained number of strand (protein line) ranged from 5 to 8 strands. The peritoneal fluid sample with

21g/L protein content and Rivalta negative gave the electrophoresis results that was displayed on 5 strands. The left ones got the positive Rivalta results with 37 and 42 g/L protein amount, they all displayed on 8 strands.

**Keywords:** Heat-resistant proteins, peritoneal fluid, polymorphism, Rivalta, transsudat, exsudat.

## MỞ ĐẦU

Các dịch được lấy ra từ màng phổi, màng tim, khoang phúc mạc (màng bụng) hoặc dịch tràn từ các khớp lớn được gọi chung là dịch chọc dò. Người ra thường phân biệt thành 2 loại dịch tiết và dịch thấm. Dịch thấm gặp trong các trường hợp thận hư, xơ gan có tràn dịch phúc mạc, suy tim. Dịch tiết thường do nguyên nhân nhiễm khuẩn, lao, ung thư [1].

Dịch màng bụng là loại dịch có được do sự tích tụ các chất lỏng tự do trong khoang phúc mạc. Dịch màng bụng có thể là dịch thấm hoặc dịch tiết. Dịch màng bụng bình thường không vượt quá 5ml dịch thấm. Dịch màng bụng thường có màu vàng rơm. Xuất hiện vẩn đục là do sự hiện diện của các bạch cầu trung tính. Ngoài ra trong dịch còn có các chất béo trung tính. Tràn dịch màng bụng là một dấu hiệu lâm sàng phổ biến có nhiều nguyên nhân như: xơ gan (75%), các bệnh ác tính (10%), suy tim (5%) và các nguyên nhân khác (10%) [4].

Hiện nay trong việc chẩn đoán rất nhiều bệnh, đặc biệt là đối với các bệnh gây tràn dịch màng bụng như lao, ung thư, xơ gan, viêm gan, suy gan, suy tim thì các kết quả phân tích hóa sinh và sinh học phân tử đối với dịch màng bụng được các nhà chuyên môn rất quan tâm. Nhưng các nghiên cứu đã công bố của các nhà khoa học trong nước chủ yếu tập trung vào nghiên cứu đặc điểm lâm sàng của một số bệnh mà trong đó có đặc điểm tràn dịch màng bụng [2][3]. Một số nghiên cứu của các nhà khoa học khác trên thế giới đã bắt đầu đi sâu tìm hiểu đặc điểm sinh hóa, sinh học phân tử của dịch màng bụng để cung cấp các dấu hiệu cho chẩn đoán bệnh như dựa vào dựa hàm lượng interferon gamma trong dịch màng bụng để chẩn đoán nguyên nhân gây lao của các bệnh lý [5]; sử dụng kỹ thuật điện di 2 chiều 2-D, tia laser hỗ trợ bởi dải hấp thụ ion 4 cực (MALDI-Q-TOF) kết hợp khối phổ MS, song khối phổ MS/MS để nhận dạng được 5 loại protein có sự khác biệt trong dịch màng bụng của các nhóm đối tượng có biểu hiện bệnh lý khác nhau.

Trước đây các nhà chuyên môn thường sử dụng phương pháp định tính trong quy trình xét nghiệm dịch màng bụng, những phương pháp này có rất nhiều yếu tố hạn chế như chỉ một nhiễm tạp nhỏ trong quá trình xét nghiệm cũng sẽ dẫn tới làm sai lệch kết quả, làm mất thời gian, gây tâm lý lo ngại cho bệnh nhân. Hiện nay, với nhiều thành tựu của khoa học kỹ thuật đã cho phép các nhà sinh học có thể xác định chính xác hàm lượng protein có mặt trong bất cứ một sinh phẩm nào, trong đó có dịch màng bụng của người. Hay việc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để nghiên cứu các chỉ thị protein trong chẩn đoán.

Hệ protein bền nhiệt là một trong những đối tượng nghiên cứu mới trong nghiên cứu về protein. Cho đến nay vẫn chưa có một định nghĩa chính xác và đầy đủ cho các protein loại này. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, hệ protein bền nhiệt trong được xem như là tập hợp các protein có khả năng chịu được nhiệt độ, vẫn giữ được hoạt tính sau khi đã được xử lý ở nhiệt độ 98°C trong 10 phút theo phương pháp của Goufman [7]. Tính bền nhiệt của các protein có mối quan hệ chặt chẽ với các cấu trúc tương ứng của chúng [9]. Do đó, nghiên cứu các protein bền nhiệt có thể giúp tìm ra những ứng viên chỉ thị bệnh hiệu quả và có độ nhạy cao.

Từ các lý do trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm các mục tiêu:

- Nghiên cứu hàm lượng protein trong dịch màng bụng của các bệnh nhân mắc các bệnh gây tràn dịch màng bụng như về lao, ung thư, xơ gan, suy tim.
- Nghiên cứu giới hạn phát hiện của xét nghiệm định lượng protein trong dịch màng bụng của bệnh nhân nhằm thay thế hoặc bổ trợ cho xét nghiệm định tính Rivalta đang dùng tại các bệnh viện.
- Nghiên cứu tính đa hình của protein bền nhiệt trong dịch màng bụng nhằm hướng tới chỉ chỉ protein trong chẩn đoán bệnh.

## NGUYÊN LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Bệnh phẩm nghiên cứu

Dịch màng bụng được thu từ những bệnh nhân làm xét nghiệm chọc dò dịch màng bụng mắc các bệnh gây tràn dịch màng bụng như về lao, ung thư, xơ gan, suy tim đến khám và điều trị tại bệnh viện Trung ương Quân đội 108, Hà Nội. Các mẫu được lựa chọn theo các tiêu chuẩn chặt chẽ về lâm sàng (hồ sơ bệnh án). Đối với xét nghiệm định tính, định lượng mẫu dịch được tiến hành ngay tại khoa Sinh hóa – bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Đối với thí nghiệm điện di, dịch màng bụng được chia nhỏ đưa vào các eppendorf, được bảo quản ở -20°C cho đến khi được làm điện di tại phòng Hóa sinh protein – Viện Công nghệ Sinh học (CNSH) – Viện KH&CN Việt Nam.

**Nhóm chứng:** Dịch huyết thanh thu được từ mẫu máu người bình thường. Máu được thu trong đợt khám sức khỏe định kỳ tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, Hà Nội. Các mẫu được lựa chọn theo các tiêu chuẩn chặt chẽ về lâm sàng, có hồ sơ, bệnh

án rõ ràng và có kết luận là mẫu bình thường từ các bác sỹ chuyên khoa của bệnh viện. Máu toàn phần được tiến hành xử lý thu huyết thanh.

### 2. Địa điểm nghiên cứu

- Khoa Sinh hóa - Trung tâm kỹ thuật cao - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
- Phòng Hóa sinh protein - Viện CNSH, – Viện KH&CN Việt Nam

### 3. Phương pháp nghiên cứu

- Sử dụng phương pháp nghiên cứu phân tích định tính, định lượng, so sánh các mẫu độc lập, so sánh với nhóm chứng: định tính sử dụng xét nghiệm Rivalta đối với dịch màng bụng; định lượng hàm lượng protein tổng số trong dịch màng bụng trên máy sinh hóa tự động OLYM – PUSAU 400.

- Thu nhận protein bền nhiệt từ hệ protein toàn phần dịch màng bụng theo phương pháp của Goufman và cộng sự năm 2006 [7].

- Phương pháp xác định sự đa hình protein bằng kỹ thuật điện di biến tính (SDS-PAGE). Kỹ thuật SDS-PAGE được thực hiện theo Laemli, 1970 [8].

- Quy trình thu mẫu, xử lý, bảo quản và phân tích mẫu theo quy định chuẩn của chuyên môn ngành.

- Thiết bị: Sử dụng các thiết bị hiện đại có tại Khoa sinh hóa – Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, phòng Hóa sinh protein – Viện Công nghệ Sinh học như máy sinh hóa tự động OLYM – PUSAU 400, hệ thống điện di SDS PAGE...

- Hóa chất: Sử dụng các hóa chất tinh sạch của các hãng có uy tín trên thế giới như hãng Meck (Đức), Prolet (Tâybanha), ... Các thiết bị, hóa chất được sử dụng trong kỹ thuật SDS-PAGE do hãng Bio-Rad, Mỹ cung cấp.

### 4. Xử lý số liệu

- Sử dụng toán thống kê ứng dụng trong y – sinh học.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 1. Kết quả định tính protein trong dịch màng bụng bằng xét nghiệm Rivalta.

Bảng 1. Định tính protein trong dịch màng bụng bằng xét nghiệm Rivalta

Mẫu bệnh phẩm	Hàm lượng protein tổng số (g/L)	Kết quả phản ứng Rivalta			
		Số mẫu (+)	% (+)	Số mẫu (-)	% (-)
Dịch màng bụng nhóm 1 (n=27)	5 – 24	0	0	27	100
Dịch màng bụng nhóm 2 (n=73)	25 – 74	73	100	0	0

*Ghi chú:* Nhóm 1: Nhóm dịch có hàm lượng protein trong khoảng 5 – 24 g/L; Nhóm 2:: Nhóm dịch có hàm lượng protein trong khoảng 25 – 74 g/L; (+): dương tính; (-): âm tính.

Từ kết quả phân tích hàm lượng protein và xét nghiệm Rivalta 100 mẫu bệnh phẩm là dịch màng bụng ở trên cho thấy: Hàm lượng protein tổng số của các bệnh nhân lấy mẫu dịch màng bụng phân tích dao động trong khoảng 5,0 g/L đến 74 g/L. Các mẫu dịch màng bụng phân tích cho kết quả cả dương tính

và âm tính đối với xét nghiệm Rivalta. Trong đó số mẫu cho kết quả âm tính là 27 mẫu chiếm 27%, số mẫu cho kết quả dương tính là 73 mẫu chiếm 73%. Các mẫu dịch màng bụng có hàm lượng protein tổng số từ 5 g/L đến 24 g/L là 27 mẫu và cả 27 mẫu (chiếm 100%) đều cho kết quả xét nghiệm Rivalta âm tính. Các mẫu dịch màng bụng có hàm lượng protein tổng số từ 25 g/L đến 74 g/L là 73 mẫu và cả 73 mẫu (chiếm 100%) đều cho kết quả xét nghiệm Rivalta dương tính.

## 2. Hàm lượng protein tổng số trong dịch màng bụng của các bệnh nhân nghiên cứu

Bảng 2. Hàm lượng protein trong các mẫu dịch màng bụng nghiên cứu

Mẫu bệnh phẩm	Đơn vị	Hàm lượng $\bar{X} \pm SD$	ĐC $\bar{X} \pm SD$	p/ĐC
Dịch màng bụng (n=100)	g/l	33,990 $\pm$ 15,707	76,090 $\pm$ 3,959	<0,05
Rivalta (-) (n=27)	g/l	18,185 $\pm$ 6,961	76,090 $\pm$ 3,959	<0,05
Rivalta (+) (n=73)	g/l	46,159 $\pm$ 13,907	76,090 $\pm$ 3,959	<0,05

Ghi chú: ĐC: Huyết thanh người bình thường - đối chiếu (n=100)

Từ bảng trên cho thấy hàm lượng protein tổng số trong dịch màng bụng của các bệnh nhân nghiên cứu tương đối cao. Trung bình trong 100 mẫu dịch màng bụng nghiên cứu thì hàm lượng protein tổng số là 33,990 g/L. Các mẫu dịch màng bụng cho xét nghiệm Rivalta âm tính có hàm lượng protein tổng số trung bình là 18,185 g/L, các mẫu cho xét nghiệm Rivalta dương tính có hàm lượng protein trung bình là 46,159 g/L. Hàm lượng protein trong các mẫu dịch màng bụng dương tính Rivalta cao hơn 2,54 lần so với trong các mẫu xét nghiệm Rivalta âm tính

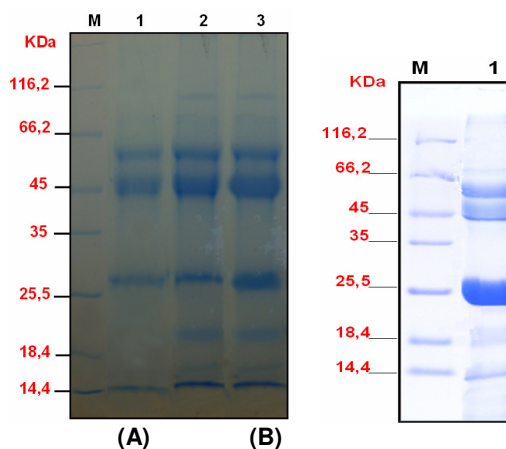
Trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy hàm lượng protein tổng số trong dịch màng bụng của mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính Rivalta phù hợp so với các số liệu đã công bố trước đây như hàm lượng protein trong dịch màng bụng dương tính Rivalta của các bệnh nhân tràn dịch màng bụng Alan Balfe và Cs (2009) nghiên cứu là lớn hơn 30 g/L [4].

Khi so sánh hàm lượng protein trong dịch màng bụng nghiên cứu với hàm lượng protein trong dịch huyết thanh người bình thường nhận thấy hàm lượng protein trong huyết thanh cao hơn so với trong dịch màng bụng. Cụ thể cao hơn dịch màng bụng chung 2,24 lần; cao hơn dịch màng bụng âm tính Rivalta 4,18 lần, cao hơn dịch màng bụng dương tính Rivalta 1,65 lần. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$ .

Giới hạn phát hiện của xét nghiệm định lượng protein tổng số đối với dịch màng bụng được nhận định từ hai bảng trên (bảng 1 và bảng 2) như sau: Hàm lượng protein tổng số  $\leq 24$  g/L cho kết quả phản ứng Rivalta âm tính. Hàm lượng protein tổng số  $\geq 25$  g/L cho kết quả phản ứng Rivalta dương tính. Đây là kết luận nhằm hỗ trợ cho kết quả của phản ứng Rivalta trong xét nghiệm lâm sàng

## 3. Sự đa hình protein bền nhiệt trong dịch màng bụng nghiên cứu

Để xác định và đánh giá sự đa hình các protein trong dịch màng bụng nghiên cứu chúng tôi tiến hành thu nhận protein bền nhiệt từ hệ protein toàn phần dịch màng bụng theo phương pháp của Goufman và cộng sự năm 2006 [7] rồi kiểm tra bằng điện di biến tính SDS-PAGE ở nồng độ gel 12,6%, bản điện di được hiện màu bằng Comassive Blue Brilliant R-250. Kết quả điện di kiểm tra của các protein dịch màng phổi được thể hiện trong hình 1.



Hình 3.1. Điện di SDS-PAGE 12,6% protein bền nhiệt dịch màng bụng (A) và huyết thanh (B).

Đường chạy M: Thang protein marker chuẩn; A. Đường chạy 1: dịch màng bụng âm tính Rivalta và hàm lượng protein là 21 g/L; Đường chạy 2,3: dịch màng bụng dương tính Rivalta và hàm lượng protein tương ứng là 37 và 42 g/L. B:: Đường chạy 1: dịch huyết thanh người bình thường với hàm lượng protein tổng số là 74g/L sau khi xử lý thu protein bền nhiệt.

Kết quả điện di protein bền nhiệt theo phương pháp SDS – PAGE cho thấy hệ protein bền nhiệt trong dịch màng bụng thể hiện sự đa dạng cao. Số lượng băng (vạch) thu được dao động từ 5 đến 8 băng với độ đậm nhạt khác nhau. Mẫu dịch màng bụng có hàm lượng protein là 21 g/L và âm tính Rivalta cho kết quả điện di xuất hiện 5 băng. Các mẫu còn lại có kết quả Rivalta dương tính với lượng protein là 37 và 42 g/L xuất hiện 8 băng. Trong đó mẫu màng bụng dương tính Rivalta (2, 3) thấy đều xuất hiện 3 băng ở kích thước khoảng 102,5 KDa, 20,5 KDa và 16 KDa nhưng ở mẫu âm tính Rivalta không thấy xuất hiện 3 băng này. Đây có thể là cơ sở cho việc tìm ra những chỉ thị phân tử protein cho chẩn đoán bệnh.

Khi so sánh kết quả điện di protein bền nhiệt dịch màng bụng với kết quả điện di protein bền nhiệt huyết thanh người bình thường nhận thấy ở mẫu huyết thanh người bình thường xuất hiện 1 băng khá đậm ở kích thước trên 116,2 kDa, 1 băng ở kích thước 18,4 kDa mà ở các mẫu dịch màng bụng

không thấy xuất hiện. Ngoài 2 băng trên thì ở mẫu huyết thanh xuất hiện các băng tương tự như đối với mẫu dịch màng bụng âm tính với xét nghiệm Rivalta.

#### **KẾT LUẬN**

#### **1. Hàm lượng protein và giới hạn phát hiện của xét nghiệm định lượng protein trong dịch màng bụng nghiên cứu**

Hàm lượng protein tổng số trong 100 mẫu dịch màng bụng của các bệnh nhân trong nghiên cứu này tương đối cao, trung bình hàm lượng protein trong dịch là 39,990 g/L.

Giới hạn phát hiện của xét nghiệm định lượng protein tổng số đối với dịch màng bụng được nhận định ban đầu với kết quả là: hàm lượng protein tổng số  $\leq 24$  g/L cho kết quả phản ứng Rivalta âm tính; hàm lượng protein tổng số  $\geq 25$  g/L cho kết quả phản ứng Rivalta dương tính.

#### **2. Sự đa hình protein bền nhiệt trong dịch màng bụng**

Giữa các mẫu dịch màng bụng khác nhau (âm tính Rivalta và dương tính Rivalta, hàm lượng protein trong dịch màng bụng) có sự khác nhau về số lượng, vị trí, độ đậm nhạt của các băng điện di chứng tỏ protein bền nhiệt trong dịch màng bụng biểu hiện tính đa hình cao.

#### **KIẾN NGHỊ**

Để đánh giá toàn diện và ý nghĩa hơn về giới hạn phát hiện của xét nghiệm định lượng protein trong dịch màng bụng nhằm thay thế hoặc bổ trợ cho xét nghiệm Rivalta cần phải tiến hành đánh giá nghiên cứu và phân tích trên một số lượng mẫu lớn hơn.

Cần tiến hành đọc khối phổ xác định cụ thể từng loại protein trong dịch màng bụng hướng tới xây dựng cơ sở dữ liệu hệ protein bền nhiệt trong dịch màng bụng của các bệnh nhân mắc bệnh gây tràn dịch màng bụng nhằm giúp chẩn đoán sớm bệnh dựa vào các chỉ thị phân tử đặc biệt là các protein chỉ thị bệnh.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Nguyễn Gia Bình (2010), *Quy trình xét nghiệm*, Khoa Sinh hóa, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, Hà Nội.
2. Phạm Văn Quang, Bạch Văn Cam (2008), *Bước đầu đánh giá vai trò của đo áp lực bang quang trong chẩn đoán và xử trí tăng áp lực ổ bụng trên bệnh nhi sốt xuất huyết nặng*, *Tạp chí Y học TP. HCM*, tập 12 phụ bản số 4, tr: 84 – 91.
3. Trần Thị Thúy, Vũ Thị Quế Hương, Kenji Hirayama (2007), *Mối liên quan giữa gen và biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhi sốt xuất huyết dengue tại bệnh viện Nhi đồng II*, *Tạp chí Y học TP. HCM*, tập 11 phụ bản số 4, tr: 11 – 16.
4. Alan Balfe, Stan Barry, Ophelia Blake, Demot Cannon, Martin Healy, Mark Kilbane, Peadar McGing, Ruth O'Kelly, Paula O'Shea (2009), *The biochemistry of body fluids*, Scientific Committee of the Association of Clinical Biochemists in Ireland (ACBI).
5. Burgess LJ, Reuter H, Carstens ME, Taljaard JJJ, Doubell AF (2002), *The Use of Adenosine Deaminase and Interferon Gamma as Diagnostic Tools for Tuberculous Pericarditis*, *Chest*, (122) :900 - 905
6. Jenkinson F, Murphy MJ (2007), *Biochemical analysis of pleural and ascetic fluid: effect of sample timing on interpretation of results*, *Ann Clin Biochem* 44 (5),pp 471 – 473.
7. Goufman E. I., Moshkovskii S. A., Tikhonova O. V., Lokhov P. G., Zgoda V. G., Serebryakova M. V., Toropygin I. Y., Vlasova M. A., Safarova M. R., Makarov O. V., Archakov A. I.(2006), *Two-dimensional electrophoretic proteome study of serum thermostable fraction from patients with various tumor conditions*, *Biochemistry (Mosc)*, 71(4), pp. 354-360.
8. Laemmli U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, *Nature*, 227, 1970, pp. 680-685.
9. Li X., Dina A., Fred R (2003), *Comparative Proteomics of Glycoproteins Based on Lectin Selection and Isotope Coding*, *Journal of Proteome Research*, 2, pp. 618-625.