

BƯỚC ĐẦU XÁC ĐỊNH CÁC ĐA HÌNH ĐƠN TRÊN CÁC BỆNH NHÂN TĂNG CHOLESTEROL MÁU CÓ TÍNH CHẤT GIA ĐÌNH

Đặng Thị Ngọc Dung¹, Vũ Đức Anh¹, Hoàng Thị Yến²

TÓM TẮT

Bệnh tăng cholesterol có tính chất gia đình (Familial Hypercholesterolemia - FH) là một bệnh di truyền trội nhiễm sắc thể thường đặc trưng bởi nồng độ LDL-cholesterol (LDL-C) trong máu tăng cao bất thường. Đột biến gây bệnh xảy ra chủ yếu trên các gen: LDLR, apoB, PCSK9, LDLRAP1, 80% trong đó được phát hiện đột biến gen LDLR. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã chứng minh các đa hình đơn là một trong các yếu tố đồng thời góp phần làm tăng lipid máu trên các bệnh nhân FH, cũng là một trong các yếu tố hay bị bỏ sót. Nghiên cứu thực hiện trên 26 bệnh nhi được chẩn đoán FH phát hiện SNP rs1003723 với tỷ lệ 7/26 (26,92%); SNP rs5925 xuất hiện 11/26 bệnh nhi (42,31%). 6/26 bệnh nhi (23,08%) có xuất hiện SNP rs1003723 và/hoặc SNP rs5925 dị hợp tử mà chưa tìm thấy các bằng chứng đột biến gây bệnh. Còn lại 13/26 bệnh nhi FH (50%) chưa phát hiện cả đột biến và đa hình đơn trên một số exon trọng điểm gen LDLR. Trong nhóm chưa phát hiện đột biến, các BN có mang các SNP có chỉ số TC cao hơn nhóm BN không mang SNP có ý nghĩa thống kê ($p=0.005$). Xác định các đa hình đơn trên các bệnh nhân và gia đình bệnh nhân FH là bước đầu có ý nghĩa vô cùng quan trọng, là một trong những bằng chứng giúp các bác sỹ lâm sàng can thiệp điều trị sớm, theo dõi và dự phòng tránh các biến chứng nguy cơ về tim mạch xảy ra.

Từ khóa: Tăng cholesterol máu có tính chất gia đình, đa hình đơn gen LDLR

SUMMARY

APPROACH TO DETERMINING POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disorder of lipoprotein metabolism characterized by high levels of LDL-cholesterol (LDL-C) in the blood. The mutation that occurs primarily in: LDLR, apoB, PCSK9, LDLRAP1 genes, 80% of which detected the LDLR gene mutation. However, many studies have demonstrated that polymorphisms are factors that also contribute to raising lipid in patients with FH, which is also one of the most overlooked factors. The study performed on 26 patients diagnosed with FH showed that SNP rs1003723 with the rate of 7/26 (26.92%); SNP rs5925 appeared in 11/26 pediatric patients (42.31%). 6/26 pediatric

patients (23.08%) had the presence of heterozygous SNP rs1003723 and/or SNP rs5925 but no mutations were found. Remaining 13/26 FH pediatric patients (50%) did not detect any both mutation and SNPs in some hotspot exons in LDLR gene. In the group that did not detect the mutation, the patients with SNPs had statistically significant higher TC than those without SNPs ($p=0.005$). Identifying SNPs in patients with FH and their families is a very important step and one of the evidence that helps clinicians intervene in early treatment, follow-up and anticipation, preventing cardiovascular risk complications from early occurring.

Keywords: Familial hypercholesterolemia, LDLR SNPs.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tăng cholesterol có tính chất gia đình (Familial Hypercholesterolemia - FH) là một bệnh di truyền trội nhiễm sắc thể thường đặc trưng bởi nồng độ LDL-cholesterol (LDL-C) trong máu tăng cao bất thường. Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy hơn 1.000 đột biến của gen LDLR đã được xác định ở bệnh nhân tăng cholesterol có tính chất gia đình. Tỷ lệ mắc bệnh ước tính trên toàn thế giới từ 1:500 đến 1:300. Đây là bệnh di truyền đơn gen, nguyên nhân có thể do đột biến ở các gen: LDLR, apoB, PCSK9, LDLRAP1, trong đó chủ yếu liên quan đến đột biến gen LDLR với tỷ lệ đột biến trên 80%¹. Viện quốc gia về y tế và lâm sàng của Anh (NICE) đã đưa ra khuyến cáo về sàng lọc phân tăng đối với người thân có quan hệ huyết thống gần với bệnh nhân đã được chẩn đoán lâm sàng FH, giúp giảm tỷ lệ bệnh tật và tử vong do bệnh tim mạch ở những người FH thông qua chẩn đoán bệnh sớm và quản lý bệnh hiệu quả².

Gần đây một số lượng đáng kể các bệnh nhân FH không có các đột biến gây bệnh đã biết trước, làm tăng số lượng SNP liên quan đến tăng cao LDL-C, do đó có thể nguyên nhân liên quan đến đa gen³. Một số nghiên cứu trên toàn bộ hệ gen - Genome Wide Association Studies (GWAS) được thực hiện trong thập kỷ qua đã phát hiện sự biến đổi ở một số vị trí LDLR có liên quan đến mức độ LDL-C. Các GWAS chỉ ra LDLR là một gen ứng cử viên cho tăng cholesterol máu đa gen. Ví dụ, kiểu gen thứ phát SNP rs6511720 gen LDLR có liên quan đến việc giảm 6,99 mg/dL cholesterol tổng số và biến thể này đã được đưa vào điểm số gen LDL-C do Talmud đề xuất, tuy nhiên chức năng của nó vẫn chưa rõ⁴.

¹Đại học Y Hà Nội,

²Bệnh viện Tim Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Đặng Thị Ngọc Dung.

Email: dzunghmu@gmail.com

Ngày nhận bài: 7/4/2021

Ngày phản biện khoa học: 29/4/2021

Ngày duyệt bài: 20/5/2021

Trong nghiên cứu này, cùng với việc phát hiện các đột biến gây bệnh⁵, chúng tôi bước đầu xác định một số đa hình đơn trên một số exon trọng điểm gen LDLR trên 26 bệnh nhi được chẩn đoán FH. Kết quả rất có ý nghĩa trong việc phát hiện sớm, tư vấn và dự phòng biến chứng kịp thời cho các bệnh nhi, đặc biệt là những bệnh nhi được chẩn đoán FH chưa phát hiện các đột biến gây bệnh; từ đó là tiền đề tư vấn cho các thành viên trong gia đình bệnh nhi FH.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. 26 bệnh nhi (≤ 15 tuổi) đến khám tại BV Nhi Trung Ương và BV Tim Hà Nội được chẩn đoán FH theo tiêu chuẩn Simon Broome¹.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu. Nghiên cứu được tiến hành từ 1/2016- 7/2019 tại Trung tâm Kiểm chuẩn chất lượng xét nghiệm y học, Trường đại học Y Hà Nội.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Thực hiện các xét nghiệm lipid máu: total cholesterol (TC), Triglycerid, HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C) trên các bệnh nhi với 2mL máu tĩnh mạch chống đông heparin định lượng ngay hoặc bảo quản nhiệt độ âm sâu cho tới khi được thực hiện phân tích.

> **Kỹ thuật tách DNA:** các mẫu máu toàn phần có chống đông EDTA, Các mẫu DNA được tách chiết theo quy trình của Exgene Blood SV mini (GeneAll, Hàn Quốc); nồng độ và độ tinh sạch DNA tách chiết được xác định trên máy Nanodrop, những mẫu DNA đạt giá trị OD260/OD280 $\geq 1,8$ để sử dụng phân tích.

> **Kỹ thuật PCR:** PCR được sử dụng để khuếch đại exon trọng điểm 3, 4, 9, 13, 14 gen LDLR với các cặp mồi thiết kế đặc hiệu

• Thành phần phản ứng PCR: (thể tích 10 μ L) gồm 5 μ L Taq polymerase; 0,5 μ L mỗi xuôi; 0,5 μ L mỗi ngược; 1,0 μ L DNA và 3,0 μ L nước cất.

• Chu trình nhiệt của phản ứng PCR:

Chu trình	Biến tính	Bắt cặp	Tổng hợp
1	95°C-5phút		
2 – 34	95°C-30giây	T _m -30 giây	72°C-30giây
35			72°C-5 phút
Bảo quản sản phẩm ở 10°C			

T_m = 55°C với exon 3, exon 9 và exon 14; 57°C với exon 4

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5% với điện thế 120v, trong 30 phút.

> **Kỹ thuật giải trình tự gen:** Sau khi khuếch đại, sản phẩm PCR được tinh sạch và sau đó được đưa vào giải trình tự bằng phương

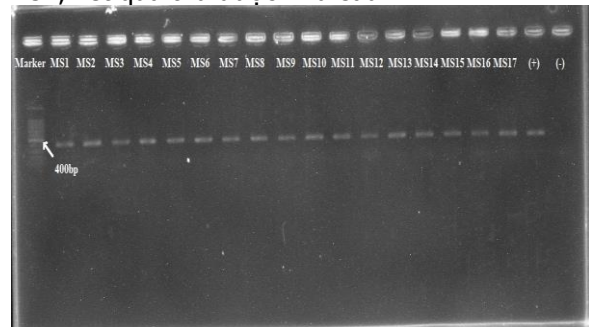
pháp Sanger với hóa chất BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit trên hệ thống máy ABI 3730 XL (Thermo Fisher). Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự của gen LDLR trên GeneBank.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu. Sử dụng phần mềm thống kê y học phù hợp với nghiên cứu.

2.5. Đạo đức trong nghiên cứu. Đề tài tuyệt đối tuân thủ đạo đức trong nghiên cứu y sinh và đã được Hội đồng đạo đức ĐHYHN chấp thuận theo số 187/HĐĐĐĐHYHN ngày 20/02/2016.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

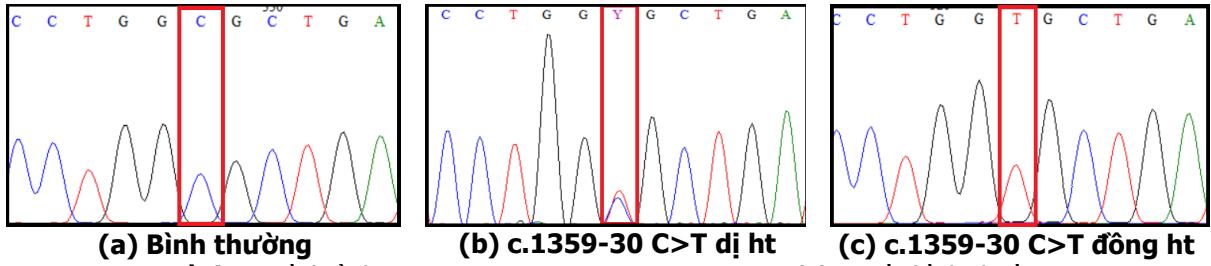
3.1. Kết quả điện di kiểm tra chất lượng sản phẩm PCR. Các exon 3, 4, 9, 13, 14 gen LDLR được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp mồi tự thiết kế đạt yêu cầu chất lượng, quá trình tự thiết kế mồi luôn đảm bảo tuân thủ chặt chẽ theo nguyên tắc thiết kế mồi. Điện di trên gel agarose 1,5% để kiểm tra sản phẩm PCR, kết quả thu được như sau:



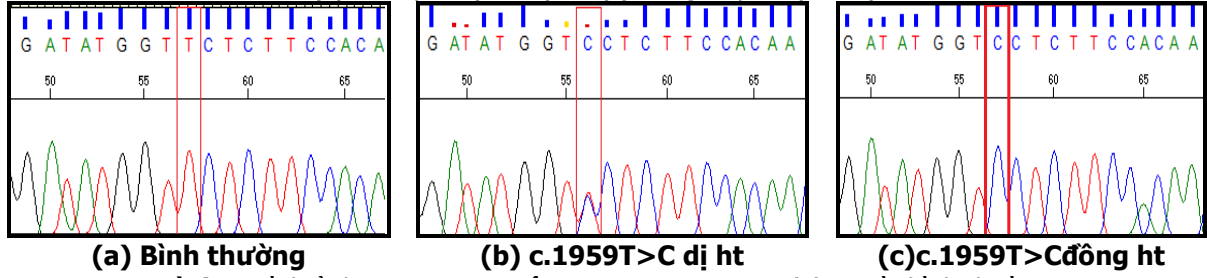
Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của exon 3 với mồi LDLR (400 bp); Marker: 100 bp; (-): Chứng âm; (+): Chứng dương; MS1-MS17: Mẫu bệnh nhi từ MS1 - MS17.

Nhận xét: Kết quả PCR cho thấy hình ảnh các sản phẩm 1 băng đặc hiệu tương ứng với kích thước đoạn khuếch đại, đủ điều kiện tiến hành phản ứng giải trình tự tiếp theo. Các exon còn lại đều đạt tiêu chuẩn tương tự trên điện di.

3.2. Kết quả xác định đa hình đơn gen LDLR. Kết quả SNP rs1003723 (c.1358+1-30 C>T) phát hiện trên intron 9 xuất hiện với tỷ lệ 7/26 (26,92%); SNP rs5925 (c.1959 T>C) phát hiện trên exon 13 xuất hiện 11/26 bệnh nhi (42,31%). Có 5 bệnh nhân mang đồng thời cả 2 SNP trên; trong đó bệnh nhân MS15 xuất hiện 2 SNP ở dạng đồng hợp, và là một bệnh nhân triệu chứng lâm sàng rầm rộ của bệnh FH. 6/26 bệnh nhi (23,08%) có xuất hiện SNP rs1003723 và/hoặc SNP rs5925 dị hợp tử mà chưa tìm thấy các băng đột biến gây bệnh. Còn lại 13/26 bệnh nhi FH (50%) chưa phát hiện cả đột biến và đa hình đơn trên một số exon trọng điểm gen LDLR.



Hình 2. Hình ảnh SNP rs1003723 intron 9 gen LDLR (a) người bình thường (b) dị hợp tử (MS02) và (c) đồng hợp tử (MS15).



Hình 3. Hình ảnh SNP rs5925 trên exon 13 gen LDLR (a) người bình thường (b) dị hợp tử MS02 và (c) đồng hợp tử MS15 (mỗi xuôi)

3.3. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của các bệnh nhi trong nhóm chưa phát hiện đột biến có đa hình đơn và chưa phát hiện đa hình đơn trên các exon trọng điểm gen LDLR

Bảng 1. Một số đặc điểm cận lâm sàng trên nhóm bệnh nhân chưa phát hiện đột biến có và không mang SNPs.

Nhóm Bệnh nhi chưa phát hiện đột biến	n	TC $\bar{x} \pm SD$ (mmol/L)	LDL-C $\bar{x} \pm SD$ (mmol/L)
Có SNPs	6	17,35± 7,45	10,72± 4,60
Không SNPs	13	9,60± 2,97	7,41± 2,60
p^(*)		0,005	0,106

* Kiểm định theo Mann-Whitney test

Trong nhóm bệnh nhi chưa phát hiện đột biến: Cholesterol trung bình nhóm mang SNPs là 17.35 mmol/L (n=7) cao hơn nhóm không mang SNPs: 9,6mmol/L (n=12) có ý nghĩa thống kê với p=0,005. Trong khi đó LDL-C nhóm mang SNPs cao hơn nhóm không mang SNPs tương ứng 10,72 và 7,41mmol/L, chưa có ý nghĩa thống kê với p > 0,05.

IV. BÀN LUẬN

Đột biến gen LDLR dẫn đến việc thiếu các thụ thể có chức năng (LDL receptor) trên bề mặt tế bào. Điều này gây ra sự giảm hấp thu LDL vào các tế bào, đặc biệt là vào tế bào gan, từ máu, dẫn đến tăng LDL-cholesterol huyết thanh. Từ đó làm giảm sự nội hóa và thanh thải LDL, dẫn đến thiếu sự ức chế tổng hợp cholesterol nội bào và tích tụ LDL trong lòng mạch. Các đột biến hay

SNP làm ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của thụ thể LDLR đều làm tăng LDL trong máu.

2 SNPs rs5925 và rs1003723 xuất hiện với tỉ lệ cao trong nghiên cứu của chúng tôi tương ứng là 26,92% (7/26) và 42,31% (11/26). SNP rs1003723 được tìm thấy với tần xuất cao trong cộng đồng người Đan Mạch (44%) được chứng minh có liên quan đến sự bảo tồn hiệu quả ghép nối exon khi thực nghiệm trên in vitro⁶. Hai SNP này đã từng được công bố có liên quan tới tình trạng tăng triglyceride và cholesterol trước đây. SNP rs1003723 (c.1359-30 C>T hay IVS9-30 C>T) phát hiện trên intron 9 gen LDLR trong nghiên cứu đã được nhiều nghiên cứu chứng minh nhóm mang alen T (CT hoặc TT) có liên quan tới tình trạng tăng TC và LDL-C cao hơn so với kiểu gen CC có ý nghĩa thống kê với p=0,002 và p=0,01 tương ứng⁷. Một điều đáng quan tâm là người mang alen T của rs1003723 được tìm thấy trong nghiên cứu của chúng tôi từng được chứng minh có liên quan đến nguy cơ mắc ung thư đường mật cao gấp 1,5 lần so với nhóm CC. Tình trạng tăng TC và LDL-C cũng đã được chỉ ra có liên quan đến nguy cơ ung thư đường mật trước đó⁷. Do đó, mối liên quan giữa SNP rs1003723 và ung thư ống mật một phần liên quan đến ảnh hưởng của SNP này đối với tổng lượng cholesterol và LDL. Điều đáng lưu ý là SNP rs1003723 là biến thể duy nhất vẫn có ý nghĩa thống kê sau khi kiểm soát nhiều so sánh từ các nghiên cứu, điều này càng làm nổi bật tầm quan trọng của SNP rs1003723. Do vậy dấu ấn này cần được lưu ý trên những cá thể có mang SNP với

kiểu alen T trong nhóm nghiên cứu với tình trạng TC và LDL-C tăng cao. SNP rs5925 (c.1959 T>C) với kiểu alen T (TT hoặc TC) có liên quan tới nồng độ triglyceride trong máu thấp hơn ở nhóm bệnh nhân rối loạn lipid máu, tăng huyết áp⁸. Ở cộng đồng người Trung Quốc, kiểu hình alen này còn liên quan trực tiếp tới nồng độ thấp hơn của các chỉ số TC, LDL-C, triglyceride trong máu so với kiểu alen CC. Trong nghiên cứu có bệnh nhân MS15 không những mang đột biến đồng hợp c.664 T>C exon 4 còn phát hiện đồng thời 2 SNP rs5925 (kiểu alen CC) và rs1003723 (kiểu alen TT)⁵. Đây có thể là nguyên nhân càng làm nặng lên và khó kiểm soát tình trạng rối loạn lipid máu ở bệnh nhân này. Tuy nhiên để đánh giá được chính xác hơn sự tác động giữa kiểu alen của các SNP với kiểu hình bệnh, cần có các nghiên cứu sâu hơn trên nhóm bệnh với nhóm chứng với cỡ mẫu lớn.

Tuy nhiên có 13/26 bệnh nhân chưa phát hiện các đột biến, SNPs tại các exon, intron trọng điểm gen LDLR. Tuy nhiên theo **Bảng 1** cho thấy cùng nhóm BN chưa phát hiện đột biến, những BN mang SNPs có chỉ số TC cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không mang SNPs ($p < 0,05$), chỉ số LDL-C cao hơn nhưng chưa có ý nghĩa thống kê mặc dù tất cả các bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu đều có các triệu chứng điển hình và đủ tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh FH theo tiêu chuẩn Simon Broome. Lý giải cho vấn đề này có thể do kinh phí nghiên cứu còn hạn chế nên chưa thực hiện khảo sát trên toàn bộ các exon gen LDLR cũng như các gen khác có liên quan đến cơ chế bệnh FH (ApoB, PCSK9)⁹. Do đó 13 bệnh nhân còn lại có thể có đột biến nhưng trên các vùng, các gen chưa được thực hiện. Tuy nhiên kết quả nghiên cứu cũng bước đầu củng cố các bằng chứng 2 SNP trên góp phần gây tăng cao TC và LDL-C trên các bệnh nhân FH và cần nhiều các nghiên cứu đối chứng với cỡ mẫu lớn hơn để khẳng định.

Kết quả nghiên cứu trên thế giới cho thấy chỉ có 10% bệnh nhân FH được phát hiện. Với chẩn đoán sớm và điều trị kịp thời, những bệnh nhân này có thể sống lâu hơn và có chất lượng sống tốt hơn. Chẩn đoán FH có ý nghĩa vô cùng quan trọng đối với tiên lượng của bệnh nhân và chẩn đoán điều trị dự phòng sớm cho các thành viên gia đình mang gen bệnh. Do đó, tư vấn di truyền và sàng lọc phân tầng các thành viên trong gia đình của BN đóng một vai trò quan trọng trong việc phát hiện và điều trị bệnh sớm kể cả trong các trường hợp thành viên trong phả hệ không có biểu hiện u vàng trên lâm sàng và không tăng

lipid máu.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được 2 SNP là rs1003723 (c.1358+1-30 C>T) và rs5925 (c.1959 T>C), trong đó các BN có mang các SNP này có chỉ số TC cao hơn nhóm BN không mang SNP ($p < 0,05$). Nghiên cứu bước đầu xác định các SNP trên một số exon trọng điểm gen LDLR có liên quan đến tăng lipid máu và là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trên các cỡ mẫu lớn hơn, giúp các BN có yếu tố nguy cơ được phát hiện, điều trị sớm ngay cả khi chưa phát hiện các đột biến gây bệnh.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của các cộng sự và cán bộ Trung tâm Kiểm chuẩn chất lượng xét nghiệm y học, trường Đại học Y Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Henderson R., O'Kane M., McGilligan V., et al.** The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. *J Biomed Sci.* Apr 16 2016;23:39.
- DeMott K., Nherera L., Shaw EJ., et al.** Clinical Guidelines and Evidence Review for Familial hypercholesterolaemia: the identification and management of adults and children with familial hypercholesterolaemia. London: National Collaborating Centre for Primary Care and Royal College of General Practitioners.
- Futema M, Bourbon M, Williams M, et al.** Clinical utility of the polygenic LDL-C SNP score in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* Oct 2018;277:457-463.
- Talmud P.J, Shah S, Whittall R, et al.** Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet.* 2013;381(9874):1293-1301.
- Hoàng Thị Yên., Vũ Đức Anh., Đặng Thị Ngọc Dung., et al.** Xác định đột biến trên một số exon trọng điểm gen LDLR ở bệnh nhân tăng cholesterol máu có tính chất gia đình Tạp chí Y học Việt Nam. 2019;01(484):35-39.
- Webb J.C, Patel D.D, Shoulders C.C, et al.** Genetic variation at a splicing branch point in intron 9 of the low density lipoprotein (LDL)-receptor gene: a rare mutation that disrupts mRNA splicing in a patient with familial hypercholesterolaemia and a common polymorphism. *Human molecular genetics.* Sep 1996;5(9):1325-1331.
- Andreotti G, Menashe I, Chen J, et al.** Genetic determinants of serum lipid levels in Chinese subjects: a population-based study in Shanghai. *China. Eur J Epidemiol.* 2009;24 ((12):763-774.
- Rios-González B.E, Ibarra-Cortés B, Ramírez-López G, et al.** Association of polymorphisms of genes involved in lipid metabolism with blood pressure and lipid values in mexican hypertensive individuals. *Dis Markers.* 2014;2014:150358.