

DI TRUYỀN PHÂN TỬ, TƯƠNG QUAN KIỂU GEN - KIỂU HÌNH CỦA BỆNH CƯỜNG INSULIN BẨM SINH

Đặng Ánh Dương⁽¹⁾, Vũ Chí Dũng⁽¹⁾, Cán Thị Bích Ngọc⁽¹⁾, Nguyễn Phú Đạt⁽²⁾, Trần Minh Điển⁽¹⁾

(1) Bệnh viện Nhi Trung ương, (2) Trường Đại học Y Hà Nội

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định đột biến các gen ABCC8, KCNJ11, HNF4A và GLUD, tương quan giữa kiểu gen – kiểu hình của các bệnh nhân cường insulin bẩm sinh. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Gồm 32 bệnh nhân cường insulin bẩm sinh được chẩn đoán và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương trong thời gian từ 1/1/2010 đến 31/8/2012. Bệnh nhân được lựa chọn theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Hussain K. (2008). **Kết quả:** Phát hiện thấy có đột biến gen 43,8% trường hợp, trong đó đột biến ABCC8 (37,6%), KCNJ11 (3,1%), HNF4A (3,1%). 100% các trường hợp có hai đột biến lặn hoặc một đột biến trội từ bố của gen ABCC8 không đáp ứng với diazoxide và phải phẫu thuật cắt tụy 95%, các trường hợp không có đột biến gen thường đáp ứng với điều trị nội khoa. **Kết luận:** Trẻ có cường insulin bẩm sinh cần phân tích đột biến gen để giúp cho chẩn đoán và quyết định điều trị. Những gia đình có trẻ bị cường insulin bẩm sinh cần tư vấn di truyền, chẩn đoán trước sinh và theo dõi điều trị ngay sau sinh. **Từ khóa:** cường insulin, hạ đường máu.

Abstract

MOLECULAR GENETICS, GENOTYPE AND PHENOTYPE CORRELATIONS OF CHILDREN WITH

CONGENITAL HYPERINSULINISM

Objectives: To identify mutations in the ABCC8 and KCNJ11, HNF4A and GLUD genes, genotype and phenotype correlations of children with congenital hyperinsulinism. **Methods:** A prospective study was conducted on 32 cases with congenital hyperinsulinism diagnosed and treated in National Hospital of Pediatric from January 2010 to September 2012. Criteria for diagnosis by Hussain K 2008. **Results:** 43,8% were detected mutations of genes, including ABCC8 (37,6%), KCNJ11 (3,1%), HNF4A (3,1%). 100% cases who has two recessive mutations or one dominant mutation of gene from father of ABCC8, don't respond to diazoxide treatment in and must doing near total (95%) pancreatectomy, with other cases who don't have mutation usually respond to diazoxide. **Conclusions:** The child with congenital hyperinsulinism, it's necessary to take generic testing to detect gene mutations in order to make an appropriate decision - medical treatment. In the family they has the child with congenital hyperinsulinism need inheritable consultancy, prenatal diagnosis and follow up, treatment immediately after delivery. **Key word:** hyperinsulinism, hypoglycemia

1. Đặt vấn đề

Cường insulin bẩm sinh là một bệnh với biểu hiện là hạ glucose máu nặng kéo dài ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ do rối loạn điều hòa bài tiết insulin. Chẩn đoán sớm và điều trị kịp thời, không trì hoãn là vô cùng quan trọng nhằm hạn chế tổn thương não và di chứng vĩnh viễn thần kinh cho trẻ. Nguyên nhân phổ biến nhất và nặng nhất của các bệnh di truyền này liên quan đến các đột biến lặn bất hoạt kênh KATP của màng tế bào β của tiểu đảo tụy. Kênh KATP điều hòa quá trình khởi phát cho việc bài tiết insulin. Các đột biến lặn của kênh KATP gây bệnh cường insulin bẩm sinh xuất hiện ở một trong hai đơn vị cấu trúc nên kênh này là sulfonylurea receptor 1 (SUR1) hoặc lỗ điều hòa ion của nó là Kir6.2. Cả hai đơn vị protein này được mã hóa bởi các gen nằm cạnh nhau trên nhiễm sắc thể 11 là ABCC8 và KCNJ11 [1]. Các đột

biến lặn của kênh KATP khi cả hai allele (từ bố và mẹ) đều có đột biến gây nên tăng sinh lan tỏa tế bào β của tiểu đảo tụy. Thế tăng sinh cục bộ của tế bào β thường xuất hiện khi có đột biến trội kênh KATP nguồn gốc từ bố. Điều trị cần tiến hành ngay bằng cung cấp glucose tốc độ cao (glucose tĩnh mạch hoặc glucose dạ dày), sử dụng diazoxid hoặc octreotid, can thiệp phẫu thuật cắt bỏ 95 - 98% nếu điều trị nội khoa thất bại [2].

Ở Việt Nam, cường insulin bẩm sinh cũng là bệnh cảnh thường gặp trong cấp cứu và hồi sức, trong giai đoạn từ tháng 1/1/2010-31/8/2012 chúng tôi gặp 32 trường hợp mắc bệnh. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm hai mục tiêu sau:

1. Xác định đột biến các gen ABCC8, KCNJ11, HNF4A và GLUD1 cho các bệnh nhân được chẩn đoán cường insulin bẩm sinh.

2. Nhận xét tương quan giữa kiểu gen – kiểu hình của các bệnh nhân cường insulin bẩm sinh.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Gồm 32 bệnh nhân cường insulin bẩm sinh được chẩn đoán và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương trong thời gian từ 1/1/2010 đến 31/8/2012.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu tiến cứu mô tả cắt ngang, không có nhóm chứng.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu:

Tiêu chuẩn lựa chọn:

Tiêu chuẩn chẩn đoán của Hussain K. (2008) [3].

Bệnh nhân được chẩn đoán cường insulin bẩm sinh khi có đủ các tiêu chuẩn sau:

- Glucose máu hạ lúc đói hoặc sau khi ăn (< 2.5 - 3 mmol/l). Kết hợp với tăng tiết insulin và c-peptide (insulin huyết thanh > 1 mU/l)

- Đáp ứng với tiêm glucagon: glucose máu tăng 2 – 3 mmol/l sau tiêm dưới da 0.5 mg glucagon.

- Không có xeton niệu và xeton máu thấp.

- Tốc độ truyền tĩnh mạch glucose để duy trì glucose máu bình thường là > 8 mg/kg/phút.

- Không có các bằng chứng của hạ glucose máu do các rối loạn chuyển hóa bẩm sinh (acid béo, acid hữu cơ, acid amin).

Tiêu chuẩn loại trừ:

Các trẻ sơ sinh hạ glucose máu do các nguyên nhân khác như: mẹ mắc đái tháo đường, chậm phát triển trong tử cung, ngạt, các rối loạn chuyển hóa bẩm sinh, các bệnh di truyền khác (trisomia 13, hội chứng Turner, ...), tốc độ duy trì truyền tĩnh mạch ≤ 8 mg/kg/phút.

Phân tích gen.

Các trẻ được chẩn đoán cường insulin bẩm sinh theo tiêu chuẩn trên sẽ được lấy máu chiết tách ADN theo quy trình chuẩn từ bạch cầu lympho máu ngoại vi của bệnh nhân và bố mẹ. Exon đơn độc của gen KCNJ11 và 39 exon của gen ABCC8 được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự theo quy trình của Ellard S. và Flanagan S. E [4][5]. Phản ứng sequencing được phân tích trên ABI 3730 capillary sequencer (Applied Biosystems, Warrington, UK) và được so sánh với trình tự gen đã được công bố (NM_000525 and NM_000352.2) sử dụng “Mutation Surveyor version 3.24” (Softgenetics PA, USA).

2.3 Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được phê duyệt bởi Hội đồng đánh giá đạo đức nghiên cứu Y sinh học của bệnh

viện Nhi Trung ương cho phép và cũng được sự đồng ý của bố mẹ bệnh nhân khi tiến hành lấy mẫu máu của cả bố, mẹ và bệnh nhân.

3. Kết quả

3.1 Di truyền phân tử

Bảng 1. Loại đột biến gen trên bệnh nhân cường insulin bẩm sinh

Gene	Số lượng bệnh nhân	%
ABCC8	12	37,6
KCNJ11	1	3,1
HNF4A	1	3,1
GLUD1	0	0
Total (n = 32)	14	43,8

Nhận xét: Trong số các bệnh nhân có phát hiện được đột biến gen thì tỷ lệ gặp đột biến gen ABCC8 hay gặp nhất chiếm 37.6%.

Bảng 2. Các kiểu đột biến ABCC8 trên bệnh nhân cường insulin bẩm sinh

BN	Đột biến allele 1 (c. DNA)	Đột biến allele 2 (c. DNA)	Đột biến allele 1 (protein)	Đột biến allele 2 (protein)	Đột biến từ bố	Đột biến từ mẹ
1	c. 2056T>A (exon 15)*	c. 2057T>C (exon 15)	p. F686I	p. F686S	p. F686I	p. F686S
2	c. 2057T>C (exon 15)	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	p. F686S	Aberrant splicing	p. F686S	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)
3	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	Aberrant splicing	Aberrant splicing	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)
4	c. 2057T>C (exon 15)	c. 2995C>T (exon 25)	p. F686S	p. R999X	p. F686S	p. R999X
5	c. 1467+5G>A (intron 9)	(exon 23)	Aberrant splicing	p. R934X	Aberrant splicing	p. R934X
6	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	Aberrant splicing	Aberrant splicing	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)

* Đột biến mới

Nhận xét: Trong số các bệnh nhân có đột biến gen ABCC8 thì có phát hiện được một đột biến mới ở vị trí exon 15 khi đó c. 2056T>A, exon 34 khi đó c. 4135G>A và exon 8 khi đó c. 1183A>T. Đây là các đột biến này chưa từng được công bố trong bản đồ đột biến gen của gen này.

Bảng 3. các kiểu đột biến ABCC8 trên bệnh nhân cường insulin bẩm sinh

BN	Đột biến allele 1 (c. DNA)	Đột biến allele 2 (c. DNA)	Đột biến allele 1 (protein)	Đột biến từ bố	Đột biến từ mẹ
7	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	ND	Aberrant splicing	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	ND
8	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	ND	Aberrant splicing	c. 3403-1G>A (acceptor site intron 27)	ND
9	c. 4135G>A (exon 34)*	ND	p. G1379S	p. G1379S	ND
10	c. 1183A>T (exon 8)*	ND	p. I395F	ND	p. I395F
11	c. 4160_4162del (exon 34)	ND	p. S1387del	p. S1387del	ND
12	c. 2057T>C (exon 15)	ND	p. F868S	p. F868S	ND

* Đột biến mới

3.2 Tương quan kiểu hình và kiểu gen

Bảng 4. Tương quan kiểu đột biến gene với đáp ứng với diazoxid

Kiểu gen	Kiểu hình – đáp ứng với diazoxid	Số ca
Không đột biến <i>ABCC8</i> ; <i>KCNJ11</i> ; <i>HNF4A</i> và <i>GLUD1</i>	(+)	18
Đột biến <i>HNF4A</i>	(+) và ngừng thuốc	1
Đột biến <i>KCNJ11</i>	(+) và cơn hạ glucose máu nhẹ	1

Nhận xét: Trong nghiên cứu đáp ứng với điều trị Diazoxid, thì 100 % các ca không có đột biến các gen *ABCC8*; *KCNJ11*; *HNF4A* và *GLUD1* là đáp ứng với điều trị.

Bảng 5. Tương quan kiểu hình và kiểu gen của các ca đột biến *ABCC8*

Kiểu gen	Kiểu hình – đáp ứng với diazoxid	
	Có (n)	Không (n)
Hai đột biến lặn <i>ABCC8</i>		6 (6)**
Một đột biến trội <i>ABCC8</i> từ bố		5(5)**
Một đột biến trội <i>ABCC8</i> từ mẹ	1 (1)*	

* Không cần cắt tụy

** Cắt 95% tụy nội soi

Nhận xét: Trong các ca có hai đột biến lặn hoặc một đột biến trội từ bố thì 100 % là không đáp ứng với điều trị nội khoa và cần được can thiệp bằng phẫu thuật cắt tụy 95%. Nếu có một đột biến trội từ mẹ thì có đáp ứng với điều trị nội khoa.

4. Bàn luận

4.1 Đột biến gen trên bệnh nhân cường insulin bẩm sinh

Xét nghiệm về di truyền phân tử trong thực hành lâm sàng chẩn đoán, điều trị, tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh đối với hạ glucose máu nặng do cường insulin là một trong những thành tựu của y học hiện đại. Ở Việt Nam, lần đầu tiên chúng tôi triển khai việc ứng dụng phân tích đột biến gen trong thực hành lâm sàng chẩn đoán, điều trị và tư vấn di truyền đối với hạ glucose máu nặng do cường insulin bẩm sinh từ năm 2010. Việc ứng dụng này rõ ràng là cơ sở khoa học tin cậy trong việc lựa chọn chỉ định điều trị thích hợp, đặc biệt trong trường hợp phải phẫu thuật cắt gần toàn bộ tụy. Cho đến nay 8 gen đã được biết đến có liên quan đến cường insulin bẩm sinh có tính chất gia đình. Đột biến gen *ABCC8* là nguyên nhân chính của bệnh và được mô tả đầu tiên, khoảng 45% các trường hợp cường insulin bẩm sinh có đột biến ở gen *ABCC8* và khoảng 5% các trường hợp có đột biến ở gen *KCNJ11* (Các protein được mã hóa bởi *ABCC8* và *KCNJ11* tham gia cấu tạo nên kênh K_{ATP} của tế bào β tiểu đảo tụy và có chức năng điều hòa bài tiết insulin. Khoảng 5% bệnh nhân có đột biến ở gen *GLUD1*, đây là gen mã hóa cho enzym glutamine dehydrogenase (GDH). Hiếm hơn là các ca có đột biến ở gen *GCK*, là gen mã hóa cho enzym glucokinase, đột biến gen *UCP2* và đột biến lặn của gen *HADH*. Có khoảng 40% bệnh nhân không tìm thấy đột biến ở các gen. Hiện vẫn chưa rõ là những bệnh nhân không phát hiện được đột biến có thể có đột biến intron, hoặc các đột biến mất đoạn lớn (thường không phát hiện được bằng các kỹ thuật đang áp dụng hiện nay cho các gen này) hoặc có các đột biến ở các gen khác mà chưa xác định được [6]. Trong nghiên cứu của chúng tôi phát hiện được 14/32 (43.8%) có đột biến gen (trong đó đột biến *ABCC8* (37.6%), *KCNJ11*(3.1%), *HNF4A* (3.1%) và không trường hợp nào được phát hiện có đột biến gen *GLUD1*, *GCK*, hoặc *HADH*). Như vậy nhìn chung nhóm bệnh nhân của chúng tôi có tỷ lệ phát hiện gen tương tự như báo cáo của James ở trên, trong đó đột biến gen *ABCC8* là hay gặp nhất (37.6%) các trường hợp có đột biến gen. Nhưng so với nghiên cứu của tác giả K. E. Snider, phân tích gen 417 trường hợp cường insulin bẩm sinh, tỷ lệ phát hiện đột biến gen của tác giả này cao hơn nhiều (79%) [7].

Trong nhóm bệnh nhân đột biến gen *ABCC8* được phát hiện, xác định được 9 đột biến khác nhau trong đó có 3 đột biến (c. 2056T>A (exon 15); c. 4135G>A (exon 34); c. 1183A>T (exon 8)) (bảng 2 và 3) là những

đột biến mới phát hiện và chưa từng được báo cáo trên y văn thế giới. Phân bố các đột biến IVS27-1G>A trong 5 gia đình, p. F686S trong 4 gia đình, còn lại mỗi đột biến (p. R999X, c. 1467+5G>A, p. R934X, p. S1387del, p. F686I, p. G1379S, p. I395F) xảy ra trong một gia đình. Đến nay có khoảng trên 150 các đột biến khác nhau của gen ABCC8 và trên 25 đột biến khác nhau của gen KCNJ11 đã được báo cáo, phân bố đột biến toàn bộ chiều dài của gen. Đột biến lặn ở gen ABCC8 và KCNJ11 thường gây ra bệnh cảnh lâm sàng hạ glucose máu cường insulin nặng [6].

4.2 Tương quan kiểu gen và kiểu hình trên bệnh nhân cường insulin bẩm sinh

Trong xác định tương quan kiểu gen và mức độ đáp ứng điều trị diazoxide, theo tác giả K. E. Snider, 89% bệnh nhân có đột biến kênh KATP được mã hóa bởi hai gen ABCC8 và KCNJ11 là không có đáp ứng với điều trị bằng diazoxide và chỉ đạt được kết quả kiểm soát glucose máu tốt khi điều trị phẫu thuật bằng cắt tụy, ngược lại các bệnh nhân mang các đột biến khác HNF4A, GLUD, HADH, UCP2 có đáp ứng với diazoxide [7]. Với nhóm bệnh nhân chúng tôi 18/32 (56.2%) không phát hiện ra đột biến các gen thường gặp, trong nhóm này thì lâm sàng đáp ứng rất tốt với điều trị diazoxide. Một trường hợp đột biến gen

HNF4A đáp ứng với điều trị diazoxide và một trường hợp đột biến gen KCNJ11 có đáp ứng một phần với điều trị và có hạ glucose máu nhẹ sau điều trị. Trong nhóm đột biến gen ABCC8, các trường hợp có hai đột biến lặn và một đột biến trội từ bố thì 100% là không đáp ứng với diazoxide và cần phải phẫu thuật cắt tụy 95% và chỉ một trường hợp trong số 12 trường hợp phát hiện được đột biến gen ABCC8 có một đột biến trội ABCC8 từ mẹ và không cần phẫu thuật cắt tụy, đáp ứng với điều trị nội khoa.

5. Kết luận

- Những trẻ có cường insulin bẩm sinh cần phân tích đột biến gen, đặc biệt là ABCC8 và KCNJ11 để giúp cho chẩn đoán di truyền và quyết định điều trị thích hợp.

- Các trường hợp có đột biến gen ABCC8, đặc biệt có hai đột biến lặn hoặc một đột biến trội từ bố thì không có đáp ứng với điều trị nội khoa và cần phẫu thuật cắt tụy 95% sớm để đề phòng hạ glucose máu nặng.

6. Kiến nghị

Những gia đình có trẻ bị cường insulin bẩm sinh cần tư vấn di truyền, chẩn đoán trước sinh và theo dõi điều trị ngay sau sinh.

Tài liệu tham khảo

1. Giurgea I., et al. Molecular mechanisms of neonatal hyperinsulinism. *Horm Res.* 2006; 66 (6): 289-96.
2. Pinney S. E., et al., Clinical characteristics and biochemical mechanisms of congenital hyperinsulinism associated with dominant KATP channel mutations. *J Clin Invest.* 2008; 118 (8): 2877-86.
3. Hussain K. Diagnosis and management of hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy. *Horm Res.* 2008; 69 (1): 2-13.
4. Ellard S., et al. Permanent neonatal diabetes caused by dominant, recessive, or compound heterozygous SUR1

mutations with opposite functional effects. *Am J Hum Genet.* 2007; 81 (2): 375-82.

5. Flanagan S. E., et al. Mutations in KCNJ11, which encodes Kir6.2, are a common cause of diabetes diagnosed in the first 6 months of life, with the phenotype determined by genotype. *Diabetologia.* 2006; 49 (6): 1190-7.

6. James C., et al. The genetic basis of congenital hyperinsulinism". *J Med Genet.* 2009; 46 (5): 289-99.

7. Snider K. E., et al. (2013), "Genotype and phenotype correlations in 417 children with congenital hyperinsulinism". *J Clin Endocrinol Metab.* 98 (2): E355-63.