

lại ngắn không thể thực hiện miệng nối Delta.

Những bệnh nhân phẫu thuật nội soi thường có thời gian hồi phục sớm sau mổ. Thời gian rút sonde dạ dày và sonde bàng quang trung bình lần lượt là 13 giờ và 40,3 giờ. Thời gian trung tiện trung bình là 47,8 giờ. Thời gian rút dẫn lưu và nằm viện trung bình là 6,4 và 7,1 ngày. Kết quả của chúng tôi cũng tương đương các tác giả khác khi khẳng định ưu điểm lớn nhất của bệnh nhân được phẫu thuật nội soi là giúp bệnh nhân đỡ đau và hồi phục sớm sau mổ [2],[6],[7].

Nghiên cứu của Yoshida không thấy sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ tử vong trong 30 ngày hoặc tại bệnh viện của những bệnh nhân được phẫu thuật cắt dạ dày mở và nội soi cùng là 0,2% với $p=0,90$. Ngoài ra, không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ phẫu thuật lại và tái phát sau phẫu thuật. Thời gian nằm viện sau mổ của bệnh nhân mổ mở cao hơn đáng kể với bệnh nhân được mổ nội soi với lần lượt là 15 ngày và 12 ngày, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,001$ [7].

Nghiên cứu của chúng tôi không gặp ca nào xảy ra tai biến hay biến chứng trong và sau mổ như chảy máu, nhiễm trùng vết mổ, rò mỏm tá tràng, rò miệng nối, tắc ruột hay phải nhập viện trở lại trong 30 ngày. Đây là kết quả rất khả quan với một kỹ thuật mới được áp dụng tại Bệnh viện K. Dù vậy, kết quả này có thể do cỡ mẫu của chúng tôi còn nhỏ, vì vậy cần những nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn, theo dõi trong thời gian lâu hơn để có những đánh giá kỹ lưỡng hơn.

V. KẾT LUẬN

Phẫu thuật nội soi cắt dạ dày cực xa điều trị UTDD giai đoạn cT1,2N0M0 là kỹ thuật ngoại khoa hiện đại, có thể được áp dụng một cách an toàn, bước đầu mang lại lợi ích sống còn và chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân UTDD giai đoạn sớm tại bệnh viện K.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **American Joint Committee on Cancer** (2018). Gastric Cancer. AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed: Springer, 103-16.
2. **Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al.** (2012). Cancer Incidence and Mortality Worldwide. Lyon, France.: International Agency for Research on Cancer.
3. **Japanese Gastric Cancer Association.** (2017). Japanese gastric cancer treatment guidelines. Gastric Cancer, 20(6), 1–19.
4. **International Agency for Research on Cancer. Globocan.** 2018. In: Cancer Fact Sheets-Digestive Organs: Stomach (C16) [Internet].
5. **Kenneth Leung, Zhifei Sun, et al.** (2020). Minimally invasive gastrectomy for gastric cancer: A national perspective on oncologic outcomes and overall survival. Surg Oncology, 26(1), 324-330.
6. **Katai H, Mizusawa J, et al.** (2019). Short-term surgical outcomes from a phase III study of laparoscopy-assisted versus open distal gastrectomy with nodal dissection for clinical stage IA/IB gastric cancer: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0912. Gastric Cancer, 20(8), 699–708.
7. **Yoshida K, Honda M, et al.** (2018). Surgical outcomes of laparoscopic distal gastrectomy compared to open distal gastrectomy: A retrospective cohort study based on a nationwide registry database in Japan. Ann of Gastroenterological Surg, 7(6), 325–9.

XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN CYP21A2 TRÊN BỆNH NHÂN TĂNG SẢN THƯỢNG THẬN BẨM SINH THIẾU 21-HYDROXYLASE THỂ NAM HÓA ĐƠN THUẦN

Trần Văn Khánh*, Vũ Chí Dũng*, **, Trần Huy Thịnh*

TÓM TẮT

Tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu hụt enzym 21-hydroxylase là bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường gây nên do đột biến gen CYP21A2. Bệnh được chia thành 3 thể bệnh lâm sàng chính là thể mất muối, thể nam hóa đơn thuần và thể không cổ điển.

*Trường Đại học Y Hà Nội

**Bệnh viện Nhi Trung ương

Chịu trách nhiệm chính: Trần Huy Thịnh

Email: tranhuythinh@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 17.12.2020

Ngày phản biện khoa học: 25.01.2021

Ngày duyệt bài: 10.2.2021

Thể nam hóa đơn thuần (hoạt tính enzyme 21-Hydroxylase còn 1-2%) có biểu hiện lâm sàng bao gồm mơ hồ giới tính, dậy thì sớm và tăng phát triển chiều cao, tuổi xương. Việc xác định đột biến có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán, đặc biệt trong trường hợp biểu hiện lâm sàng không điển hình để phân biệt thể bệnh. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: xác định đột biến trên bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh thể bệnh nam hóa đơn thuần. 20 bệnh nhân TSTTBST thể nam hóa đơn thuần được lựa chọn vào nghiên cứu. Nghiên cứu phát hiện được 6 kiểu gen, trong đó kiểu gen có tỉ lệ cao nhất là Del/p.I172N (35%), đứng thứ hai là p.I172N/ p.I172N (25%), tiếp đó là các kiểu gen I2g/p.I172N (20%), p.I172N/p.R356W (10%), p.I172N/p.Q318X và

p.I172N/p.R426C (5%). Đột biến đồng hợp tử chiếm 25%, đột biến dị hợp tử chiếm 75%. Allele đột biến có tỉ lệ xuất hiện cao nhất là p.I172N (60%), tiếp theo là Del (17%), p.R356W (10%), I2g (9%), p.Q318X (2%) và p.R426 (2%).

Từ khóa: TSTTBS, CYP21A2, MLPA, giải trình tự gen, nam hóa đơn thuần

SUMMARY

MUTATION IDENTIFICATION IN PATIENTS WITH SIMPLE VIRILIZING CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency is an autosomal recessive disorder commonly caused by CYP21A2 gene mutation. The disease is classified into three major clinical subtypes: salt wasting, simple virilizing and non-classical. Simple virilizing type (enzyme activity increased by 1 to 2% compared with Salt wasting type) with clinical manifestations including early onset puberty and increase height, bone age, with the most common clinical manifestations is gender ambiguity. Identification of mutations is important in diagnosis, especially in cases of atypical clinical presentation for accurate differentiation diagnosis. The study was conducted with the aim of identifying mutations in patients with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia due to deficiency of 21-hydroxylase. METHODS: Twenty-one patients with 21-OH CAH recruited for CYP21A2 gene analysis to identify mutations. RESULTS: Mutations were detected in 100% of patients with simple virilizing CAH. Of which homozygous mutations accounted for 25%, heterozygosity accounted for 75%. The most common genotypes were Del / p.I172N (35%), second was p.I172N / p.I172N (25%), followed by genotypes I2g / p.I172N (20%), p. I172N / p.R356W (10%), p.I172N / p.Q318X and p.I172N / p.R426C (5%). Mutation allele with the highest incidence was p.I172N (60%), followed by Del (17%), p.R356W (10%), I2g 9%), p.Q318X (2%) and p.R426 (2%).

Keywords: Congenital adrenal hyperplasia, CYP21A2, MLPA, sequencing, simple virilizing

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS) là bệnh xảy ra do giảm một phần hoặc hoàn toàn chức năng của enzym 21-hydroxylase, gây rối loạn quá trình tổng hợp cortisol từ cholesterol ở tuyến thượng thận. Mức độ nặng của các triệu chứng lâm sàng khác nhau và phụ thuộc vào hoạt độ 21-Hydroxylase (21-OH) của bệnh nhân [1], [2]. Kiểu hình lâm sàng của TSTTBS được chia ra thành thể cổ điển và thể không cổ điển. Thể cổ điển lại được chia ra thành thể cổ điển mất muối (MM) (salt wasting - SW) và nam hóa đơn thuần (NHĐT) (simple virilizing - SV) dựa trên mức độ thiếu hụt aldosterone của bệnh nhân [3], [4]. Tiêu chuẩn để phân loại kiểu hình dựa trên các triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm hormon, thể nam hóa đơn thuần có triệu chứng

lâm sàng bao gồm mơ hồ giới tính, dậy thì sớm và tăng phát triển chiều cao, tuổi xương. Hoạt độ enzyme 21-Hydroxylase của bệnh nhân thể nam hóa đơn thuần được ước tính thông qua nghiên cứu in vitro chỉ còn 1-2% so với người bình thường [5].

Có mối tương quan chặt chẽ giữa kiểu gen và kiểu hình ở bệnh nhân TSTTBS. Nghiên cứu của Krone và cộng sự đã xác định được bốn nhóm đột biến chính trong TSTTBS là NULL, A, B, C với biểu hiện lâm sàng tương ứng [3]. Trong đó nhóm NULL và A gây thể bệnh mất muối và nhóm B thường gây thể bệnh nam hóa đơn thuần. Nhóm đột biến B được định nghĩa là đột biến đồng hợp tử p.I172N hoặc dị hợp tử trong đó 1 allele mang đột biến p.I172N. Việc xác định được đột biến gen do vậy có vai trò quan trọng trong chẩn đoán sớm và dự đoán thể bệnh của bệnh nhân. Do vậy, đề tài được thực hiện với mục tiêu: xác định đột biến trên bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu hụt enzym 21-hydroxylase thể bệnh nam hóa đơn thuần.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng. 20 bệnh nhân TSTTBS thiếu enzym 21-OH thể nam hóa đơn thuần được chẩn đoán và điều trị tại Khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương.

2. Phương pháp

2.1. Kỹ thuật tách chiết DNA. DNA được tách chiết từ bạch cầu máu ngoại vi theo quy trình phenol/chloroform. Tất cả các mẫu DNA sẽ được tiến hành đo nồng độ và độ tinh sạch, chỉ có mẫu DNA đạt giá trị $\geq 1,8$ mới đạt yêu cầu về tinh sạch và được sử dụng để phân tích.

2.2 Kỹ thuật giải trình tự gen. Toàn bộ chiều dài gen CYP21A2 được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

- Thành phần phản ứng: thể tích 20 μ l gồm: 100 - 150 ng DNA, 5 pmol primer, 200 μ mol/l dNTP, 2 đơn vị enzym Taq polymerase và 2 μ l GeneAmp 10 x buffer.

- Chu trình nhiệt: 94°C/5phút, [94°C/1phút, 60°C/1phút, 72°C/1phút] x 35 chu kỳ, 72°C/2phút, giữ ở 15°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, 90V trong 30 phút.

- Sản phẩm PCR sau khi điện di trên gel agarose được tinh sạch bằng Gel purification Kit trước khi tiến hành giải trình tự gen. Để giải trình tự được toàn bộ gen CYP21A2, sử dụng các mồi như đã mô tả ở bảng 2.1. Quy trình được thực hiện theo phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).

Kết quả giải trình tự gen được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench. Mẫu DNA của bệnh nhân được so sánh với mẫu DNA đối chứng và trình tự của CYP21A2 trên GeneBank (Accession number NM_0005002)

2.3 Kỹ thuật MLPA. Sử dụng kit MLPA P050B2 (MRC- Holland) để phát hiện đột biến xóa đoạn trên bệnh nhân và người lành mang gen bệnh. Thành phần của kit gồm các đầu dò (probe) để khuếch đại gen CYP21A2, mỗi đầu dò tương ứng với một vùng gen, ngoài ra còn có các đầu dò đặc trưng cho gen của người cũng được sử dụng để làm đối chứng và 2 đầu dò cho nhiễm sắc thể X và Y để xác định giới tính. Sản phẩm khuếch đại sẽ được điện di mao quản trên máy giải trình tự. Số lượng sản phẩm khuếch đại của mỗi đầu dò sẽ tỷ lệ thuận với số bản copy của đoạn DNA đích đặc hiệu với đầu dò đó.

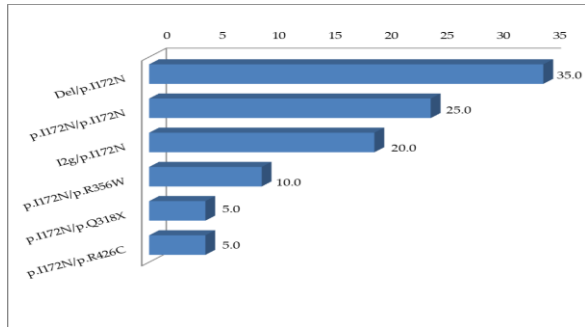
3. Đạo đức nghiên cứu trong Y học. Nghiên cứu tuân thủ tuyệt đối các quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh. Bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân hoàn toàn có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không đồng ý tiếp tục tham gia vào nghiên cứu. Bệnh nhân sẽ được thông báo về kết quả xét nghiệm gen để giúp cho các bác sỹ tư vấn di truyền hoặc lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp. Các thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo bí mật.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

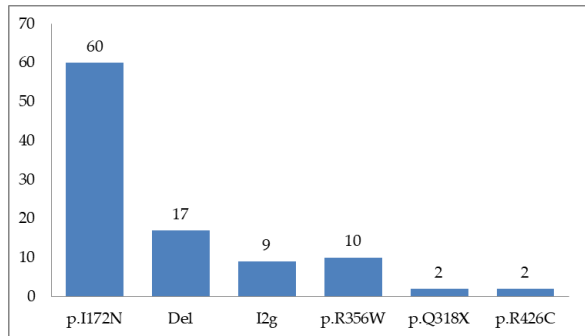
Kết quả nghiên cứu phát hiện được đột biến trên 100% số bệnh nhân TSTTBS thể nam hóa đơn thuần. Trong đó đột biến đồng hợp tử chiếm 25%, đột biến dị hợp tử chiếm 75%. Kiểu gen thường gặp nhất là Del/p.I172N (35%), đứng thứ hai là p.I172N/ p.I172N (25%), tiếp đó là các kiểu gen I2g/p.I172N (20%), p.I172N/p.R356W (10%), p.I172N/p.Q318X và p.I172N/p.R426C (5%) (Bảng 1, Hình 1).

Bảng 1. Kết quả phát hiện đột biến gen CYP21A2 của bệnh nhân

Kiểu gen	Đồng/Dị hợp tử	Số ca bệnh (n)	Tỷ lệ %
Del/p.I172N	Heterozygous	7	35
p.I172N/p.I172N	Homozygous	5	25
I2g/p.I172N	Heterozygous	4	20
p.I172N/p.R356W	Heterozygous	2	10
p.I172N/p.Q318X	Heterozygous	1	5
p.I172N/p.R426C	Heterozygous	1	5
Tổng cộng		30	100%

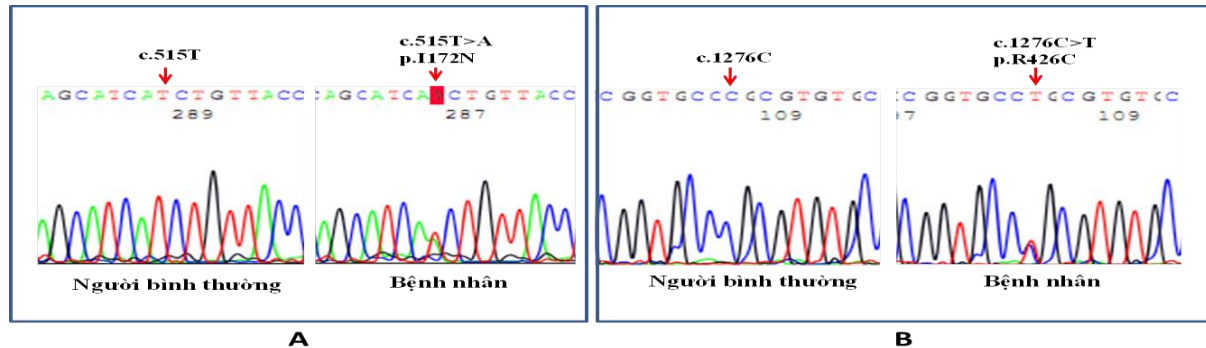


Hình 1: Tỷ lệ các kiểu gen trong nghiên cứu



Hình 2: Tỷ lệ các allele trong nghiên cứu

Tỷ lệ các allele được biểu diễn qua hình 2 trong đó allele đột biến có tỷ lệ xuất hiện cao nhất là p.I172N (60%), tiếp theo là Del (17%), p.R356W (10%), I2g (9%). Hai allele có tỷ lệ xuất hiện thấp nhất là p.Q318X (2%) và p.R426 (2%).



Hình 3: Hình ảnh đột biến dị hợp tử p.I172N và p.R426C kết hợp

Kết quả giải trình tự gen CYP21A2 trên cùng 1 bệnh nhân trong hình 3 cho thấy bị đột biến dị hợp tử p.I172N và p.R426C ở 2 vị trí: (A) thay thế nucleotid 515T>A dẫn đến bộ ba thứ 172 ATC mã hóa Isoleucin chuyển thành AAC mã hóa Asparagin (I172N), (B) thay thế nucleotid 1276C>T dẫn đến bộ ba thứ 426 CGC mã hóa Arginin chuyển thành TGC mã hóa Cystein (p.R426C).

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được đột biến trên các bệnh nhân TSTTBS thể nam hóa đơn thuần. Trong số 6 kiểu gen được xác định, kiểu gen có tỉ lệ cao nhất là Del/p.I172N (10/42; 23,8%); đứng thứ 2 là p.I172N/p.I172N (8/42; 19,1%) và I2g/p.I172N (4/42; 9,5%). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu trên 187 bệnh nhân đa chủng tộc thể nam hóa đơn thuần, trong đó kiểu gen phổ biến nhất là Del/p.I172N (28,3%); I2g/p.I172N (19,3%) và p.I172N/p.I172N (11,2%). Tỉ lệ xuất hiện allele p.I172N trong nghiên cứu của chúng tôi là 60%, tỉ lệ này trong nghiên cứu của Krone và cộng sự năm 2000 trên 155 bệnh nhân người Đức là 44,2% [3]. Sự khác biệt này có thể được giải thích do sự khác biệt về chủng tộc cũng như khác biệt trong tiêu chuẩn chọn mẫu của nghiên cứu.

Trong nghiên cứu của chúng tôi các bệnh nhân TSTTBS thể nam hóa đơn thuần đều mang ít nhất 1 allele đột biến p.I172N. Kiểu gen của các bệnh nhân trong nghiên cứu đều đủ tiêu chuẩn xếp loại vào đột biến nhóm B, là nhóm kiểu gen tương quan với kiểu hình nam hóa đơn thuần. Các nghiên cứu phân tích trên silico đều cho thấy các dự báo kiểu hình đối với các kiểu gen có đột biến p.I172N là thể NHĐT, dự đoán này đã được khẳng định bằng theo dõi lâu dài diễn biến lâm sàng. Tiếp theo thì nghiên cứu mô hình protein cũng dự báo là đột biến p.I172N gây mất bao kị nước của enzym và gây bệnh thể NHĐT. Các dự báo này được khẳng định bởi các nghiên cứu biểu hiện gen in vitro và đã cho thấy rằng đột biến p.I172N gây giảm hoạt độ 21-OH còn 2% so với bình thường [6] [2] [7]. Nghiên cứu của Krone và cộng sự cho thấy 74% số bệnh nhân mang đột biến p.I172N mắc thể nam hóa đơn thuần [3], [8].

Nghiên cứu xác định đột biến gen trên các bệnh nhân TSTTBS thể nam hóa đơn thuần sẽ góp phần vào số liệu giúp chẩn đoán và điều trị cho chương trình sàng lọc sơ sinh cũng như các bệnh nhân được chẩn đoán sớm những ngày

đầu sau sinh. Kết quả của nghiên cứu này góp phần vào thực hành tư vấn di truyền, đặc biệt trong trường hợp cả bố và mẹ đều là người mang gen. Kết quả sẽ được sử dụng phục vụ tư vấn di truyền cũng như chẩn đoán và điều trị trước sinh, giúp ngăn chặn và làm giảm tỉ lệ mắc TSTTBS.

V. KẾT LUẬN

Kết quả xác định đột biến gen trên 20 bệnh nhân TSTTBS thể nam hóa đơn thuần cho thấy 100% bệnh nhân có đột biến. Trong đó đột biến đồng hợp tử chiếm 25%, đột biến dị hợp tử chiếm 75%. Kiểu gen thường gặp nhất là Del/p.I172N (35%), đứng thứ hai là p.I172N/p.I172N (25%), tiếp đó là các kiểu gen I2g/p.I172N (20%), p.I172N/p.R356W (10%), p.I172N/p.Q318X và p.I172N/p.R426C (5%). Allele có tỉ lệ xuất hiện cao nhất là p.I172N (60%), tiếp theo là Del (17%), p.R356W (10%), I2g (9%), p.Q318X (2%) và p.R426 (2%).

Lời cảm ơn. Nghiên cứu được thực hiện sự giúp đỡ của các cán bộ của Trung tâm nghiên cứu Gen- Protein, Bộ môn Nhi, Trường Đại học Y Hà Nội; Khoa Nội tiết-Chuyển hóa- Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- White P.C. (2000).** Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocr Rev*, **21(3)**, 245–291.
- Gonçalves J., Friães A., và Moura L. (2007).** Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Expert Rev Mol Med*, **9(11)**, 1–23.
- Krone N., Braun A., Roscher A.A. và cộng sự. (2000).** Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab*, **85(3)**, 1059–1065.
- New M.I. (2003).** Inborn errors of adrenal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, **211(1–2)**, 75–84.
- Merke D.P. và Bornstein S.R. (2005).** Congenital adrenal hyperplasia. *The Lancet*, **365(9477)**, 2125–2136.
- Zhao B., Lei L., Kagawa N. và cộng sự. (2012).** Three-dimensional Structure of Steroid 21-Hydroxylase (Cytochrome P450 21A2) with Two Substrates Reveals Locations of Disease-associated Variants. *J Biol Chem*, **287(13)**, 10613–10622.
- Krone N., Dhir V., Ivison H.E. và cộng sự. (2007).** Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **66(2)**.
- Narasimhan M.L. and Khattab A. (2019).** Genetics of congenital adrenal hyperplasia and genotype-phenotype correlation. *Fertil Steril*, **111(1)**, 24–29