

SÀNG LỌC ĐỘT BIẾN V176SfsX28 VÀ P1273Q TRÊN GEN ATP7B CHO CÁC THÀNH VIÊN TRONG GIA ĐÌNH GỒM 3 THẾ HỆ CỦA BỆNH NHÂN WILSON

Nguyễn Thị Mai Hương¹, Ngô Diễm Ngọc¹, Nguyễn Phạm Anh Hoa²,
Nguyễn Thị Phương Mai¹, Ngô Mạnh Tiến¹, Ngô Thị Tuyết Nhung¹, Lê Thanh Hải^{1&2}

¹Khoa Di truyền và Sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương;

²Khoa Gan - Mật, Bệnh viện Nhi Trung ương

TÓM TẮT

Wilson là bệnh di truyền lặn trên NST thường (13q.14.3) do đột biến gen ATP7B mã hóa cho protein ATPase, có chức năng vận chuyển đồng từ gan để bài tiết ra ngoài thông qua mật. Rối loạn chức năng protein ATPase là nguyên nhân dẫn đến đồng tích lũy phần lớn tại gan và một số cơ quan khác chẳng hạn như não, thận và do đó gây ra các bệnh liên quan đến gan, tâm thần và thần kinh. **Mục tiêu:** Phát hiện đột biến cho 23 thành viên trong gia đình gồm 3 thế hệ của một bệnh nhân Wilson. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 23 thành viên trong một gia đình gồm 3 thế hệ của một bệnh nhân Wilson được sàng lọc đột biến V176SfsX28 và P1273Q trên gen ATP7B bằng kỹ thuật giải trình tự gen. **Kết quả:** nghiên cứu đã phát hiện thêm 1 bệnh nhân Wilson bị đột biến dị hợp tử kép; 10 người mang gen bệnh và 12 người không bị đột biến gen. **Kết luận:** Sàng lọc đột biến cho các thành viên trong gia đình có ý nghĩa quan trọng trong thực hành lâm sàng, tư vấn di truyền trước sinh và tư vấn di truyền tiền hôn nhân.

Từ khóa: Bệnh Wilson, đột biến gen ATP7B, đột biến đích, sàng lọc đột biến, giải trình tự gen.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE V176SfsX28 AND P1273Q MUTATION OF THE WILSON DISEASE ATP7B GENE IN THREE GENERATIONS OF A FAMILY

Wilson is a recessive hereditary disease (13q.14.3) caused by ATP7B gene mutation that encodes ATPase protein, which transports copper from the liver to excretion via the bile. Protein ATPase dysfunction is a major cause of co-accumulation in the liver and other organs such as the brain and kidneys, and thus causes liver and neurological diseases. **Objective:** To perform genetic analysis for 23 components in three generations of the Wilson family. **Subjects and Methods:** 23 members in three generations of a Wilson patient were screened for targeted ATP7B gene mutation by direct sequencing. **Results:** The study found one more Wilson patient with compound heterozygous ATP7b gene mutations; 10 other members were carriers and 12 remainings were normal. **Conclusion:** Screening of targeted ATP7B gene mutations for family members of probands is important in clinical practice and prenatal genetic counseling and pre-marriage genetic counseling.

Từ khóa: Wilson disease, ATP7B gene mutation, screening targeted mutation, sequencing.

Nhận bài: 2-10-2018; Thẩm định: 15-10-2018; Chấp nhận: 25-1-2019

Người chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Mai Hương

Địa chỉ: Email: nguyenmaihuong@nch.org.vn

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Wilson là một bệnh di truyền lặn hiếm gặp trên thế giới với tỷ lệ mắc từ 1/5000 đến 1/30000 trẻ đẻ sống do đột biến gen ATP7B [7, 13]. Gen ATP7B nằm trên NST số 13 (13q14.3), mã hóa protein ATPase (P type ATPase copper transporting beta peptide) nhóm photphat và có vai trò quan trọng trong quá trình vận chuyển, hấp thu và đào thải đồng [6, 7]. Kích thước toàn bộ gen ATP7B vào khoảng 80 kb, gồm có 21 exon và 20 intron, khung đọc mở có kích thước 4,3 kb [8]. Rối loạn chức năng protein ATPase là nguyên nhân dẫn đến đồng tích lũy phần lớn tại gan và một số cơ quan khác chẳng hạn như não, thận, và do đó gây ra các bệnh liên quan đến gan, tâm thần và thần kinh [8, 13].

Bệnh Wilson khởi phát ở nhiều độ tuổi khác nhau, thường gặp nhất là từ 5 đến 35 tuổi. Bệnh nhân nhỏ tuổi nhất được chẩn đoán lúc 3 tuổi [13] và lớn tuổi nhất đã ngoài 80 tuổi [6]. Khi được chẩn đoán sớm, bệnh nhân Wilson sẽ được điều trị sớm và tránh các biểu hiện, biến chứng nguy hiểm của bệnh. Bệnh nhân Wilson có thể được

chẩn đoán theo thang điểm Leipzig nhưng người mang gen bệnh chỉ được phát hiện bằng nghiệm di truyền nhờ sàng lọc đột biến gen ATP7B bởi họ hầu như không có biểu hiện lâm sàng và bất thường trên xét nghiệm sinh hóa [6]. Chính vì thế, nghiên cứu đã được thực hiện với mục tiêu: *Phát hiện đột biến cho 23 thành viên trong 3 thế hệ của một bệnh nhân Wilson.*

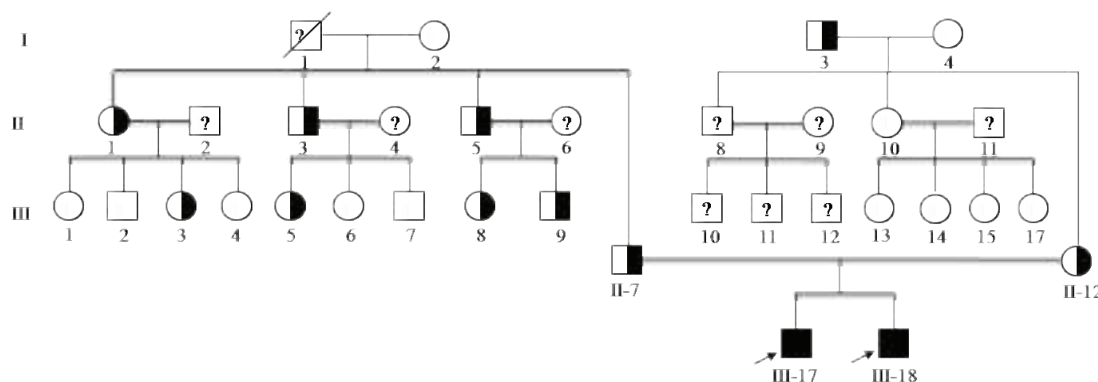
2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tổng số có 23 thành viên trong gia đình bệnh nhân tham gia nghiên cứu. Như trên hình 1, nghiên cứu đã tiến hành sàng lọc đột biến chỉ điểm cho 3 thế hệ của gia đình bệnh nhân III₁₇.

- Thế hệ I: Bà Nội (I₂) và ông bà ngoại (I₃, I₄) của bệnh nhân. Ông nội của bệnh nhân đã chết trước khi nghiên cứu được thực hiện.

- Thế hệ II: Bố mẹ bệnh nhân (II₇, II₁₂), một chị gái (II₁) và 2 anh trai (II₃, II₅) của bố bệnh nhân. Chị gái của mẹ bệnh nhân (II₁₀). Một người anh trai của mẹ bệnh nhân từ chối tham gia nghiên cứu.



Hình 1. Phả hệ của gia đình bệnh nhân mã số WBW120501

- | | |
|-----------------------|----------------------|
| Nam mang gen bệnh | Nữ mang gen bệnh |
| Nam bị bệnh | Nam đã mất |
| Nam không có đột biến | Nữ không có đột biến |
| Bệnh nhân | Chưa phân tích gen |

- Thế hệ III: Em trai bệnh nhân (III₁₈); tổng số có 13 anh, chị em họ của bệnh nhân bao gồm: 3 người anh họ (III₂, III₇, III₉) và 10 người chị họ (III₁, III₃, III₄, III₅, III₆, III₈, III₁₃, III₁₄, III₁₅, III₁₆).

2.2. Phân tích đột biến gen ATP7B

Mẫu bệnh phẩm được sử dụng trong nghiên cứu là 2 ml máu ngoại vi, chống đông EDTA sẽ được tách DNA bằng kit QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen, Đức). Mẫu DNA được sử dụng để làm khuôn cho phản ứng PCR nhằm khuếch đại 21 exon và vùng intron lân cận giữa các exon của gen ATP7B bằng 21 cặp mỗi đặc hiệu (Invitrogen, Hoa Kỳ). Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trên máy ABI-3130 (Applied Biosystems, Foster City, Hoa Kỳ). Kết quả giải trình tự gen được phân tích bằng phần mềm ChromasPro, Seqscape v2.5

và so sánh với trình tự chuẩn NT_024524 trên Ngân hàng gen quốc tế.

2.3. Đạo đức nghiên cứu

Trước khi tiến hành nghiên cứu, bệnh nhân và gia đình bệnh nhân được tư vấn di truyền và ký cam kết đồng thuận tham gia nghiên cứu. Thông tin và kết quả xét nghiệm của các bệnh nhân và người nhà được giữ bí mật.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

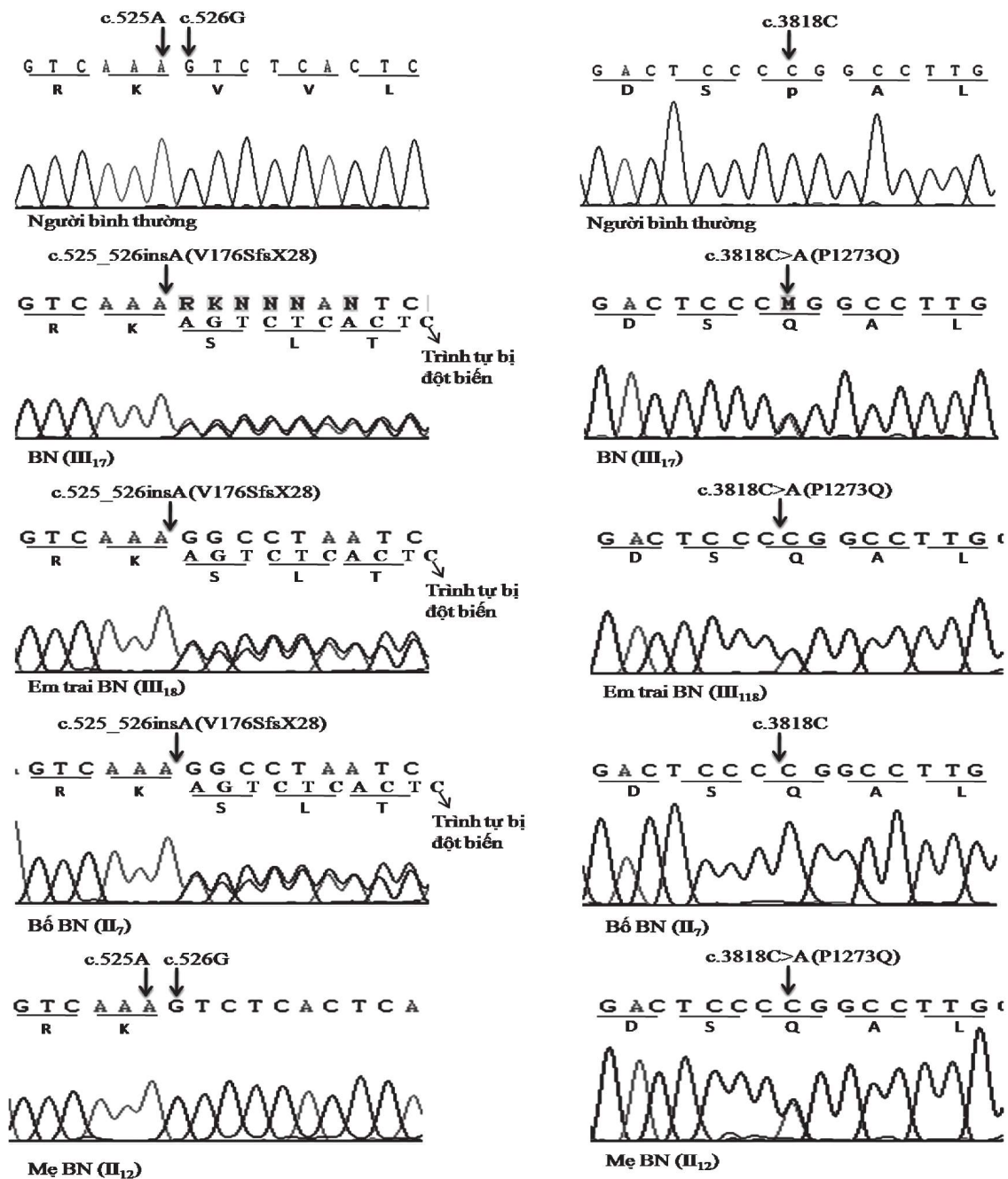
Kết quả sàng lọc đột biến gen ATP7B đã được tóm tắt trên hình 1. Nghiên cứu đã phát hiện em trai của bệnh nhân (III₁₈) bị đột biến dị hợp tử kép V176SfsX28/P1273Q giống với kiểu gen của bệnh nhân (III₁₇) với đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng đã đủ để chẩn đoán bệnh Wilson.

Bảng 1. Kết quả sàng lọc đột biến cho 23 thành viên trong gia đình bệnh nhân Wilson

Kết quả	Tần suất (n)
Bị bệnh	1
Có mang gen bệnh	10
Không mang gen bệnh	12
Tổng	23

Qua phân tích kết quả sàng lọc đột biến đích cho các thành viên trong gia đình của bệnh nhân, nghiên cứu đã xác định bố (II₇) và mẹ (II₁₂) của bệnh nhân lần lượt bị đột biến dị hợp tử V176SfsX28 và P1273Q. Bà nội của bệnh nhân (I₂) không bị đột

biến V176SfsX28; 3 người bác (II_{1,3,5}) và 4 người anh/chị họ của bệnh nhân (III_{3,5,8,9}) bị đột biến dị hợp tử V176SfsX28; ông ngoại của bệnh nhân bị đột biến dị hợp tử P1273Q và bà ngoại (I₄), bác (II₉), anh/chị họ (III₁₃₋₁₇) của bệnh nhân không bị đột biến P1273Q.



Hình 2. Trình tự gen của gia đình bệnh nhân trong nghiên cứu

Bệnh nhân (III₁₇) và em trai có 2 đột biến dị hợp tử: (1) thêm 1 nucleotid A vào giữa 2 nucleotid ở vị trí c.525_526 khiến cho bộ ba GTC mã hóa mã hóa valin (V) thứ 176 chuyển thành bộ ba AGT mã hóa serin (S) và tạo mã kết thúc (X) cách vị trí bị đột biến 28 acid amin (V176SfsX28); (2) đột biến thay thế nucleotid C tại vị trí c.3818 bằng nucleotid A đã làm bộ ba CCG mã hóa prolin (P) thứ 1273 chuyển thành bộ ba CAG mã hóa glutamin (Q) (P1273Q).

4. BÀN LUẬN

Đột biến V176SfsX28 và P1273Q là hai trong số các đột biến có tỷ lệ phát hiện cao trên bệnh nhân Wilson ở Việt Nam [1]. Đột biến V176SfsX28 có thể ảnh hưởng đến quá trình gắn đồng 1, trong khi đột biến P1273Q xảy ra trên exon 18 là một vùng bản lề của ATP (ATP hinge). Vùng liên kết với kim loại đồng gồm 6 vị trí, từ 1-6, có vai trò then chốt trong việc tiếp nhận đồng từ ATOX1 thông qua tương tác giữa protein và protein, vùng này ảnh hưởng không đều đến hoạt động của ATP7B bởi vùng liên kết với kim loại 5 và 6 có ảnh hưởng lớn hơn đến việc kích hoạt xúc tác ATP7B so với vùng liên kết với kim loại 1-4 [1, 3, 4]. Tuy nhiên, V176SfsX28 là một đột biến thêm nucleotide trên exon 2 của gen ATP7B, nó có thể đã ảnh hưởng nghiêm trọng đến quá trình dịch mã và do đó tạo thành sản phẩm protein bất thường hoặc có thể không có sản phẩm của dịch mã. Vì vậy, đột biến V176SfsX28 đã ảnh hưởng đến biểu hiện bệnh sớm hoặc liên quan đến mức độ nghiêm trọng trên kiểu hình của bệnh nhân Wilson.

Việc phát hiện người mang gen bệnh có ý nghĩa quan trọng trong tư vấn tiền hôn nhân và tư vấn di truyền nhằm tránh nguy cơ sinh con bị bệnh [11]. Họ hàng của bệnh nhân là những người có nguy cơ mang gen bệnh vì đột biến gen được di truyền ngẫu nhiên trong nhiều thế hệ của một phả hệ. Nếu một cá nhân bị đột biến, tỷ lệ mang gen bệnh của người thân của họ ở thế hệ thứ ba, chẳng hạn như anh, em họ là 1/8 [11, 12, 14]. Như vậy, xét nghiệm di truyền không những có vai trò quan trọng trong chẩn đoán xác định, chẩn đoán phân biệt bệnh Wilson mà còn là phương pháp duy nhất để phát hiện sớm người bệnh chưa có biểu hiện lâm sàng cũng như người mang gen bệnh, giúp họ được điều trị và tư vấn di truyền, đặc biệt là tư vấn di truyền tiền hôn nhân. Đó cũng là một cách làm giảm nhẹ gánh nặng tâm lý và chi phí khám chữa bệnh của gia đình bệnh nhân. Đặc biệt, phát hiện đột biến gen ATP7B là một phương pháp duy nhất, không có cách nào thay thế được trong sàng lọc người hiến

tặng cho các bệnh nhân Wilson suy gan cấp và tối cấp cần ghép gan cấp cứu để duy trì sự sống [6]. Người hiến tặng phải là người hoàn toàn không bị bệnh hoặc không mang gen bệnh. Nhưng người cho tặng thường là các thành viên trong gia đình bệnh nhân vì họ có khả năng phù hợp ghép cao và dễ lựa chọn trong quá trình ghép gan cấp cứu. Tuy vậy, họ là những người có nguy cơ cao bị bệnh hoặc mang gen bệnh nên người hiến tặng cần được phân tích gen ATP7B trước khi tiến hành ghép tạng và chỉ được chẩn đoán xác định bằng các xét nghiệm di truyền.

5. KẾT LUẬN

Sàng lọc đột biến cho các thành viên trong gia đình có ý nghĩa quan trọng trong thực hiện hành lâm sàng và tư vấn di truyền trước sinh và tư vấn di truyền tiền hôn nhân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Mai Hương, Nguyễn Phạm Anh Hoa, Lê Thanh Hải và cs. Áp dụng phương pháp phân tích đột biến gen ATP7B để phát hiện sớm người mắc bệnh Wilson chưa có triệu chứng lâm sàng (2018). Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam 60(7): 6-12.
2. Brewer GJ, Fred K. Askari Wilson's disease: clinical management and therapy (2005). J Hepatol 42 (1): 13-21.
3. Chang IJ, Hahn SH. The genetics of Wilson disease (2017). Handb Clin Neurol 142 (3rd series): 19-34.
4. Chen C, Shen B, Wang XP et al. Currently clinical views on genetics of Wilson's disease (2015). Chinese Med J 128(13): 1826-1830.
5. Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update (2006). Nat Clin Pract Neurol 2(9): 482-493.
6. Ferenci P, Czlonkowska A, et al. Moradpour D (European Association for the study of the liver) (2012). EASL Clinical practice guidelines: Wilson's disease. J Hepatol 56(3): 671-85.

- 7. Forbes JR, Cox DW.** Functional characterization of missense mutations in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant? (1998). *Am J Hum Genet* 63(6): 1663-1674.
- 8. Kenney SM, Cox DW.** Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B (2007). *Hum Mutat* 28(12): 1171-1177.
- 9. Lee HJ, Seong WJ, Hong SY, Bae JY.** Successful pregnancy outcome in a Korean patient with symptomatic Wilson's disease (2015). *Obstet Gynecol Sci* 58(5):409-413.
- 10. Leggio L, Malandrino N, Addolorato G et al.** Analysis of the T1288R mutation of the Wilson disease ATP7B gene in four generations of a family: Possible genotype-phenotype correlation with hepatic onset (2007). *Dig. Dis. Sci* 52: 2570-2575.
- 11. Maleki. I, Zali M.R, Abadi H.N.** Novel mutation of ATP7B gene in Iranian patients with Wilson' disease (2013). *Res Mol Med* 1(1): 44-47.
- 12. Manoochehri J, Masoumi RD, Faradaei M et al.** Family screening for a novel ATP7B gene mutation, c.2335T>G, in the South of Iran (2014). *Iran J Ped Hematol Oncol* 4(1): 26-31.
- 13. Roberts EA, Schilsky ML.** A practice guideline on Wilson disease (2003). *Hepatology* 37(6): 1475-1492.
- 14. Zong YN, Kong XD.** Analysis and application of ATP7B gene mutations in 35 patients with hepatolenticular degeneration (2015). *Genet. Mol. Res.*14(4): 18764-18770.