

ĐỘT BIẾN ĐỒNG HỢP TỬ p.C222R GEN *LDLR* TRONG PHẢ HỆ BỆNH NHÂN TĂNG CHOLESTEROL MÁU CÓ TÍNH CHẤT GIA ĐÌNH

Hoàng Thị Yến^{1,✉}, Vũ Đức Anh², Đỗ Thị Thanh Mai³, Vũ Chí Dũng³, Đặng Thị Ngọc Dung²

¹Bệnh viện Tim Hà Nội, ²Trường Đại học Y Hà Nội, ³Bệnh viện Nhi Trung ương

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. Các nghiên cứu phát hiện hơn 1.000 đột biến của gen *LDLR* đã được xác định trên nhóm bệnh nhân FH với tỷ lệ mắc từ 1:500 đến 1:300. Đột biến gây bệnh xảy ra chủ yếu trên các gen: *LDLR*, *apoB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, 80% trong đó phát hiện đột biến gen *LDLR*. Hiện nay bệnh FH còn chưa được quan tâm một cách thực sự, dẫn tới sự chậm trễ trong điều trị. Nhân một bệnh nhân nữ 8 tuổi mã số MS15 đã được chẩn đoán FH và phát hiện đột biến đồng hợp tử p.C222R trên gen *LDLR*, nghiên cứu được thực hiện nhằm phát hiện đột biến gen *LDLR* ở các thành viên còn lại trong gia đình bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Kết quả: 13/21 thành viên trong gia đình mang đột biến dị hợp tử c.664 T>C (p.C222R) trên exon 4. Đột biến này xuất hiện ở cả hai bên gia đình nội và ngoại của bệnh nhân là cơ sở giúp tư vấn và điều trị sớm cho những thành viên trên, giảm thiểu nguy cơ mắc các bệnh lý mạch vành sau này.

Từ khóa: Tăng cholesterol máu có tính chất gia đình, đột biến gen *LDLR*, exon 4

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tăng cholesterol đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành, phát triển và nứt vỡ của mảng xơ vữa, làm tăng các nguy cơ mắc bệnh tim mạch (coronary heart disease: CHD) nguyên phát và tử vong. Bệnh mạch vành là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong 10 năm trở lại đây.¹ 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%.²⁻⁴

Viện quốc gia về y tế và lâm sàng của Anh (NICE) đã đưa ra khuyến cáo về sàng lọc phân tầng 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 quả.⁵

Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả một trường hợp điển hình đã được chẩn đoán FH theo tiêu chuẩn của Simon Broome và đã phát hiện có đột biến đồng hợp tử exon 4. Tiến hành xác định đột biến gen *LDLR* ở các thành viên còn lại trong gia đình của bệnh nhân và lập phả

Tác giả liên hệ: Hoàng Thị Yến,

Bệnh viện Tim Hà Nội

Email: yenhoangbvtim@gmail.com

Ngày nhận: 23/10/2019

Ngày được chấp nhận: 13/11/2019

hệ để tìm quy luật di truyền. Kết quả rất có ý nghĩa trong việc phát hiện sớm, tư vấn và dự phòng biến chứng kịp thời cho các thành viên trong gia đình mang gen bệnh.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

- Bệnh nhân được chẩn đoán FH theo tiêu chuẩn Simon Broome⁴ và được xác định có đột biến đồng hợp tử: c.664 T>C (p.C222R) trên exon 4 gen *LDLR*.

- Tiến hành xác định đột biến trên 21 thành viên còn lại trong gia đình bệnh nhân bị FH. Các thành viên này nằm trong 3 thế hệ gia đình bệnh nhân.

2. Thời gian và địa điểm

- 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.

3. Phương pháp

III. KẾT QUẢ

1. Chẩn đoán trên bệnh nhân MS15

Bệnh nhân nữ sinh năm 2011 vào viện vì xuất hiện nhiều u vàng dưới da vùng mông và khớp gối 2 bên, cổ tay và khuỷu tay 2 bên (hình 1). Dưới 1 tuổi bệnh nhân đã xuất hiện u vàng dưới da.



Hình 1. Hình ảnh u vàng tại vùng mông, đầu gối và khuỷu tay

Lúc vào viện (năm 2014): khám có nhiều u vàng dưới da khớp gối 2 bên, vùng mông, cổ tay và khuỷu tay 2 bên. Kết quả xét nghiệm máu thời điểm vào viện: Cholesterol tăng cao (19,1 mmol/l); LDL - C tăng cao (15,4 mmol/l). Bệnh nhân MS15 thỏa mãn các tiêu chuẩn Simon Broome [4] và được chẩn đoán là FH.

Tiến hành giải trình tự gen *LDLR* của bệnh nhân MS15 phát hiện có đột biến đồng hợp tử: c.664 T > C (p.C222R) trên exon 4 đã được công bố và được cho là đột biến gây bệnh. Tiến hành phân tích

- Lấy mẫu: 21 thành viên trong gia đình sẽ được lấy 4ml máu tĩnh mạch (2ml chống đông bằng EDTA và 2ml chống đông bằng heparin).

- Một số kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu:

(1) Thực hiện các xét nghiệm lipid máu: cholesterol, Triglycerid, HDL - C, LDL - C trên các thành viên gia đình. (2) Sử dụng kỹ thuật tách chiết DNA bằng kit Exgene Blood SV mini. (3) Sử dụng kỹ thuật PCR với cặp mồi được thiết kế đặc hiệu với exon 4. (4) Giải trình tự gen trên hệ thống máy ABI 3730 XL và so sánh với trình tự exon 4 gen *LDLR* trên GeneBank để xác định đột biến trên các thành viên.

4. Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm thống kê y học phù hợp với nghiên cứu.

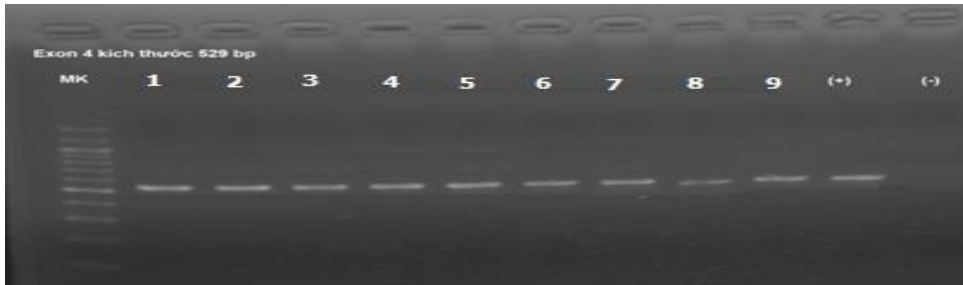
5. Đạo đức trong nghiên cứu

Đề tài tuân thủ đạo đức trong nghiên cứu y sinh và đã được Hội đồng Đạo đức Trường Đại học Y Hà Nội chấp thuận theo số 187/HĐĐĐHYHN ngày 20/02/2016.

xác định loại đột biến này trên exon 4 gen *LDLR* ở các thành viên còn lại trong gia đình.

2. Kết quả điện di kiểm tra chất lượng sản phẩm PCR

Một cặp mồi đặc hiệu được sử dụng để khuếch đại exon 4 gen *LDLR* trên bệnh nhân MS15 và 20 thành viên còn lại trong gia đình bệnh nhân. Kích thước sản phẩm PCR exon 4 – 529 bp.

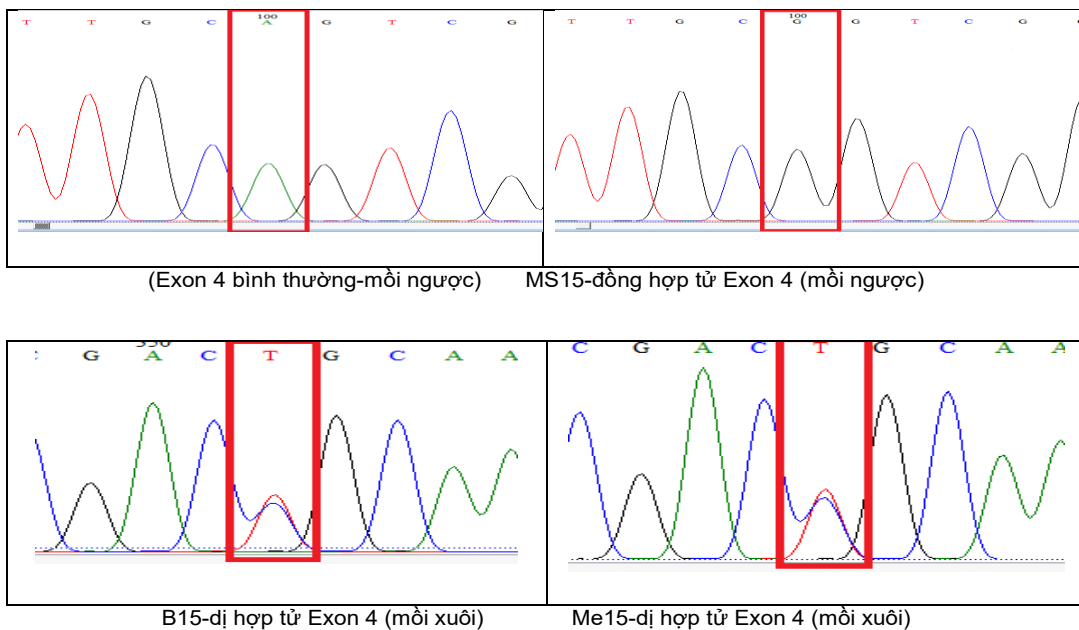


Hình 2. Hình ảnh đại diện kết quả điện di sản phẩm PCR exon 4 gen *LDLR*. Trong đó: 1→ 9 là các thành viên trong gia đình, (+): mẫu đối chứng dương, (-): mẫu đối chứng âm, MK: thang 100 bp. Chúng tôi làm tương tự như vậy với các thành viên còn lại.

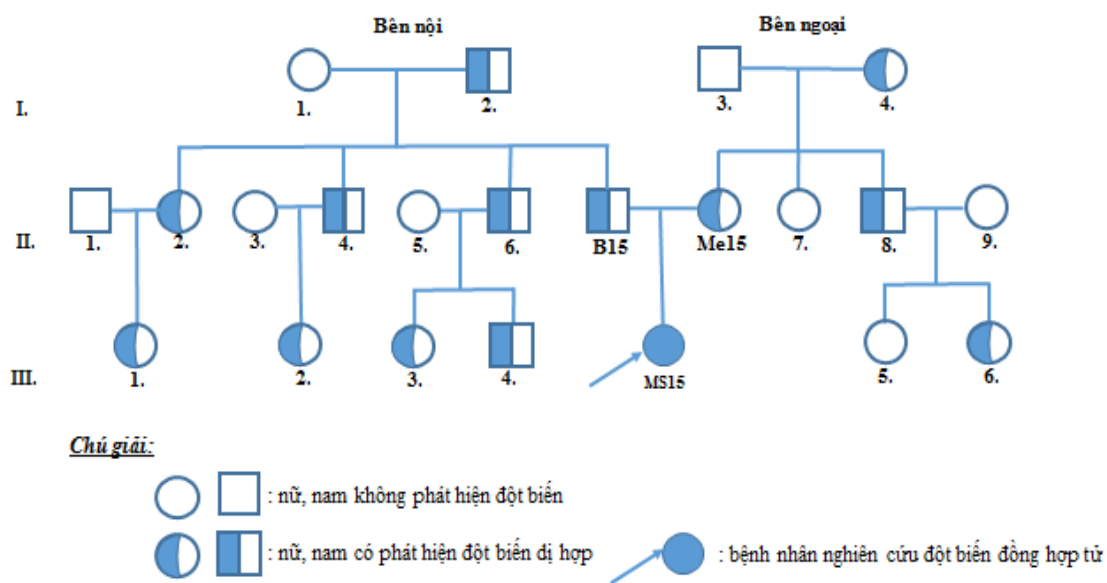
Kết quả PCR cho thấy hình ảnh các sản phẩm 1 băng đặc hiệu, đủ điều kiện tiến hành phân ứng giải trình tự tiếp theo.

3. Kết quả xác định đột biến gen *LDLR*

Kết quả 13/21 thành viên thuộc 3 thế hệ trong gia đình bệnh nhân FH có đột biến dị hợp tử gen *LDLR*; 8/21 thành viên không có đột biến trên exon 4, trong đó 4 thành viên không có quan hệ huyết thống, 13/21 thành viên có quan hệ huyết thống, bệnh nhân MS15 có đột biến đồng hợp tử cùng loại đột biến: c.664 T > C (p.C222R) trên exon 4. Đột biến này mã hóa sai acid amin Cystein thành Arginin tại codon 222.



Hình 3. Hình ảnh giải trình tự gen *LDLR* của bệnh nhân MS15 và các thành viên trong gia đình mang đột biến c.664 T > C (p.C222R) trên exon 4



Hình 4. Phả hệ của gia đình bệnh nhân FH mã số MS15

4. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của các thành viên có đột biến

Bảng 1. Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của các thành viên có đột biến

STT	Mã số Bệnh nhân	Giới	Tuổi	U vàng	Cholesterol	LDL - C
1	MS15	Nữ	8	+	19,1 16,0	15,4 14,4
2	Me15	Nữ	34	-	6,0	4,4
3	B15	Nam	34	-	6,5	5,0
4	I.2	Nam	55	-	8,4	6,8
5	I.4	Nữ	59	-	9,1	7,6
6	II.8	Nam	31	-	8,2	6,5
7	III.6	Nữ	3	-	6,1	4,7
8	II.6	nam	33	-	5,4	4,4
9	III.3	nam	5	-	7,0	5,6
10	III.4	Nữ	2	-	5,3	4,5
11	II.2	Nữ	29	-	5,9	4,8
12	III.1	Nữ	6	-	7,3	6,1
13	II.4	Nam	31	-	8,3	6,2
14	III.2	Nữ	4	-	6,9	5,3

Cholesterol TB nhóm dị hợp tử: 7,08 mmol/l (n=13)/đồng hợp tử: 19,1 mmol/l

LDL - C TB nhóm dị hợp tử: 5,68 mmol/l (n=13) /đồng hợp tử: 15,4 mmol/l

IV. BÀN LUẬN

Năm 1938, Carl Müller nhận ra sự liên hệ giữa tăng nồng độ cholesterol huyết thanh, xanthomas gân và vữa xơ động mạch ở các thành viên của một nhóm gia đình và đưa ra giả thuyết đây là một bệnh di truyền đơn gen.⁶ Năm 1964, FH được xác định như một bệnh di truyền trội trên NST số 19 gen *LDLR* và mô tả sự khác biệt về lâm sàng giữa dạng đồng hợp tử và dị hợp tử.⁷ 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 cholesterol LDL huyết thanh. Từ đó làm suy yếu sự thanh thải và nội hóa LDL, dẫn đến thiếu sự ức chế tổng hợp cholesterol nội bào và tích tụ LDL trong lòng mạch.⁸ Xanthoma (từ Hy Lạp: màu vàng) là các mảng hoặc nốt sần bao gồm sự lắng đọng lipid bất thường trong các tế bào bọt (đại thực bào chứa lipid) và collagen. Vì cholesterol không bị phân hủy, nó tích tụ trong các tế bào này, gây phản ứng viêm, tạo ra các đại thực bào bọt xốp và xơ hóa tại những vùng này.⁹

Exon 4 mã hóa cho vùng phối tử của thụ thể làm trung gian cho sự tương tác với lipoproteins. Đột biến trên exon 4 là một đột biến gặp với tỷ lệ cao,⁵ lý do đột biến exon 4 gặp với tỷ lệ cao ở nhiều nghiên cứu, một phần do sự trội hơn của các trình tự CpG ở trên exon này.⁷ Một lý do khác do đây là vị trí duy nhất mã hóa cho cả đoạn gắn *apoB* và *apoE*, các đoạn trong vùng gắn phối tử chỉ mã hóa cho đoạn gắn *apoB*.⁷ Vì vậy nên các đột biến ở vùng chìa khóa này thường ảnh hưởng có hại một cách rõ rệt đến chức năng của thụ thể LDL, dẫn tới những cá thể mang các đột biến này thường biểu hiện rối loạn lipid điển hình, từ đó bệnh nhân dễ được phát hiện hơn và exon 4 cũng là exon dài nhất.

Đột biến p.C222R phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi được cho là gây bệnh và đã được công bố trong nhiều nghiên cứu trước đây.^{3,4,10}

Bệnh nhân MS15 là một trường hợp đồng hợp tử exon 4 nhận đột biến từ cả bố và mẹ, là đột biến đã công bố gây bệnh, chính vì vậy biểu hiện mức độ xanthomas gân ở nhiều vị trí và diện rộng cùng với mức độ tăng nặng cholesterol và LDL - C trong máu. Cả bố và mẹ bệnh nhân đều có cùng loại đột biến dị hợp tử trên exon 4, thế hệ con sinh ra có khả năng đột biến đồng hợp tử exon 4 là 25%, mang đột biến dị hợp tử là 50%, còn 25% còn lại là trường hợp bình thường. Thật không may mắn, bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi hiện tại là đứa con đầu và là đứa con duy nhất nhưng lại nhận đột biến từ cả bố và mẹ. Mức độ trầm trọng và tiên lượng ở những bệnh nhân FH thể đồng hợp tử phụ thuộc mức độ hoạt động của thụ thể được đánh giá trong nguyên bào sợi được nuôi cấy, nếu < 2% hoạt động bình thường (âm tính) thường khó sống qua được 20 tuổi, tuy nhiên nhóm 2 - 25% thụ thể hoạt động bình thường (nhóm thiếu hụt) thường tiên lượng tốt hơn nhóm trên, và thường xuất hiện bệnh lý mạch vành năm 30 tuổi.⁸ Những bệnh nhân ở dạng đồng hợp tử thường đáp ứng rất kém với các biện pháp điều trị thông thường như thay đổi chế độ sống, điều trị kết hợp các nhóm thuốc statin...thường phải cân nhắc một cách nghiêm túc trong vấn đề ghép gan, hoặc các biện pháp lọc loại bỏ LDL - C ra khỏi máu.¹¹ Hiện tại bệnh nhân Ms15 đang được điều trị với statin và một nhóm ức chế hấp thụ cholesterol và chế độ ăn được kiểm soát, tuy nhiên mức độ cải thiện đáp ứng vẫn chưa tốt thể hiện trên xét nghiệm cholesterol và LDL - C. Khuyến cáo các biện pháp điều trị tích cực và theo dõi sát (siêu âm mạch đánh giá mức độ xơ vữa, xét nghiệm cholesterol, LDL - C...) là vô cùng cần thiết và quan trọng với bệnh nhân MS15 trong

ngăn ngừa nhồi máu cơ tim và tử vong sớm.

Kết quả xét nghiệm cholesterol và LDL - C của các thành viên trong gia đình hoàn toàn phù hợp với kết quả xác định đột biến dạng dị hợp tử gen *LDLR*, 13/21 thành viên trong gia đình có đột biến dị hợp tử trên exon 4 với mức cholesterol trung bình là 7,08 mmol/l và mức LDL - C trung bình là 5,68 mmol/l. Các thành viên này đều chưa được chẩn đoán FH tại thời điểm bắt đầu tiến hành nghiên cứu và cũng chưa bao giờ được xét nghiệm kiểm tra chỉ số lipid máu cho nên tới thời điểm hiện tại không có chế độ dinh dưỡng cũng như 1 chế độ luyện tập phù hợp. Việc phát hiện những người mang gen bệnh cùng với các xét nghiệm chúng tôi tiến hành tư vấn cho các thành viên này về chế độ ăn, sinh hoạt cũng như khuyến cáo tới bệnh viện khám, theo dõi. Nghiên cứu các trường hợp này nhấn mạnh rằng mặc dù tiến bộ y tế rất lớn, nhưng bệnh FH vẫn chưa được chú trọng trong chẩn đoán một cách đúng mực, dẫn tới sự chậm trễ trong điều trị.¹² 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 rất quan trọng không chỉ đối với tiên lượng của bệnh nhân mà còn có ý nghĩa vô cùng quan trọng đối với các thành viên gia đình cùng mắc thể bệnh FH. Do đó, tư vấn di truyền và sàng lọc phân tử các thành viên trong gia đình của bệnh nhân 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.¹²

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định đột biến đồng hợp tử exon4 trên bệnh nhân và hầu hết các thành viên trong gia đình ở dòng họ nội và dòng họ ngoại đều có cùng loại đột biến p.C222R dị hợp

tử exon 4. Bệnh nhân đồng hợp tử có mức tăng cholesterol và LDL - C máu nặng cùng với biểu hiện xanthomas gân điển hình trên lâm sàng, bệnh nhân đáp ứng kém với thuốc điều trị: statin và ezetimibe. Tất cả các thành viên trong gia đình có đột biến đều không được chẩn đoán FH cho đến thời điểm nghiên cứu nên không được tư vấn điều trị và dự phòng. Do đó, sàng lọc phân tử các thành viên trong gia đình của bệnh nhân đóng một vai trò quan trọng trong việc phát hiện, tư vấn di truyền 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, không hoặc tăng nhẹ lipid máu.

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

1. Wang Z và Ge J. Managing hypercholesterolemia and preventing cardiovascular events in elderly and younger Chinese adults: focus on rosuvastatin. *Clin Interv Aging*. 2014;9:1 - 8.
2. Varret JM, Abifadel M, Rabes JP et al . Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet*. 2008;73(1):1 - 13.
3. Varret JM. Missense Mutation in the *LDLR* gene: A Wide Spectrum in the Severity of Familial Hypercholesterolemia. *Intech*. 2012;55 - 70.
4. Henderson R, O'Kane M, McGilligan V. et al. The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. *J Biomed Sci*. 2016;23:39.
5. DeMott K, Nherera L, Shaw EJ et al (2008). Clinical Guidelines and Evidence Review for Familial hypercholesterolaemia: the

identification and management of adults and children with familial hypercholesterolaemia., *National Collaborating Centre for Primary Care and Royal College of General Practitioners. London. 2008.*

6. Müller Carl. (1938). Xanthomata, Hypercholesterolemia, Angina Pectoris. *Acta Medica Scandinavica.* 1938;95(S89):75 - 84.

7. Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med.* 1964;37:402 - 407.

8. Rader DJ và Hobbs HH. Disorders of lipoprotein metabolism. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed., In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, editors, New York: The McGraw - Hill Companies, Inc., 2018;2416 – 2428.

9. Basavaraj A, Jadhav S và Dhadwad J. Familial hypercholesterolemia presenting as intracranial xanthoma. *J Assoc Physicians India.* 2006;54:330 - 332.

10. Zhao X, Bu L, Qin S et al. Early development of xanthoma and coronary disease in a young female with homozygous familial hypercholesterolemia. *Int J Cardiol.* 2014;176(1):15 - 19.

11. Jayaram S, Meera S, Kadi S et al. An Interesting Case of Familial Homozygous Hypercholesterolemia - A Brief Review. *Indian J Clin Biochem.* 2012;27(3):309 - 313.

12. Fahed AC và Nemer GM. Familial hypercholesterolemia: the lipids or the genes? *Nutr Metab (Lond).* 2011;8(1):23.

Summary

HOMOZYGOUS MUTATION OF THE LDLR GENE IN THE FAMILY OF FH PATIENT

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disorder of lipoprotein metabolism characterized by high levels of LDL-cholesterol (LDL-C) in the blood. Studies identified more than 1,000 mutations of the *LDLR* gene in FH patients with incidence rates between 1: 500 and 1: 300. The mutation occurs primarily in: *LDLR*, *apoB*, *PCSK9*, and *LDLRAP1* genes, 80% of which the *LDLR* gene mutation was detected. Nowadays, FH disease has not been given much attention, leading to a delay in treatment. This study was conducted to detect mutation of the *LDLR* gene by Sequencing, of all family members of an 8-year-old female patient, code MS15, diagnosed with FH with detected homozygous mutations of p.C222R in *LDLR* gene. Results: 13/21 family members carried heterozygous mutations c.664 T > C (p.C222R) on exon 4. This mutation occurred in both paternal and maternal family members. This discovery facilitates early counseling and treatment for these family members, minimizing the risk of real coronary diseases.

Keywords: Familial hypercholesterolemia, LDLR mutations, exon 4.