

Tăng Cholesterol máu gia đình dạng dị hợp tử kết hợp gen *LDLR*: Chuỗi ca bệnh, di truyền và xét nghiệm sàng lọc phân tầng

Hoàng Thị Yến^{1*}, Vũ Đức Anh², Lê Thị Yến², Đặng Thị Ngọc Dung²

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. 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. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 14 thành viên trong gia đình bệnh nhân FH được phân tích và xác định đột biến ở exon 4, 9 gen *LDLR*. Mục tiêu: xác định đột biến ở các thành viên trong gia đình bệnh nhân FH. Kết quả: 11/15 thành viên trong phả hệ gia đình bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử trên exon 4 và exon 9 gen *LDLR*. Bệnh nhân và 1 người nhà phát hiện, điều trị muộn dẫn đến biến chứng nhồi máu cơ tim. Vì vậy, sàng lọc phân tầng các thành viên trong gia đình bệnh nhân FH có vai trò quan trọng trong việc phát hiện sớm, tư vấn và điều trị di truyền, ngay cả trong trường hợp các thành viên trong phả hệ không có biểu hiện u vàng. Kết luận: Đây là cơ sở để tư vấn và điều trị sớm cho các thành viên bị đột biến gen, giảm nguy cơ mắc các bệnh mạch vành trong tương lai.

Từ khóa: exon 4, exon 9, đột biến gen

LDLR

DOUBLE HETEROZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA: CASE SERIES, GENETICS AND CASCADE SCREENING OF FAMILIES

ABSTRACT

Background: Background: 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 that occurs primarily in: *LDLR*, *apoB*, *PCSK9*, *LDLRAP1* genes, 80% of which were detected the *LDLR* gene mutation. Nowadays, FH disease has not been paid much attention, leading to a delay in treatment.

Objectives: identify mutations in other family members of the patient FH.

Subjects and Methods: 14 family members of FH patients were gene analyzed, identified mutations on exons 4, 9 *LDLR* genes.

Results: 11/15 family members carrying heterozygous mutations on exon 4 and exon 9 of *LDLR* gene. Patient and 1 family member

¹ Bệnh viện Tim Hà Nội

² Đại học Y Hà Nội

*Tác giả liên hệ:

Hoàng Thị Yến, yenhoangbvtim@gmail.com, 0918339594,

Ngày nhận bài: 08/11/2021 Ngày Cho Phép Đăng: 28/12/2021

detected and treated late, leading to complications of myocardial infarction. Conclusion: Therefore, Cascade screening of patient's family members has an important role in early detection, genetic counseling and treatment, even in cases where pedigree members do not have xanthomas and no

increase or slight increase in blood lipids. This is the basis for early counseling and treatment for members with mutations, reducing the risk of coronary artery diseases in the future.

Keyword: exon 4, exon 9, LDLR gene mutation

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]. Tăng cholesterol trong máu có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau: chế độ ăn giàu cholesterol, ít vận động, do hậu quả của 1 số bệnh chuyển hóa. Một nguyên nhân vô cùng quan trọng là do đột biến gen gây nên.

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 chủ yếu liên quan đến đột biến gen *LDLR* với tỷ lệ đột biến trên 80% [2].

Viện quốc gia về y tế và lâm sàng của Anh (NICE) đã đưa ra khuyến cáo về sàng lọc phân tầng đối với những 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 [3].

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 dị hợp tử trên exon 9 gen *LDLR*. Chúng tôi cũng tiến hành xác định đột biến gen *LDLR* ở các thành viên còn lại trong gia đình của bệnh nhân, 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.

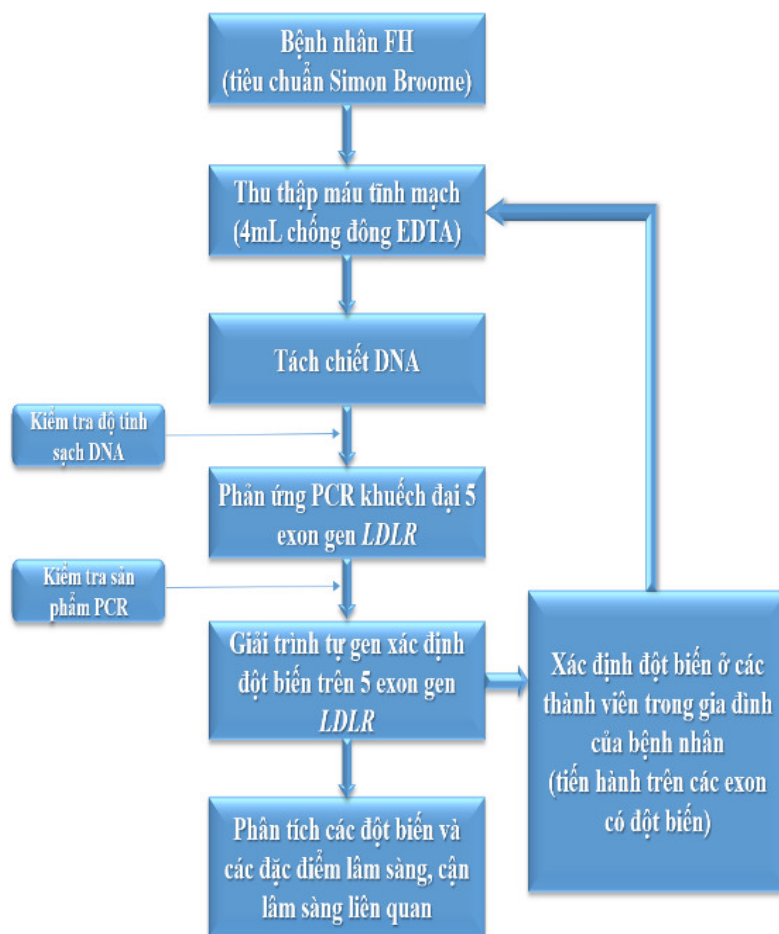
II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

➤ Bệnh nhân được chẩn đoán FH theo tiêu chuẩn Simon Broome [3] và được xác định có 1 loại đột biến: c.1285G>A (p.V429M) nằm trên exon 9 của gen *LDLR*.

Tiến hành xác định đột biến trên 14 thành viên còn lại trong gia đình bệnh nhân bị FH. Các thành viên này nằm trong 3 thế hệ gia đình bệnh nhân.

2.2. Thiết kế nghiên cứu:



Sơ đồ nghiên cứu

2.3. Phương pháp nghiên cứu:

- Lấy mẫu: 14 thành viên trong gia đình sẽ được lấy 4ml máu tĩnh mạch (2ml chống đông bằng EDTA và 2ml chống đông bằng heparin).
- Thực hiện các xét nghiệm lipid máu: cholesterol, triglycerid, HDL-C, LDL-C
- Kỹ thuật tách chiết DNA; Kỹ thuật PCR; Kỹ thuật giải trình tự gen

2.4. Công cụ:

Bệnh án nghiên cứu, hóa chất – VTTT, trang thiết bị xét nghiệm phục vụ cho nghiên cứu

2.5. Xử lý số liệu:

Kết quả giải trình tự gen thu được phân tích

trên phần mềm Sequencing Scanner 2.0 và so sánh với trình tự các a.a trên gene bank bằng phần mềm ApE. Phân tích xác định vị trí đột biến, loại

đột biến hay SNP, kết hợp với các phần mềm dự báo khả năng gây bệnh của đột biến hay SNP.

Sử dụng phần mềm Excel để phân tích thống kê.

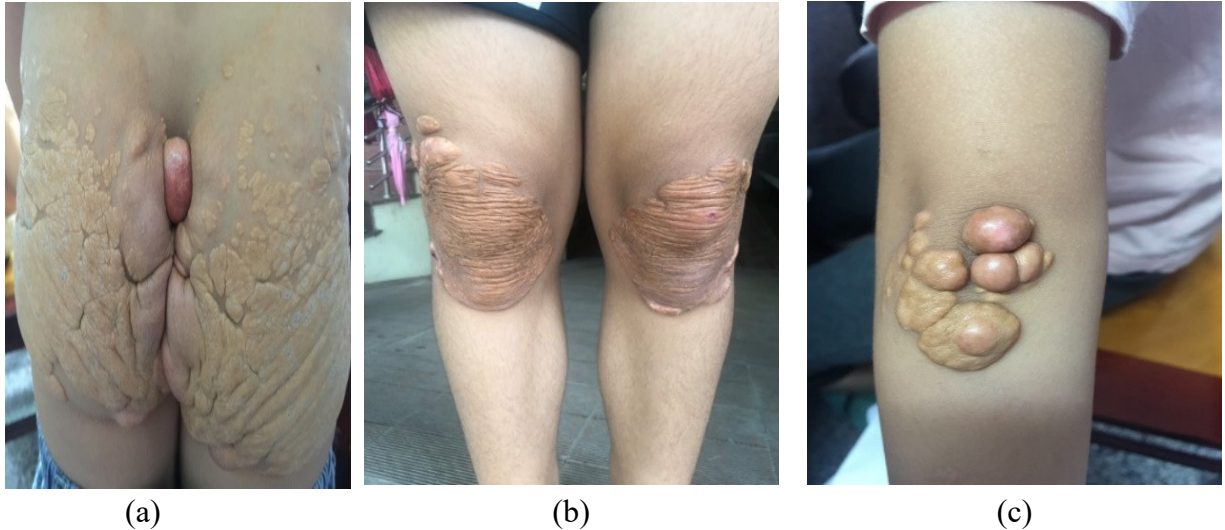
2.6. Đạo đức trong nghiên cứu:

Đề tài tuyệt đối tuân thủ đạo đức trong nghiên cứu y sinh, đối tượng tham gia nghiên cứu hoàn toàn tự nguyện và có quyền rời khỏi nghiên cứu khi không đồng ý tiếp tục tham gia. Các thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo giữ bí mật.

III. KẾT QUẢ

3.1. Bệnh nhân FH:

Bệnh nhân nam sinh năm 1980 vào viện với lý do đau tức ngực trái



Hình 1. Hình ảnh xanthoma ngoài da tại (a) vùng mông, (b) đầu gối, (c) khuỷu tay

✚ Lúc vào viện:

Đau ngực trái, Kết quả xét nghiệm máu: Cholesterol: 14,1 mmol/L; LDL-L: 11,8 mmol/L; HDL: 1,6 mmol/L; Triglycerid: 1,4 mmol/L.

Kết quả chụp mạch vành: có tổn thương 3 thân mạch vành

Đã được điều trị hút huyết khối và thuốc tiêu sợi huyết vào tháng 8.2016. Bệnh nhân thỏa mãn các tiêu chuẩn Simon Broome [3] được chẩn đoán là FH

3.2. Tiền sử gia đình

Con trai sinh năm 2006 xuất hiện nhiều u, mảng sần màu vàng dưới da 2 bên mông, khuỷu tay, khớp gối 2 bên. Phát hiện các tổn thương xanthomas từ 4 tháng tuổi.

- Bố vợ của bệnh nhân được chẩn đoán

NMCT và đặt 3 stent vào tháng 6.2019.

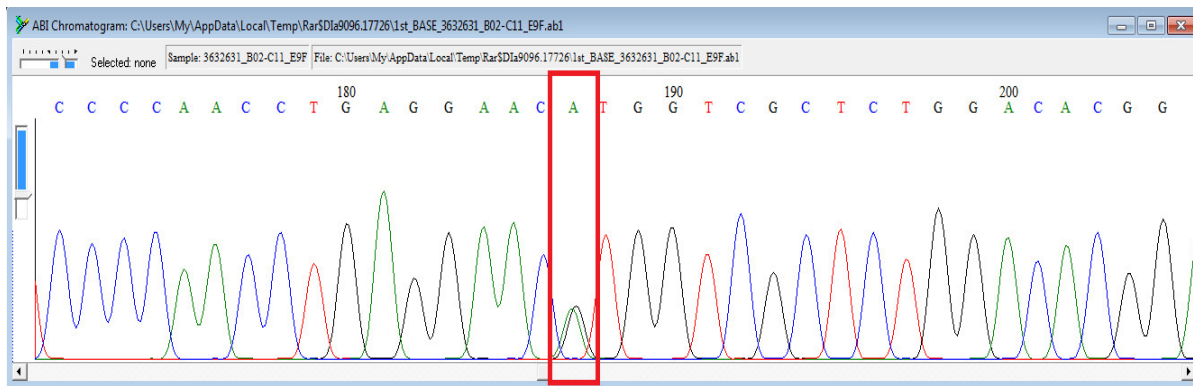
3.3. Kết quả xác định đột biến gen LDLR

Bốn cặp mồi đặc hiệu được sử dụng để khuếch đại exon 3, 4, 9, 13, 14 của gen LDLR trên bệnh nhân và con trai của bệnh nhân. Kích thước sản phẩm PCR của exon 3 – 400 bp, exon 4 – 529 bp; exon 9 – 448 bp; exon 13,14 – 638 bp.

Kết quả sản phẩm PCR xuất hiện một vạch đơn đặc hiệu, đảm bảo điều kiện cho kỹ thuật giải trình tự tiếp theo.

Tiến hành giải trình tự xác định đột biến gen LDLR của bệnh nhân và con trai của bệnh nhân, kết quả như sau:

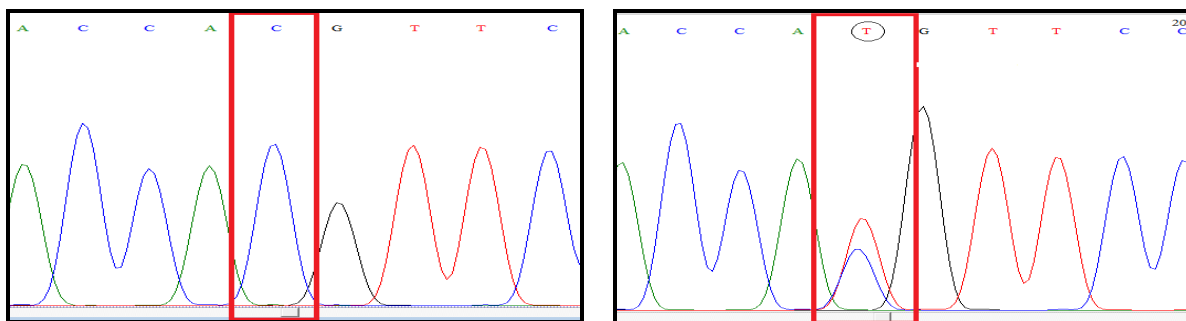
Bệnh nhân: phát hiện đột biến c.1285 G>A (p.V429M) nằm trên exon 9 là đột biến đã công bố là gây bệnh.



c.1285 G>A

Hình 2. Hình ảnh đột biến c.1285 G>A trên exon 9 gen LDLR (mỗi xuôi)

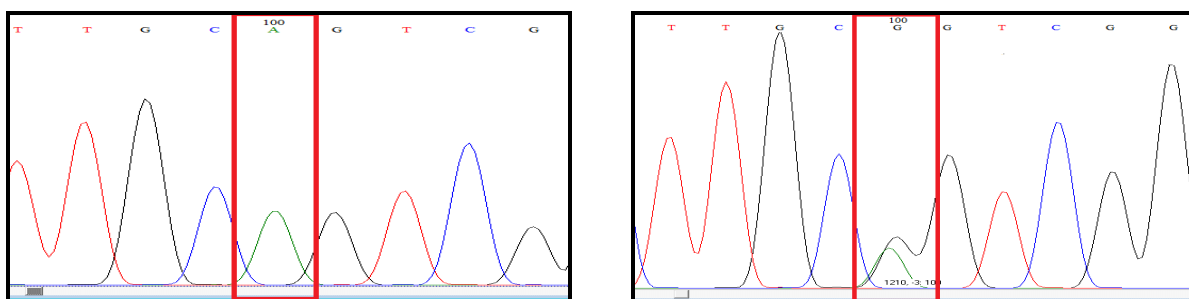
- Con trai của bệnh nhân: phát hiện 2 loại đột biến là c.664 T>C (p.C222R) nằm trên exon 4 và c.1285 G>A (p.V429M) nằm trên exon 9, là 2 đột biến đã công bố là gây bệnh.



Bình thường c.1285G

c.1285 G>A (III.3)

Hình 3. Hình ảnh đột biến c.1285 G>A trên exon 9 gen LDLR (mỗi ngược)



Bình thường c.664T

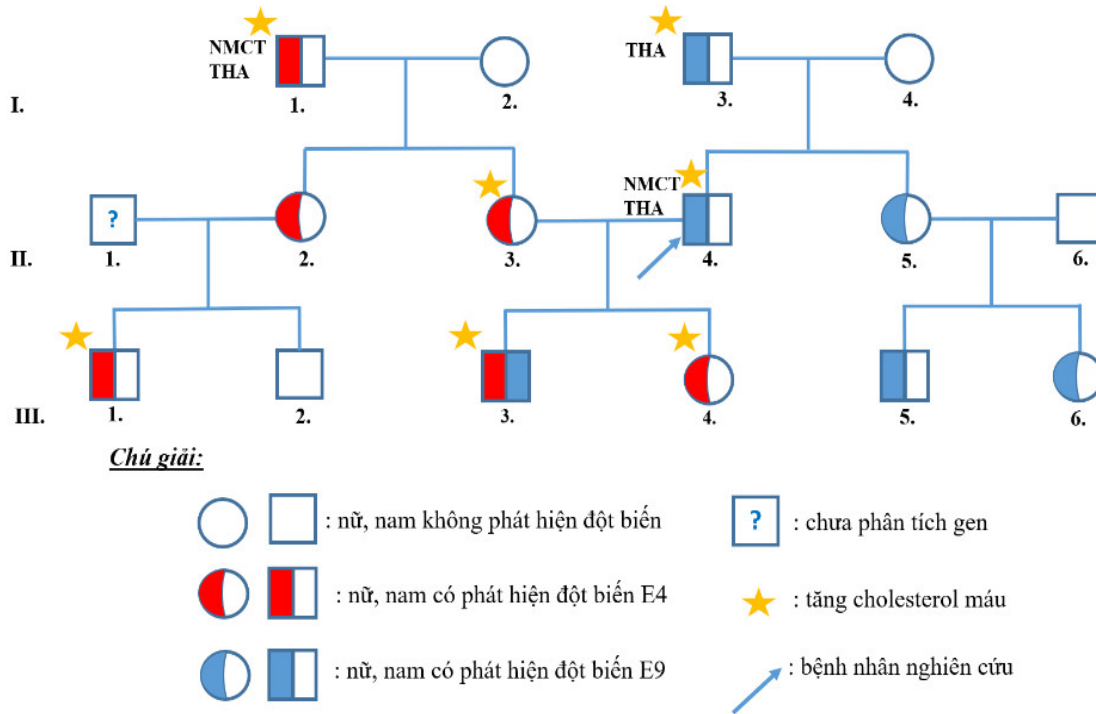
c.664 T>C (III.3)

Hình 4. Hình ảnh đột biến c.664 T>C trên exon 4 gen LDLR (mỗi ngược)

→ Tiến hành phân tích xác định các loại đột biến này trên gen LDLR ở các thành viên còn lại trong gia đình.

Tiến hành giải trình tự exon 4, 9 xác định đột biến ở 13 thành viên còn lại trong gia đình. Kết quả cho thấy 9/13 thành viên còn lại trong gia đình bệnh nhân FH phát hiện đột biến gen LDLR với 2 loại đột

biến: c.664 T>C dị hợp tử làm biến đổi acid amin Cysteine thành Arginine tại codon 222 nằm trên exon 4 và c.1285G>A dị hợp tử làm biến đổi acid amin Valine thành Methionine tại codon 429 (p.V429M) nằm trên exon 9 giống như loại đột biến được tìm thấy trên bệnh nhân và con trai của bệnh nhân.



Hình 5. Phả hệ của gia đình bệnh nhân FH

Trong 15 thành viên gia đình, đột biến xuất hiện ở 11/15 người gồm:

- Đột biến trên exon 4 - p.C222R xuất hiện ở bố vợ (I.1) và di truyền cho vợ (II.3) và chị gái của vợ bệnh nhân (II.2). Vợ bệnh nhân (II.3) truyền lại cho con trai (III.3) và con gái của bệnh nhân (III.4). Một cháu họ (III.1) nhận đột biến p.C222R từ chị gái của vợ bệnh nhân (II.2), 1 cháu họ không xuất hiện đột biến.

- Đột biến trên exon 9 - p.V429M tìm thấy trên bố bệnh nhân (I.3) di truyền cho bệnh nhân (II.4) và em gái bệnh nhân (II.5). Bệnh nhân di truyền đột biến cho con trai (III.3).

Hai người cháu họ (III.5 và III.6) đều

nhận đột biến p.V429M từ em gái bệnh nhân. Mẹ đẻ của bệnh nhân (I.4) và mẹ vợ của bệnh nhân (I.2) không phát hiện có đột biến trên exon 4 và exon 9.

3.4. Một số biểu hiện lâm sàng và biến cố tim mạch

- 11/15 thành viên trong gia đình có đột biến: Trong đó 5 thành viên mang đột biến dị hợp tử trên exon 4; năm thành viên mang đột biến dị hợp tử trên exon 9 gen LDLR; 1 thành viên là con trai của bệnh nhân mang 2 đột biến dị hợp tử trên exon 4 và exon 9 (di truyền từ bố và mẹ) với chỉ số TC và LDL-C tăng rất cao.

Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm của các thành viên có đột biến

STT	Mã số BN	Exon Đbiến	Giới	Năm sinh	U vàng	Tăng HA	NMC T	Chole s	LDL
1	I.1	E4	Nam	1955	-	+	+	6,6	4,7
2	II.2	E4	Nữ	1981	-	-	-	5,7	3,9
3	II.3	E4	Nữ	1983	-	-	-	8,1	5,6
4	III.1	E4	Nam	2005	-	-	-	7,6	6,0
5	III.4	E4	Nữ	2011	-	-	-	10,4	8,7
6	I.3	E9	Nam	1952	-	+	-	7,4	6,3
7	II.4 (BN)	E9	Nam	1980	+	+	+	14,1	11,8
8	II.5	E9	Nữ	1982	-	-	-	6,4	4,8
9	III.5	E9	Nam	2005	-	-	-	4,1	2,9
10	III.6	E9	Nữ	2008	-	-	-	5,2	3,9
11	III.3	E4+E9	Nam	2006	+	-	-	24,7	20,6

IV. BÀN LUẬN

4.1. Đột biến c.1285 G>A (p.V429M)

Là đột biến trên exon 9 thay thế Guanin thành Adenin tại vị trí c.1285 làm thay đổi bộ ba mã hóa cho a.a Valine tại vị trí 429 thành Methionine. Đây là đột biến đã từng được phát hiện và công bố từ kết quả nghiên cứu của Ranheim T (2006). Exon 9 mã hóa cho vùng giống như EGF (yếu tố phát triển biểu mô), khi pH nội bào thấp sẽ tác động vào vùng này và LDLr sẽ tách ra khỏi phức hợp LDLr - LDL, sau đó LDLr sẽ được tái sử dụng trong một vòng tuần hoàn mới. Valine là một a.a không phân cực, kỵ nước khi bị thay thế bởi a.a Methionine là một a.a phân cực sẽ làm thay đổi sự phân cực về mặt cấu trúc của vùng giống như EGF này. Đột biến c.1285 G>A là một đột biến sai nghĩa đã được khẳng định là gây bệnh bởi vì các lipoprotein liên kết với LDLr, được nội hóa nhưng không thể tái chế, do khiếm khuyết tái chế ở thụ thể đột biến [4]. Nếu quá trình tái chế không xảy ra, tất cả các LDLr sẽ bị tiêu thụ trong vòng 10 phút sau khi tiếp xúc với LDL-C [5]. Nghiên cứu của Ranheim T (2006) mô tả các đặc điểm kiểu hình của một số

đột biến gen *LDLR* bằng cả kính hiển vi và các xét nghiệm tế bào dòng chảy trên hệ thống mô hình tế bào CHO và HepG2 đã cho thấy, đột biến c.1285 G>A [4]:

- Được xác định là đột biến loại 5 không phải loại 2 (tích tụ các tín hiệu LDLr được tạo ra bởi biến thể c.1285 G>A trong các endosome sớm).

- Khi nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể đặc hiệu và đánh giá qua các tín hiệu tế bào cho thấy c.1285 G>A mã hóa cho một protein chỉ nằm trong nội bào.

- Các tín hiệu LDLr trưởng thành được tạo bởi biến thể xuất hiện trong vòng 1 giờ, sau đó cường độ tín hiệu giảm dần và biến mất.

Chính vì vậy đột biến c.1285 G>A được khẳng định là đột biến gây bệnh FH; đột biến này được tìm thấy trên bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi, biến cố NMCT xuất hiện sớm vào năm bệnh nhân 36 tuổi.

4.2. Đột biến c.664 T>C

Là đột biến trên exon 4 tại vị trí nucleotide 664 Thymin được thay bằng Cytosin, dẫn đến

làm biến đổi a.a Cysteine ở vị trí 222 thành a.a Arginine. Đột biến đã được phát hiện và công bố ở nghiên cứu của Sozen M.M (2005) [6]. Đây là loại đột biến sai nghĩa có sự thay thế a.a, do vậy làm ảnh hưởng đến hoạt động của protein và liên quan tới việc gắn LDL-C với LDLr. Exon 4 mã hóa cho vùng phối tử của LDLr làm trung gian cho sự tương tác với lipoprotein. Đột biến trên exon 4 là một đột biến gặp với tỉ lệ cao trong nhiều kết quả nghiên cứu [5]. Lý do của hiện tượng này một phần do sự trội hơn của các trình tự CpG ở trên exon này [7], một lý do khác 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, vì vậy các đột biến ở vùng chìa khóa này thường ảnh hưởng có hại một cách rõ rệt đến chức năng của LDLr, 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 trong 18 exon của gen *LDLR*.

Để dự đoán khả năng gây bệnh đối với đột biến sai nghĩa có thay đổi a.a, có thể sử dụng 3 phần mềm dự đoán đó là: Chương trình PolyPhen 2 (Polymorphism Phenotyping version 2), phần mềm MutationTaster và phần mềm SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), 3 phần mềm này đã được sử dụng để dự đoán khả năng gây bệnh FH của nhiều đột biến mới được phát hiện trong các nghiên cứu trên thế giới [6].

4.3. Phả hệ gia đình bệnh nhân FH

Con trai bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử kết hợp trên exon 4 và exon 9, có 5/11 thành viên gia đình mang đột biến trên exon 9 (họ nội); 5/11 thành viên gia đình mang đột biến trên exon 4 (họ ngoại). Số thành viên ở các thế hệ có mối quan hệ huyết thống bậc 1, 2 và 3 với bệnh nhân mang đột biến chiếm tỉ lệ cao, khẳng định FH là bệnh di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường. Kết quả xét

thử nghiệm TC và LDL-C của các thành viên trong gia đình hoàn toàn phù hợp với kết quả xác định đột biến gen *LDLR*, 10/15 thành viên trong gia đình có đột biến dị hợp tử trên exon 4 hoặc exon 9 với mức cholesterol trung bình là 7,56 mmol/L và mức LDL-C trung bình là 5,86 mmol/L. Tuy nhiên, các thành viên tham gia nghiên cứu đều chưa được chẩn đoán FH tại thời điểm bắt đầu tiến hành nghiên cứu. Chính vì vậy bệnh nhân đã xuất hiện các biến cố NMCT ở độ tuổi còn rất trẻ.

Mặc dù tiên bộ y tế rất lớn, nhưng bệnh FH vẫn chưa được chẩn đoán sớm dẫn đến sự chậm trễ trong điều trị. 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 tầng 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 [6].

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định đột biến dị hợp tử exon 9 trên bệnh nhân. Hầu hết các thành viên trong gia đình ở dòng họ nội mang đột biến dị hợp tử exon 9, hầu hết các thành viên bên dòng họ ngoại đột biến dị hợp tử exon 4. Con trai bệnh nhân mang dị hợp tử kết hợp exon 4 và exon 9 có mức tăng cholesterol và LDL-C máu rất cao cùng với biểu hiện xanthomas gân điển hình trên lâm sàng. Bệnh nhân và 1 thành viên trong gia đình phát hiện và điều trị muộn dẫn đến biến chứng NMCT. Do đó, sàng lọc phân tầng 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 và không tăng hoặc tăng nhẹ lipid máu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Santos P.C, Morgan A.C, Jannes C.E et al (2014). Presence and type of low density lipoprotein receptor (LDLR) mutation influences the lipid profile and response to lipid-lowering therapy in Brazilian patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 233 (1), 206-210.

2. Henderson R, O'Kane M, McGilligan V et al (2016). The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. *J Biomed Sci*, 23, 39.

3. DeMott K, Nherera L, Shaw E.J et al (2008). 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.

4. Ranheim T, Kulseth M.A, Berge K.E et al (2006). Model system for phenotypic characterization of sequence variations in the LDL receptor gene. *Clin Chem*, 52(8), 1469-1479.

5. Chang J.H, Pan J.P, Tai D.Y et al (2003). Identification and characterization of LDL receptor gene mutations in hyperlipidemic Chinese. *J Lipid Res*, 44(10), 1850-1858.

6. Sozen M.M, Whittall R, Oner C et al (2005). The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients. *Atherosclerosis*, 180(1), 63-71.

7. Khachadurian A.K (1964). The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med*, 37, 402-7