

XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN ABCC8 LIÊN QUAN TỚI BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG SƠ SINH

Triệu Tiến Sang¹, Trần Văn Khoa¹, Nguyễn Thị Trang³
Nguyễn Thị Ánh Tuyết³, Nguyễn Thanh Tùng¹
Trịnh Thế Sơn¹, Nông Quốc Tuấn¹, Trần Ngọc Thảo My²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình phát hiện đột biến gen ABCC8 liên quan tới bệnh đái tháo đường sơ sinh. **Đối tượng và phương pháp:** Một đột biến gen ABCC8 phát hiện ở một bệnh nhân (BN) mắc đái tháo đường sơ sinh tại Việt Nam được sử dụng để thiết kế đoạn mồi cho phản ứng khuếch đại chuỗi PCR. Phản ứng này khuếch đại đoạn gen mang đột biến trên tổng cộng 33 mẫu bệnh phẩm, sau đó kết hợp phương pháp giải trình tự Sanger để phát hiện đột biến liên quan đến bệnh đái tháo đường sơ sinh. **Kết quả:** Phát hiện 2 trường hợp (6,06%) mang đột biến c.3422A>G trên đoạn exon 28 của gen ABCC8. Còn 31 mẫu (93,94%) không phát hiện mang đột biến nào trên exon được khảo sát. **Kết luận:** Quy trình được xây dựng mang lại ý nghĩa quan trọng và giúp ích cho quá trình phát hiện đột biến gen ABCC8.

* Từ khóa: Đái tháo đường sơ sinh; Đái tháo đường; Bệnh chuyển hóa; Gen ABCC8; Quy trình phát hiện chẩn đoán.

Establishing a Procedure to Detect ABCC8 Gene Mutations Related to Neonatal Diabetes Mellitus

Summary

Objectives: To establish a procedure to detect ABCC8 gene mutations related to neonatal diabetes mellitus. **Subjects and methods:** An ABCC8 gene mutation related to neonatal diabetes mellitus found in a Vietnamese patient was used to design primers for PCR (Polymerase Chain Reaction) to amplify the segment spanning the mutation. Then, combined with Sanger sequencing, a procedure was developed to detect mutations on the ABCC8 gene on 33 DNA samples to screen for pathogenic alleles. **Results:** The established procedure detected 2 cases with ABCC8 mutations (6.06%) while no pathogenic allele was found in the remaining 31 cases. **Conclusion:** The developed procedure was helpful for the diagnosis process of diabetes mellitus, especially in families with a history of the disease.

* Keywords: Neonatal diabetes mellitus; Diabetes mellitus; Metabolic disorders; ABCC8; Procedure.

¹Học viện Quân y

²Faculty of Science and Engineering, Sorbonne University

³Trường Đại học Y Hà Nội

Người phản hồi: Triệu Tiến Sang (trieusangk83@yahoo.com.vn)

Ngày nhận bài: 03/6/2021

Ngày bài báo được đăng: 11/6/2021

ĐẶT VẤN ĐỀ

Thuật ngữ “Đái tháo đường” (Diabetes mellitus - DM) mô tả một nhóm các rối loạn chuyển hóa không đồng nhất, đặc trưng và phát hiện bởi nồng độ đường huyết tăng cao. Bệnh hình thành do những khiếm khuyết trong quá trình tiết insulin, hoạt động của insulin hoặc cả hai và do những thay đổi trong quá trình chuyển hóa carbonhydrate, chất béo và protein. Đái tháo đường để lại tác động lâu dài lên người mắc, bao gồm các bệnh về võng mạc, thận, thần kinh cùng nhiều biến chứng phức tạp khác, đặc biệt về tim mạch. Bệnh đái tháo đường xuất hiện ở mọi quần thể trên thế giới, bất kể vị trí địa lý. Theo thống kê của WHO cho tới năm 2014, gần 422 triệu người trưởng thành được chẩn đoán mang bệnh và ước tính tăng lên 629 triệu người vào năm 2045. Ảnh hưởng của bệnh đái tháo đường để lại vô cùng nặng nề, không chỉ lên mỗi gia đình có người mắc bệnh mà còn ảnh hưởng tiêu cực tới nền kinh tế và xã hội cũng như năng suất lao động của các nước có thu nhập thấp và trung bình [1].

Thông thường, bệnh đái tháo đường được chia làm 3 loại chính: Đái tháo đường týp 1 (T1DM), đái tháo đường týp 2 (T2DM) và đái tháo đường thai kỳ (GDM). T1DM hình thành do hệ miễn dịch phá hủy các tế bào β của tuyến tụy khiến cho quá trình sản xuất insulin bị ảnh hưởng, từ đó người bệnh phải phụ thuộc vào insulin ngoại sinh. Phổ biến hơn T1DM, T2DM gây ra bởi sự giảm tiết và kháng insulin. Sự kháng này là hậu quả của hiện tượng suy giảm các thụ thể insulin hay insulin không thể bám vào thụ thể hoặc rối loạn vận chuyển glucose vào

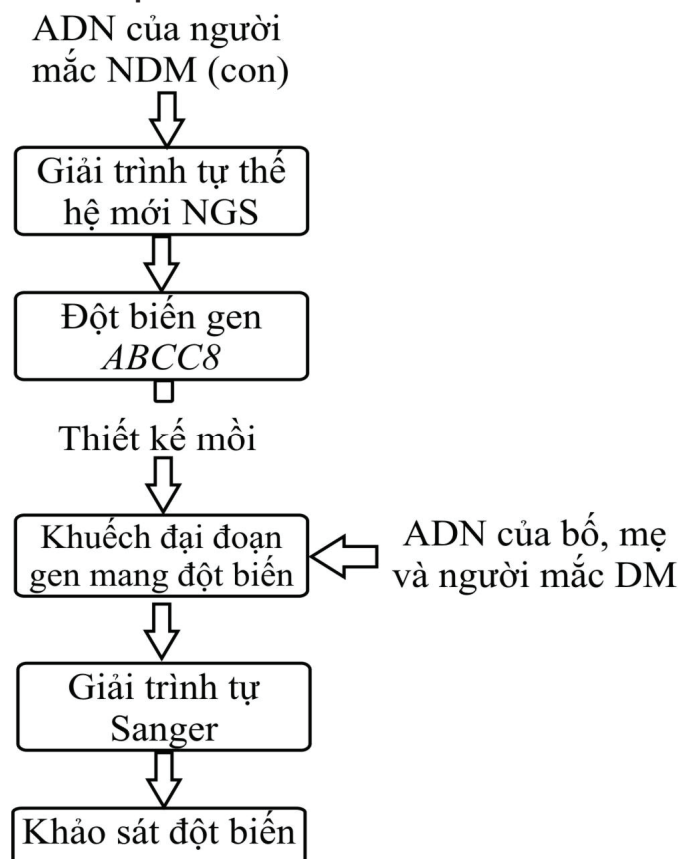
trong tế bào [2, 3]. GDM được xác định khi phụ nữ có lượng đường huyết cao được phát hiện lần đầu tiên trong thai kỳ. GDM được áp dụng kể cả khi không còn hiện tượng tăng cao glucose trong máu sau khi sinh con hay hiện tượng này đã xuất hiện trước khi mang thai mà chưa được chẩn đoán [3].

Khác biệt với các loại đái tháo đường đa gen này cũng tồn tại một số loại đái tháo đường đơn gen gây ra bởi đột biến di truyền trên những gen quy định chức năng của tế bào β . Rất hiếm để bắt gặp những trường hợp mắc đái tháo đường đơn gen, tuy nhiên chúng có ảnh hưởng đặc biệt quan trọng và chiếm 1 - 2% số ca mắc đái tháo đường [4, 5]. Tuy nhiên, loại đái tháo đường này thường không được nhận biết chính xác. Hầu hết BN bị chẩn đoán sai thành đái tháo đường týp 1 hoặc týp 2, dẫn tới việc đưa ra phác đồ điều trị không hiệu quả và không thể phát hiện các thành viên khác trong gia đình có khả năng mắc bệnh [5, 6]. Các kiểu hình của đái tháo đường đơn gen bao gồm: Đái tháo đường khởi phát ở tuổi trưởng thành (MODY - tuổi khởi phát là trước 25 tuổi) và đái tháo đường sơ sinh (NDM - được chẩn đoán trước 6 tháng tuổi). Về mặt di truyền học, những đột biến dị hợp tử gen *KCNJ11* có liên quan đến bệnh đái tháo đường sơ sinh được ghi nhận lần đầu tiên vào năm 2004 ở người và 2 năm sau đó bắt đầu phát hiện những đột biến tương tự trên gen *ABCC8*. Cho đến nay, những đột biến ở 2 gen này được chứng minh là nguyên nhân dẫn đến gần 40% ca mắc đái tháo đường sơ sinh, do đó, có nhiều nghiên cứu chuyên sâu về vấn đề này [5].

Gen *ABCC8* có vị trí 11p15.1 và độ dài khoảng 84 kb (17.414.538 - 17.493.323), bao gồm 39 exon, thuộc họ protein ABC - họ các protein vận chuyển chủ động liên kết với ATP. Gen mã hóa cho 1.582 amino acid của protein SUR1 - thụ thể nằm trên kênh K_{ATP} xuyên màng sinh chất. Nhờ kênh K_{ATP} này, các tế bào β tuyến tụy có thể điều hòa quá trình tổng hợp và tiết insulin; tuy nhiên, các đột biến trên gen *ABCC8* khiến cho kênh K_{ATP} không thể đóng lại dẫn đến hiện tượng giảm tiết insulin và tăng glucose trong máu, từ đó hình thành đái tháo đường [7]. Theo báo cáo cập nhật của De Franco và

CS (01/2020), tổng cộng 748 đa hình gây bệnh và có khả năng gây bệnh trên gen *ABCC8* được phát hiện ở BN mắc đái tháo đường sơ sinh [8]. Nếu có thể xác định đột biến gen *ABCC8* liên quan tới kênh K_{ATP} , BN sẽ được điều trị với thuốc uống sulfonylureas thay vì sử dụng insulin đến cuối đời. Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm: *Nghiên cứu xây dựng quy trình ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử vào chẩn đoán đột biến gây bệnh đái tháo đường sơ sinh, từ đó đưa ra phương hướng điều trị phù hợp và hiệu quả, nâng cao chất lượng cuộc sống cho người bệnh.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU



Hình 1: Quy trình phát hiện đột biến gen *ABCC8*.

1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu máu của một gia đình 3 thành viên gồm bố (30 tuổi - chẩn đoán mắc đái tháo đường vào tuổi 28), mẹ (29 tuổi - bình thường, không mang triệu chứng của đái tháo đường) và con trai, trong đó người con được chẩn đoán mắc NDM vào tuần tuổi thứ 8 tham gia vào nghiên cứu.

2. Phương pháp nghiên cứu

ADN tổng số của người con được giải trình tự thế hệ mới (NGS) để khảo sát đột biến và xác định là mang đột biến c.3422A>G (p.Glu1141Gly) - một đột biến dị hợp tử trên exon 28 của gen *ABCC8* (đột biến nhằm nghĩa ở mức độ protein). Đồng thời thu thập 30 mẫu máu tĩnh mạch của các BN được chẩn đoán đái tháo đường và đang điều trị tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các mẫu máu được lưu trữ vào ống chứa chất chống đông EDTA và bảo quản, vận chuyển ở nhiệt độ 4°C cho đến khi sử dụng.

* *Tách chiết ADN toàn phần từ máu tĩnh mạch*: ADN được tách chiết từ mẫu máu toàn phần theo quy trình của bộ kit... ADN sau tách chiết sẽ được kiểm tra chất lượng (nồng độ và độ tinh sạch) bằng máy đo SpectraMax QuickDrop. Do vậy, ADN thu nhận từ 33 mẫu bệnh phẩm đạt chất lượng mong muốn và sẽ được sử dụng trong các bước tiếp theo của nghiên cứu. ADN được lưu trữ và bảo quản tại nhiệt độ -20°C.

* *Thực hiện phản ứng khuếch đại PCR (Polymerase chain reaction)*: Đầu tiên, cặp mồi được thiết kế để khuếch đại đoạn gen mang đột biến c.3422A>G bằng cách sử dụng phần mềm Primer-BLAST. Kết quả thiết kế cặp mồi cho ra 2 trình tự mồi F và R

khuếch đại toàn bộ exon 28 của gen *ABCC8*: F: 5'-GAACCTGTTTCAGTCCTGTGG-3'; R: 5'-CTTTCTTGATTACTGGGACCAG-3'. Nhiệt độ nóng chảy của mỗi mồi lần lượt là 58,12°C và 56,43°C và chúng khuếch đại đoạn gen dài 274 bp, bao gồm toàn bộ exon 28.

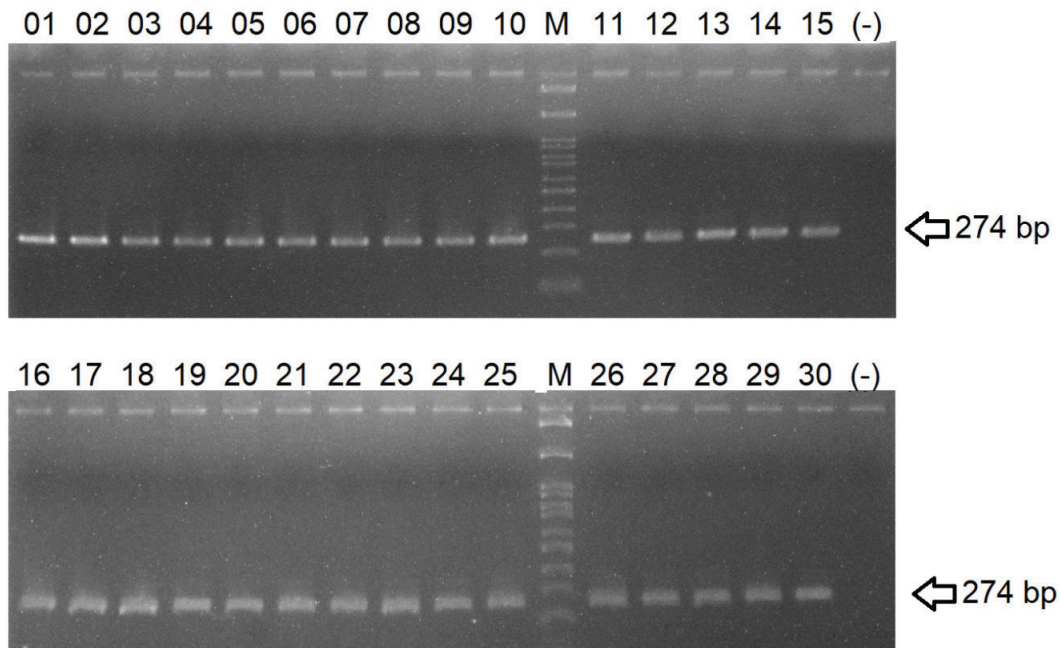
Sau đó, phản ứng PCR được thực hiện bằng cặp mồi này sử dụng các mẫu ADN thu thập được từ 33 mẫu máu toàn phần nhằm khảo sát đột biến trên gen *ABCC8*. Mỗi ống phản ứng có thể tích 25 µl, trong đó chứa 12,5 µl GoTaq Green Mastermix 2X (Lot.No. 0000440041; hạn sử dụng: 5/2023), 7,5 µl nước, 0,5 µl mỗi mồi, 4,0 µl ADN. Dựa vào nhiệt độ nóng chảy của cặp mồi, phản ứng PCR được thực hiện với dải gradient nhiệt độ gần mồi từ 52 - 62°C. Dựa vào kết quả phản ứng này, nghiên cứu lựa chọn 55°C là nhiệt độ gần mồi tối ưu nhất. Phản ứng này được lặp lại 3 lần và kết quả các lần thực hiện là đồng nhất. Vì vậy, phản ứng PCR sử dụng cặp mồi ABCC8F, ABCC8R được hiện theo quy trình như sau: 95°C 5 phút, 35 chu kỳ gồm 94°C 30 giây, 55°C 30 giây, 72°C 30 giây và 72°C 5 phút. Những đoạn gen sau khuếch đại sẽ được điện di trên gel agarose 2% trên hệ máy multiSUB Choice (Cleaver Scientific, SKU: MSCHOICE) để kiểm tra sản phẩm mong muốn.

* *Giải trình tự Sanger*: Các băng sản phẩm PCR sau khi được kiểm tra bằng điện di sẽ được giải trình tự theo nguyên lý Sanger để tìm đột biến trên c.3422A>G trên exon 28 của gen *ABCC8*. Ngoài ra, các đột biến trên exon 28 khác cũng có thể được phát hiện nhờ sử dụng kỹ thuật giải trình tự.

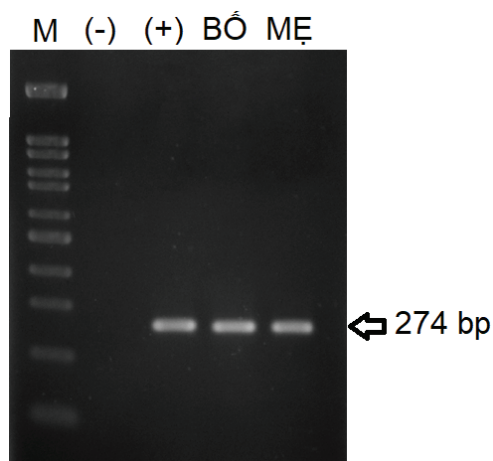
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phản ứng khuếch đại PCR đoạn gen mang đột biến

Phản ứng PCR được thực hiện 3 lần, sử dụng các thành phần và chu trình nhiệt được miêu tả như trên. Kết quả thu được là đồng nhất giữa các lần phản ứng. Sau đó, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose và quan sát dưới đèn UV.



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR với ADN của 30 BN đại tháo đường.
(M: thang chuẩn 100 bp)

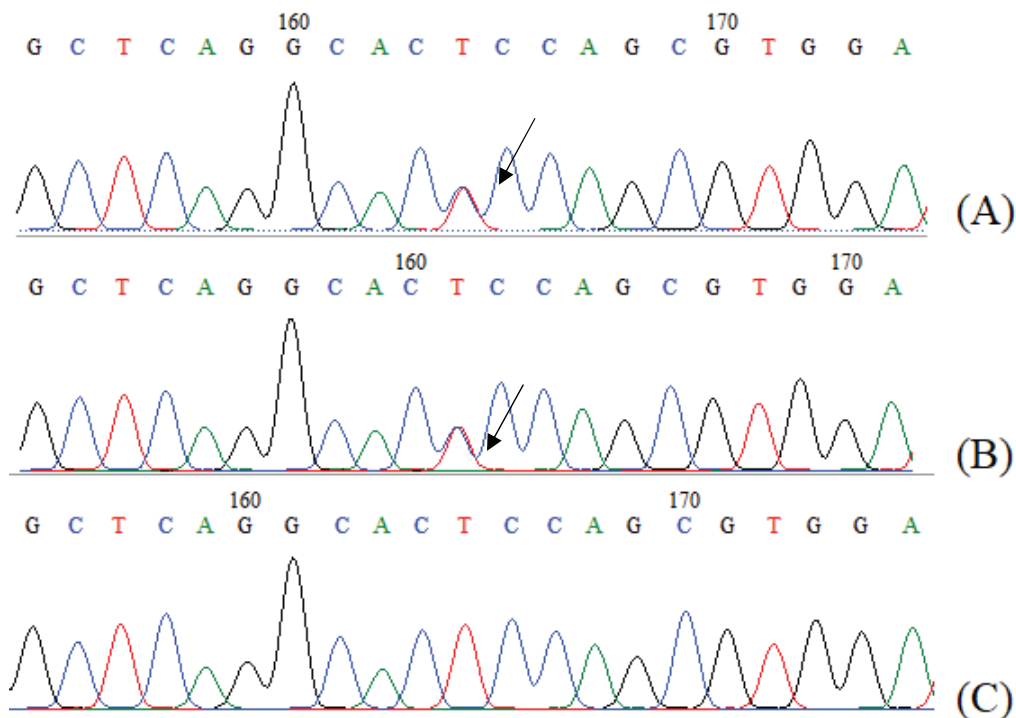


Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm PCR với ADN của bố và mẹ BN mắc NDM.
(M: thang chuẩn 100 bp; (+): ADN của BN NDM)

Phản ứng PCR đã khuếch đại thành công đoạn gen mong muốn ở 32 mẫu ADN của nhóm nghiên cứu so với đối chứng dương là mẫu ADN của người mắc NDM mang đột biến c.3422A>G. Ở giếng tra mẫu đối chứng âm không xuất hiện bất kỳ băng nào, thể hiện môi và thành phần phản ứng không bị tạp nhiễm. Băng điện di thu được không có sản phẩm phụ, hình ảnh sáng và rõ ràng tại vị trí gần 300 bp, chứng tỏ đoạn gen được khuếch đại mang đúng kích thước 274 bp như lý thuyết ban đầu. Từ đây, những sản phẩm này sẽ được tinh sạch để giải trình tự theo nguyên lý Sanger để phát hiện đột biến trên exon 28 của gen *ABCC8*.

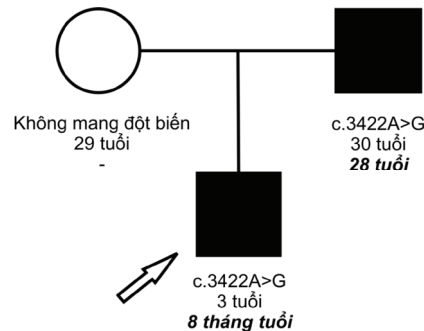
2. Kết quả giải trình tự Sanger

Trong tổng số 33 mẫu được giải trình tự Sanger, chỉ phát hiện 2 trường hợp (6,06%) mang đột biến c.3422A>G trên đoạn exon 28 của gen *ABCC8*. Còn lại 31 mẫu (93,94%) đều cho kết quả không phát hiện mang đột biến nào trên exon được khảo sát.



Hình 4: Kết quả giải trình tự Sanger. (A): Mẫu ADN của con - BN mắc NDM; (B): Mẫu ADN của người bố; (C): Mẫu ADN của người không mang alen đột biến (kiểu đại).

2 trường hợp mang đột biến c.3422A>G duy nhất được xác định có quan hệ với nhau về huyết thống (bố - con). Cả hai đều mang đột biến dị hợp tử gen *ABCC8* gây bệnh đái tháo đường. Trong khi đó, phân tích trình tự exon 28 của người mẹ trong gia đình này không phát hiện đột biến nào nên có thể khẳng định người bố với kiểu gen dị hợp tử đã truyền cho con trai alen đột biến, từ đó hình thành bệnh đái tháo đường sơ sinh.



Hình 5: Phả hệ gia đình có bố, mẹ, con trai mắc đái tháo đường sơ sinh.
(Mũi tên chỉ người đầu tiên trong gia đình được phát hiện mắc bệnh (proband);
theo thứ tự chú thích là tuổi tại thời điểm nghiên cứu và
thời điểm phát hiện bệnh).

BÀN LUẬN

Một đột biến điểm trên gen *ABCC8* được phát hiện nhờ ứng dụng quy trình kết hợp giữa phương pháp PCR truyền thống và giải trình tự NGS, Sanger. Đây là một đột biến thay thế nucleotide A>G ở vị trí 3422 trên exon 28 của gen, dẫn đến thay đổi acid amin tương ứng là glutamine thành glycine, dẫn đến đột biến nhằm nghĩa ở mức độ protein. Cho đến thời điểm hiện tại, chưa có chính thức nào được đưa ra về đột biến này, tuy nhiên theo báo cáo của HGVS (Human Genome Variation Society) năm 2019, đây là một biến dị di truyền theo quy luật trội gây bệnh TNDM (transient neonatal diabetes mellitus - đái tháo đường sơ sinh không kéo dài), được ghi nhận lần đầu tiên ở Paris (Pháp) [8]. Việc xảy ra đột biến trên trình tự amino acid trên loại protein vận chuyển có trình tự bảo thủ cao qua các loài (khỉ, chuột, thỏ, voi, chó, gà...) khiến chức năng của protein ảnh hưởng nghiêm trọng [9].

Theo nghiên cứu của Babenko, Polak và CS, các đột biến dị hợp tử xuất hiện ở gen *ABCC8* mã hóa cho tiểu đơn vị SUR1

của kênh K_{ATP} ở các tế bào β tuyến tụy có thể gây ra cả 2 thể của đái tháo đường sơ sinh (PNDM - đái tháo đường sơ sinh vĩnh viễn và TNDM) [10]. Những đột biến trên SUR1 giảm sự ngăn chặn của ATP trên kênh K_{ATP} có thể gây ra ít nhất 3 trường hợp sau: tăng hoạt động mở của kênh, tăng ảnh hưởng của tương tác giữa Mg - nucleotide và giữa vùng gắn nucleotide (NBD) và protein hoặc giảm độ nhạy của ATP do sự kết hợp giữa Kir6.2 và SUR1 [11, 12]. Trong trường hợp này, đột biến gen *ABCC8* xảy ra ở vùng liên quan đến vùng xuyên màng với vùng NBD, khiến cho kênh này không thể đóng lại và luôn ở trạng thái mở, từ đó năng chặn hoạt động của kênh Ca^{2+} và sự tiết insulin [10]. Tuy nhiên, ảnh hưởng này được báo cáo là tương đồng với ảnh hưởng của đột biến lên tiểu đơn vị Kir6.2 do các đột biến xuất hiện ở vùng 6q24, vì vậy việc phân biệt BN mang những đột biến này còn gặp nhiều khó khăn trong xét nghiệm lâm sàng. Chính vì vậy, việc giải trình tự gen là một phương pháp hữu hiệu để phát hiện đột biến đó, tư vấn, cung cấp cho bản thân người mang bệnh và gia đình phương hướng điều trị và

phòng tránh bệnh đái tháo đường sơ sinh một cách hiệu quả.

Theo nghiên cứu của Jung Hyun Kong (2011), phát hiện một đột biến *de novo* trên gen *ABCC8* trên exon 28 [12]. Đột biến này rất hiếm gặp (p.Arg1183Trp) và không để lại những triệu chứng thường gặp của TNDM nên càng khẳng định được vai trò của phân tích trình tự gen trong chẩn đoán bệnh. Việc kết hợp cả hai phương pháp giải trình tự NGS và Sanger giúp cho việc xác định chính xác đột biến ngay từ những bước đầu trở nên dễ dàng và tiết kiệm về mặt thời gian, từ đó ứng dụng giải trình tự Sanger để phát hiện đột biến gây bệnh ở những người trong gia đình trở nên cách đơn giản và tiết kiệm hơn. Quy trình phát hiện đột biến này có thể được ứng dụng rộng rãi với các đột biến liên quan đến đái tháo đường đơn gen nói riêng và có các bệnh di truyền đơn gen khác nói chung. Từ đó, trong tương lai mở rộng quy trình này cho các đối tượng khác mang bệnh.

KẾT LUẬN

Qua kết quả giải trình tự Sanger của những BN mắc đái tháo đường, có thể kết luận quy trình nghiên cứu xây dựng đã phát hiện được đột biến c.3422A>G trên exon 28 của gen *ABCC8*, đồng thời cũng có thể phát hiện được các đa hình hoặc biến dị gây bệnh hoặc có khả năng gây bệnh khác xuất hiện trên exon này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Organization, WH. Classification of diabetes mellitus 2019.
2. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care 2009; 32(Supplement 1):S62-S67.
3. Haghverdizadeh P, et al. *ABCC8* genetic variants and risk of diabetes mellitus. Gene 2014; 545(2): 198-204.

4. Naylor RN, et al. Genetics and pathophysiology of neonatal diabetes mellitus. Journal of Diabetes Investigation 2011; 2(3):158-169.

5. Murphy RS Ellard, AT Hattersley. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic β -cell diabetes. Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism 2008; 4(4):200-213.

6. Edghill EL and AT Hattersley. Genetic disorders of the pancreatic beta cell and diabetes (permanent neonatal diabetes and maturity-onset diabetes of the young). Beta Cell in Health and Disease Springer. 2008:399-430.

7. Patch A, et al. Mutations in the *ABCC8* gene encoding the SUR1 subunit of the KATP channel cause transient neonatal diabetes, permanent neonatal diabetes or permanent diabetes diagnosed outside the neonatal period. Diabetes, Obesity and Metabolism 2007; 9:28-39.

8. De Franco E, et al. Update of variants identified in the pancreatic β -cell KATP channel genes *KCNJ11* and *ABCC8* in individuals with congenital hyperinsulinism and diabetes. Human Mutation 2020; 41(5):884-905.

9. Klee P, et al. A novel *ABCC8* mutation illustrates the variability of the diabetes phenotypes associated with a single mutation. Diabetes & Metabolism 2012; 38(2):179-182.

10. Babenko AP, et al., Activating mutations in the *ABCC8* gene in neonatal diabetes mellitus. New England Journal of Medicine 2006; 355(5): 456-466.

11. Proks P, et al. A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (*ABCC8*) causes neonatal diabetes. Human molecular genetics 2006; 15(11):1793-1800.

12. Kong J,H; JB Kim. Transient neonatal diabetes mellitus caused by a *de novo* *ABCC8* gene mutation. Korean Journal of Pediatrics 2011; 54(4):179.