

# XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN XÓA ĐOẠN GEN RB1 Ở BỆNH NHÂN U NGUYÊN BÀO VỔNG MẠC BẰNG PHƯƠNG PHÁP MLPA

Nguyễn Thị Minh Hà<sup>1</sup>, Lê Thị Phương<sup>1</sup>, Đào Nguyễn Hà Linh<sup>1</sup>  
Nguyễn Hoàng Việt<sup>1</sup>, Phạm Lê Anh Tuấn<sup>1</sup>, Đinh Thúy Linh<sup>2</sup>  
và Trần Văn Khánh<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

<sup>2</sup>Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

U nguyên bào võng mạc (Retinoblastoma - UNBVM) là bệnh ung thư ác tính ở mắt thường gặp ở trẻ em dưới 5 tuổi, gây ra bởi đột biến trên gen RB1. Bệnh xảy ra ở hai dạng: dạng ngẫu nhiên và dạng gia đình. Bệnh gây ra những tổn thương nghiêm trọng về mắt, có thể dẫn đến khoét bỏ mắt, di căn và tử vong bởi nhiều kiểu đột biến gen RB1 khác nhau, trong đó khoảng 20% số trường hợp có mất đoạn lớn hơn 1kb và 30% có mất đoạn nhỏ hơn hay lặp đoạn. Hiện nay, kỹ thuật MLPA là phương pháp được ưu tiên chọn lựa trong chẩn đoán đột biến xóa đoạn lớn, lặp đoạn với độ chính xác cao và cho kết quả nhanh chóng. Nghiên cứu được thực hiện trên mẫu máu ngoại vi và mẫu mô của 20 bệnh nhân u nguyên bào võng mạc nhằm phát hiện các đột biến tế bào mầm di truyền và đột biến soma bằng kỹ thuật MLPA. Kết quả đã phát hiện 2/20 bệnh nhân (10%) có đột biến xóa đoạn dị hợp tử toàn bộ gen RB1 trên cả mẫu máu và mẫu mô.

**Từ khóa:** Retinoblastoma, u nguyên bào võng mạc, RB1, MLPA.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh u nguyên bào võng mạc do đột biến gen RB1 trên nhiễm sắc thể 13 gây nên. Khi gen RB1 bị đột biến, sản phẩm của gen là protein RB bị mất chức năng kiểm soát và tạo thành khối u. Bệnh xuất hiện với tỷ lệ 1/15000 đến 1/20000 trẻ sống, tương đương với khoảng 8000 ca mỗi năm trên toàn thế giới.<sup>1</sup> Tại Việt Nam, khoảng 90 đến 100 ca được chẩn đoán mỗi năm.<sup>2</sup> Việc chẩn đoán sớm bệnh u nguyên bào võng mạc có vai trò quan trọng trong việc điều trị, tiên lượng giúp có thể bảo tồn mắt bị bệnh và tăng khả năng sống của bệnh nhân.

Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng

u nguyên bào võng mạc do đột biến bất hoạt cả 2 bản sao của gen RB1. Khoảng 40% các trường hợp u nguyên bào võng mạc nguyên nhân do di truyền, kiểu di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, tuy nhiên có đặc điểm giống như là một gen trội, bởi vì các đột biến gen RB1 ở các cá thể mang đột biến dị hợp tử sẽ bị mất alen thứ hai và phát triển thành u nguyên bào võng mạc; khoảng 60% các trường hợp còn lại là dạng ngẫu nhiên, không có tính chất di truyền gia đình, chỉ phát hiện đột biến trên mẫu mô u nguyên bào võng mạc.<sup>3-4</sup> Tỷ lệ phát hiện các đột biến trên mẫu mô ung thư là 94,9%, trong khi tỷ lệ phát hiện đột biến trên mẫu máu chỉ là 42,4%; xác định đột biến soma trên mẫu mô ung thư là chỉ điểm để xác định đột biến tế bào mầm trên mẫu máu.<sup>5</sup>

Cho đến nay, đã có hàng nghìn đột biến gen RB1 khác nhau được phát hiện ở bệnh nhân u nguyên bào võng mạc và đã được công bố trên ngân hàng dữ liệu đột biến gen RB1 (RB1 Gene

Tác giả liên hệ: Trần Văn Khánh

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 24/07/2023

Ngày được chấp nhận: 07/08/2023

Mutation Database). Các đột biến gen *RB1* gây bệnh u nguyên bào võng mạc không đồng nhất, xuất hiện rải rác trên vùng promoter và 27 exon, khoảng 45% là đột biến điểm, 20% số trường hợp có mất đoạn lớn hơn 1kb và 30% có mất đoạn nhỏ hơn hay lặp đoạn.<sup>6-8</sup> Trong những năm gần đây, với những ưu điểm nổi trội, kỹ thuật MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) được ưu tiên sử dụng để phát hiện các đột biến xóa đoạn, lặp đoạn. Kỹ thuật MLPA được mô tả lần đầu vào năm 2002 bởi Schouten J.P. và CS, đây là phiên bản mới của phản ứng PCR, trong đó nhiều đoạn DNA đích được khuếch đại chỉ bằng 1 cặp mồi.<sup>5</sup> Kỹ thuật này có thể phân tích trong 1 phản ứng PCR hơn 50 vùng DNA và xác định số lượng bản sao khác nhau của các gen đặc hiệu, bao gồm cả những sự tái sắp xếp nhỏ trong nội bộ của 1 gen. Do đó, MLPA thường được sử dụng trong chẩn đoán ở cấp độ phân tử các bệnh lý di truyền mà nguyên nhân gây bệnh do sự xóa hay lặp đoạn các gen đặc hiệu.

Từ những luận chứng trên, nghiên cứu xác định đột biến xóa đoạn trên gen *RB1* ở những bệnh nhân u nguyên bào võng mạc là rất cần thiết. Dữ liệu của nghiên cứu này không chỉ là thông tin di truyền quan trọng cho bệnh nhân UBNVM cũng như thành viên gia đình bệnh nhân mà còn góp phần bổ sung, khẳng định hệ thống dữ liệu đột biến gây bệnh tại Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu: *Xác định đột biến xóa đoạn trên gen RB1 ở bệnh nhân u nguyên bào võng mạc bằng phương pháp MLPA.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

Mẫu máu ngoại vi (3mL được chống đông bằng EDTA) và mẫu mô ung thư của 20 bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định u nguyên bào võng mạc tại bệnh viện Mắt Trung Ương

theo tiêu chuẩn nhãn khoa (dựa trên tiền sử gia đình, thăm khám lâm sàng, chẩn đoán cận lâm sàng và loại trừ các bệnh cần chẩn đoán phân biệt).

### **Tiêu chuẩn loại trừ**

Bệnh nhân và gia đình không đồng ý tham gia nghiên cứu.

## 2. Phương pháp

### **Thiết kế nghiên cứu**

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

### **Thời gian nghiên cứu**

Từ tháng 08/2022 đến tháng 07/2023.

### **Địa điểm nghiên cứu**

Trung tâm Nghiên cứu Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

### **Quy trình thực hiện:**

+ Tách chiết DNA: DNA tổng số **được** tách chiết từ máu toàn phần chống **đông** EDTA bằng kit The Wizard® Genomic DNA Purification Kit của hãng Promega, USA và từ mẫu mô bằng kit The QIAamp DNA Mini Kit của hãng Qiagen, **Đức**. Quy trình tách chiết tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nanodrop. Mẫu đạt tiêu chuẩn  $OD_{260nm} / OD_{280nm} = 1,8 - 2,0$  được sử dụng để phân tích gen.

+ Quy trình kỹ thuật MLPA: nghiên cứu sử dụng bộ kit SALSA MLPA Probemix P047 *RB1* của hãng MRC Holland (Hà Lan) để phát hiện đột biến gen *RB1*. Bộ kit gồm 55 đầu dò (probe) khác nhau để khuếch đại toàn bộ gen *RB1* và một số gen tham chiếu, sản phẩm khuếch đại có độ dài từ 129 đến 500 nucleotit; 9 đầu dò nội chuẩn có kích thước sản phẩm khuếch đại từ 64 - 105 nucleotit trong đó có 2 đầu dò đặc hiệu cho nhiễm sắc thể giới tính. Quy trình kỹ thuật tuân theo quy trình chung của nhà sản

xuất, gồm các bước cơ bản như sau: biến tính DNA, gắn probe vào gen đích, nối 2 probe bằng enzym ligase, khuếch đại các probe bằng phản ứng PCR, điện di sản phẩm trên hệ thống điện di mao quản ABI3500.

+ Kết quả điện di được phân tích bằng phần mềm Coffalyser để tính giá trị DQ (Dosage Quotients - thương số giữa diện tích đỉnh của mẫu bệnh phẩm và diện tích đỉnh của mẫu đối chứng) và đưa ra kết quả theo hướng dẫn của kit theo bảng dưới đây:

**Bảng 1. Tình trạng gen và giá trị DQ**

Tình trạng gen	DQ
Bình thường	$0,70 < DQ < 1,20$
Xóa đoạn đồng hợp	$DQ = 0$
Xóa đoạn dị hợp	$0,40 < DQ < 0,65$
Lặp đoạn	$DQ > 1,30$

Mỗi probe tương ứng với một exon và tương ứng với một đỉnh; exon 1 có độ dài lớn nên được chia thành 5 đỉnh; 26 exon còn lại, mỗi exon ứng với 1 đỉnh.

Vì tỷ lệ phát hiện đột biến gen trên mẫu mô cao hơn, đầy đủ hơn trên mẫu máu nên trong nghiên cứu này sẽ tiến hành kỹ thuật MLPA trên

mẫu mô trước, những bệnh nhân nào phát hiện đột biến sẽ tiếp tục thực hiện xét nghiệm trên mẫu máu. Qua đó giúp nghiên cứu phát hiện và phân tích được các đột biến soma cũng như các đột biến tế bào mầm di truyền trên gen *RB1* của các bệnh nhân u nguyên bào võng mạc

### 3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ chặt chẽ theo đạo đức nghiên cứu trong Y học. Bệnh nhân và gia đình bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu, được thông báo về kết quả xét nghiệm gen thông qua bác sỹ giúp tư vấn di truyền hoặc lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp. Các thông tin cá nhân, kết quả chẩn đoán hoàn toàn được bảo mật.

## III. KẾT QUẢ

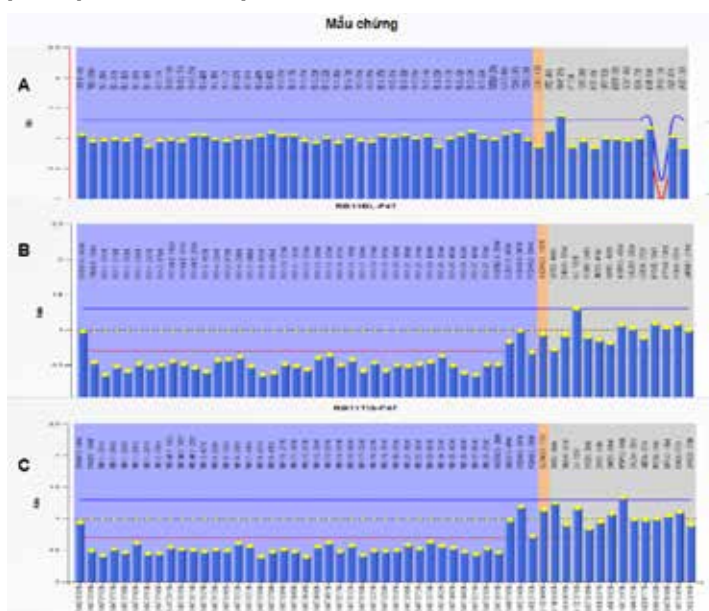
Các mẫu DNA được phân tích toàn bộ 27 exon bằng probemix P047. Mỗi phản ứng MLPA đều chạy kèm mẫu đối chứng là người không mang đột biến gen *RB1*.

Bằng kỹ thuật MLPA, nghiên cứu đã phát hiện 2/20 bệnh nhân (10%) có đột biến xóa đoạn dị hợp tử toàn bộ gen *RB1* ở cả mẫu máu ngoại vi và mẫu mô. Các mẫu đột biến được tìm thấy như bảng 2:

**Bảng 2. Kết quả xác định đột biến gen *RB1* trên các bệnh nhân nghiên cứu**

STT	Mã bệnh nhân	Mẫu bệnh phẩm	Mã bệnh phẩm	Đột biến gen	Mô tả đột biến
1	RB11	Máu	RB11BL-P47	EX1-EX27 Del	Dị hợp tử
		Mô	RB11TIS-P47	EX1-EX27 Del	Dị hợp tử
2	RB13	Máu	RB13BL-P47	EX1-EX27 Del	Dị hợp tử
		Mô	RB13TIS-P47	EX1-EX27 Del	Dị hợp tử

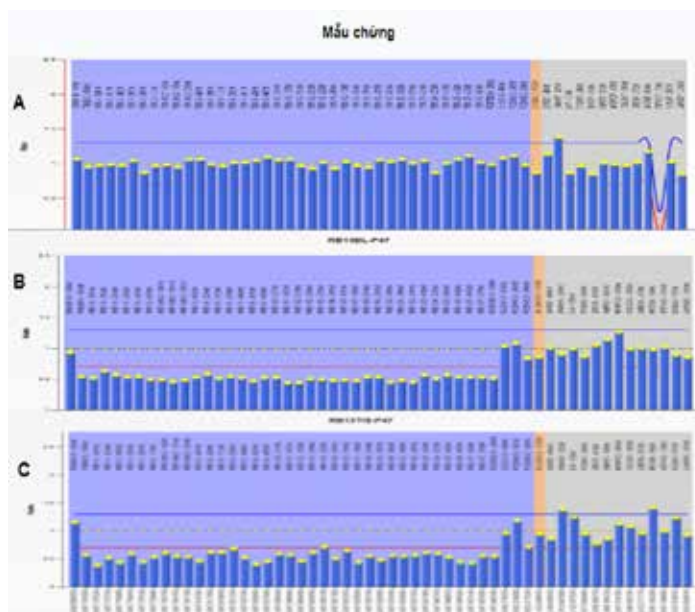
**Kết quả xác định đột biến của bệnh nhân RB11**



**Hình 1. Kết quả MLPA đột biến xóa đoạn dị hợp tử exon 1 – 27 trên gen RB1 của bệnh nhân RB11**

A: Mẫu chứng; B: Mẫu máu ngoại vi của RB11; C: Mẫu mô của RB11

**Kết quả xác định đột biến của bệnh nhân RB13**



**Hình 2. Kết quả MLPA đột biến xóa đoạn dị hợp tử exon 1 – 27 trên gen RB1 của bệnh nhân RB13**

A: Mẫu chứng; B: Mẫu máu ngoại vi của RB13; C: Mẫu mô của RB13

Ở mẫu chứng (mẫu A) cho thấy tất cả các exon của gen *RB1* đều có giá trị DQ nằm trong khoảng 0,7 đến 1,2, chứng tỏ mẫu chứng là người không có đột biến gen *RB1*.

Kết quả thu được ở bệnh nhân RB11, RB13 thì tất cả các sản phẩm khuếch đại của các probe tương ứng với 27 exon của gen *RB1* đều có giá trị DQ nằm trong khoảng 0,4 đến 0,65 (mẫu B, C của hình 1, 2). Như vậy, 2 bệnh nhân trên có đột biến xóa đoạn dị hợp tử toàn bộ 27 exon của gen *RB1*.

#### IV. BÀN LUẬN

U nguyên bào võng mạc là bệnh u ác tính thường gặp ở trẻ em dưới 5 tuổi, khoảng 40% trẻ mắc bệnh thuộc thể di truyền cho thấy vai trò quan trọng của xét nghiệm gen *RB1* đối với việc quản lý bệnh. Việc phát hiện đột biến gen *RB1* trên bệnh nhân u nguyên bào võng mạc sẽ làm cơ sở cho việc chẩn đoán trước sinh cũng như liệu pháp điều trị gen, đồng thời giúp sàng lọc, phát hiện những người lành mang gen gây bệnh nhằm giảm tỷ lệ mắc bệnh. Nghiên cứu này đã áp dụng kỹ thuật MLPA để phát hiện đột biến xóa đoạn/ lặp đoạn trên 27 exon của gen *RB1*.

Từ năm 2006 đến nay ở nhiều công trình nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới đã phát hiện khoảng 15 – 25% các trường hợp u nguyên bào võng mạc do đột biến xóa đoạn/ lặp đoạn lớn trên gen *RB1*. Nghiên cứu của Shahar Frenkel (năm 2016) trên 149 bệnh nhân cho thấy tỷ lệ phát hiện xóa đoạn lớn bằng phương pháp MLPA là 15,8%.<sup>9</sup> Năm 2018, nghiên cứu của Nguyễn Hải Hà và cộng sự trên mẫu máu của 34 bệnh nhân u nguyên bào võng mạc đã phát hiện 6/34 (17,65%) trường hợp có đột biến xóa toàn bộ hoặc một phần gen ở trạng thái dị hợp tử.<sup>3</sup> Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy đã phát hiện 2/20 bệnh nhân có đột biến xóa đoạn lớn, chiếm 10%. Tất cả đều là đột biến xóa đoạn dị hợp tử toàn bộ gen *RB1*, đột biến này đã được công bố trên ngân hàng

đột biến gen *RB1* trên LOVD3 (Leiden Open Variation Database 3.0). Kết quả nghiên cứu đã bổ sung dữ liệu cho phổ đột biến của bệnh nhân mắc u nguyên bào võng mạc tại Việt Nam.

Các nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng cá thể mang thể đột biến dị hợp tử gen *RB1* sẽ bị mất alen thứ hai và phát triển thành u nguyên bào võng mạc do giả thuyết tái tổ hợp trong nguyên phân. Hai nhiễm sắc thể tương đồng mang 2 alen dị hợp, tại giai đoạn pha S, bộ gen nhân đôi, đồng thời nhiễm sắc thể mang gen *RB1* đột biến cũng được nhân đôi; tại pha G2 và M xảy ra hiện tượng tái tổ hợp trong nguyên phân một phần của hai nhiễm sắc thể tương đồng. Khi các nhiễm sắc thể sắp xếp trên mặt phẳng xích đạo của thoi vô sắc, quá trình phân chia nhiễm sắc thể một cách ngẫu nhiên diễn ra và có thể tạo thành tế bào mang đồng thời hai đoạn gen chứa 2 alen đột biến của gen *RB1*. Gen *RB1* có chức năng điều hòa chu trình tế bào bằng cách sản xuất protein RB tham gia trực tiếp vào chu trình tế bào của tế bào võng mạc. Vì vậy, khi cả 2 alen bị đột biến sẽ làm mất chức năng của gen *RB1*, kết quả là các tế bào tiền thân võng mạc tăng sinh không kiểm soát và tạo ra khối u. Do đó, ở 2 bệnh nhân RB11, RB13 của nghiên cứu có đột biến xóa đoạn dị hợp tử toàn bộ gen *RB1* sẽ hình thành nên u nguyên bào võng mạc.

Cơ chế phát sinh u nguyên bào võng mạc có thể do di truyền hoặc không di truyền, trong đó không di truyền chiếm 60% và phần lớn các trường hợp khối u là rải rác (90%), tồn tại trong các mô của bệnh nhân hoặc trong các tế bào giao tử của bố mẹ. Do đó, tỷ lệ phát hiện đột biến gen *RB1* trong mẫu mô u cao hơn nhiều so với trong mẫu máu ngoại vi (94,9% và 42,4%). Nghiên cứu này được thực hiện trên cả mẫu mô và mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân nhằm phát hiện đầy đủ nhất tất cả các đột biến và là cơ sở cho tư vấn di truyền gia đình. Đột biến phát hiện trong nghiên cứu là những đột biến

xóa đoạn lớn, phát hiện tương đồng trên cả 2 loại mẫu bệnh phẩm. Điều này cũng chứng tỏ rằng, 2 bệnh nhân đều mắc u nguyên bào võng mạc thể di truyền, được thừa hưởng gen *RB1* đột biến từ bố hoặc mẹ. Các bệnh nhân này sẽ di truyền gen đột biến cho đời con vì đột biến gen *RB1* thể di truyền xuất hiện trong tất cả các tế bào của người bệnh, bao gồm cả tế bào sinh sản. Kết quả là các trường hợp mắc thể di truyền thường bị hai mắt và đa ổ, có một phần nhỏ bị một mắt đã được quan sát.<sup>10</sup>

Nghiên cứu cần mở rộng trên nhiều bệnh nhân để đưa ra đầy đủ hơn về đột biến gen *RB1* ở bệnh nhân u nguyên bào võng mạc tại Việt Nam, đồng thời khảo sát được sự khác biệt khi thực hiện xét nghiệm giữa mẫu máu ngoại vi và mẫu mô.

## V. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật MLPA, nghiên cứu đã phát hiện được 2/20 bệnh nhân (tỷ lệ 10%) mang đột biến xóa đoạn dị hợp tử toàn bộ gen *RB1* trên cả mẫu máu ngoại vi và mẫu mô ung thư.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ kinh phí bởi Đề tài nghiên cứu khoa học và công nghệ cấp Bộ Y tế “Nghiên cứu đặc điểm di truyền đột biến gen *RB1* trên bệnh nhân u nguyên bào võng mạc và các thành viên gia đình; đề xuất quy trình xét nghiệm di truyền sàng lọc và chẩn đoán sớm” theo quyết định số 2358/QĐ-BYT ngày 14/5/2021. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dimaras H, Corson TW, Cobirnik D, et al. Retinoblastoma, *Nat Rev Dis Primer*. 2015; 1:15021. doi:10.1038/nrdp.2015.21.
2. Nguyen Hai Ha, Nguyen Thị Thanh Hoa, Vu NP, et al. Mutational screening of

germline *RB1* gene in Vietnamese patients with retinoblastoma reveals three novel mutations. *Mol Vis*. 2018; 24:231-238.

3. Retinoblastoma - Springer US (2010) (Pediatric Oncology) Michael A. Dyer, Carlos Rodriguez-Galindo, Matthew W. Wilson.

4. Nguyen Công Kiệt, Le Thai Khuong, Do Minh Duc, et al. Spectrum of mutations in the *RB1* gene in Vietnamese patients with retinoblastoma. *Mol Vis*. 2019; 25:215-221.

5. Tomar S, Sethi R, Sundar G, Quah TC, Quah BL, Lai PS. Mutation spectrum of *RB1* mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling. *PloS One*. 2017; 12(6): e0178776. doi: 10.1371/journal.pone.0178776.

6. Tomar s. Sethi R, Sundar G, Quah TC, Quan BL Lai PS. Mutation spectrum of *RB1* mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counseling. *Plos one*. 2017; 12(6): e0178776. doi:10.1371/journal.pone.0178776.

7. Xie Y. Xu XL, Wei WB. The *RB1* Mutation Spectrum and Genetic Management Consultation in Pediatric Patients with Retinoblastoma in Beijing, China. *Risk management and healthcare policy*. 2021; 14:3453-3463.doi:10.2147/mhp.S322373.

8. Valverde J, Alonso J, Palacios I, Pestana A. *RB1* gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC genetics*. Nov 4 2005; 6:53. doi:10.1186/1471-2156-6-53

9. Frenkel S, Zloto O, Sagi M, Fraenkel A, Pe'è J. Genotype-phenotype correlation in the presentation of retinoblastoma among 149 patients. *Exp Eye Res*. May 2016; 146:313-317. Doi:10.1016/j.exer.2016.04.002.

10. Gao I, Zeng J, Guo B. He w. Chen J. Lu F. Chen D (2016). Clinical presentation and treatment outcome of retinoblastoma in children of Sourh Westermn China. *Medicine (Baitimore)*. 95(42), e5204.

## Summary

### IDENTIFY DELETION MUTATIONS IN THE RB1 GENE IN RETINOBLASTOMA PATIENTS BY MLPA METHOD

Retinoblastoma (RB) is a common ocular malignancy in children under 5 years of age, caused by mutations in the *RB1* gene. The disease occurs in two forms, sporadic and familial form. The disease causes severe ocular damage, which can lead to ophthalmectomy, metastasis, and death by many different *RB1* gene mutations, of which about 20% of cases have deletions greater than 1kb and 30% have smaller segment loss or repeats. Nowadays, the MLPA technique is the preferred method of choice in diagnosing large deletion mutations, repeating segments with high accuracy and quick results. The study was carried out on peripheral blood and tissue samples of 20 UNBVM patients to detect genetic germ cell mutations and somatic mutations by MLPA technique. The results detected that 2/20 patients (10%) had a heterozygous deletion mutation of the whole *RB1* gene in both blood and tissue samples.

**Keyword: Retinoblastoma, *RB1*, MLPA.**