

XÁC ĐỊNH CÁC BIẾN THỂ GEN *HBB* Ở NGƯỜI BỆNH B-THALASSEMIA TẠI VIỆN HUYẾT HỌC - TRUYỀN MÁU TRUNG ƯƠNG

Phạm Trịnh Trúc Phượng¹, Dương Quốc Chính²
Nguyễn Thanh Ngọc Bình² và Nguyễn Quang Tùng^{2,3,✉}

¹Trường Y Dược, Đại học Đà Nẵng

²Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương

³Trường Đại học Y Hà Nội

β-thalassemia là bệnh lý huyết học di truyền đơn gen phổ biến nhất trên thế giới. Để xác định các biến thể gen *HBB* ở 224 người bệnh *β-thalassemia*, DNA được tách từ máu ngoại vi chống đông bằng EDTA-K2 và tiến hành phân tích bằng các kỹ thuật: MARMS-PCR, giải trình tự gen Sanger và MLPA. Kết quả đã phát hiện tổng số 416 biến thể ở 224 người bệnh *β-thalassemia* tại 5 vị trí khác nhau trên gen *HBB*. CD26 (*HbE*), CD17 là hai biến thể được tìm thấy với tỉ lệ cao nhất lần lượt là 31,7% và 30,5%. *HBB:c.79G>C* và *HBB:c.316-185C>T* chưa từng được ghi nhận ở Việt Nam.

Từ khóa: *β-thalassemia*, MARMS-PCR, giải trình tự gen, MLPA *HBB*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thalassemia là bệnh tan máu di truyền đơn gen phổ biến nhất trên thế giới. Bệnh xảy ra do các biến thể trên gen *HBB* gây rối loạn trong quá trình tổng hợp chuỗi protein β -globin.¹ Cụm gen β -globin gồm 3 exon và 2 intron trên nhiễm sắc thể 11 (bao gồm: *HBE1*, *HBG2*, *HBG1*, *HBD* và *HBB*).^{1,2} β -globin cùng với α -globin là hai protein tham gia vào quá trình tổng hợp huyết sắc tố A1 ở người trưởng thành, do đó khi β -globin bị giảm hoặc mất làm mất cân bằng tỉ lệ giữa chuỗi α và không α dẫn đến ứ đọng Hem trong các chuỗi α -globin làm cản trở sự trưởng thành của hồng cầu. Hiện nay đã phát hiện hơn 290 biến thể gây bệnh *β-thalassemia* phân bố tùy thuộc vào khu vực, quốc gia và dân tộc. Có 08 biến thể gây ra 95% các trường hợp *β-thalassemia* ở Việt Nam, gồm CD17, CD41/42, -28, CD71/72,

IVSI-1, IVSI-5, IVSII-654 và CD26 trong đó biến thể CD26, CD17, CD41/42 là ba biến thể gây bệnh thường gặp nhất với tỉ lệ khác nhau ở mỗi vùng miền.³⁻⁵ Ngoài ra còn có một tỉ lệ nhỏ người bệnh *β-thalassemia* liên quan đến các biến thể mất đoạn gen *HBB*. Một số kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng để phát hiện biến thể gen *HBB* như ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reactions), gap PCR, Stripassay, giải trình tự gen, MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification). Tỉ lệ từng loại biến thể gen *HBB* thường khác nhau ở mỗi quốc gia và vùng miền, tuy nhiên, quá trình di cư đã làm lan truyền các biến thể giữa các quốc gia trên thế giới. Các nghiên cứu xác định tỉ lệ biến thể gây bệnh thường gặp giúp các phòng xét nghiệm áp dụng các kỹ thuật phù hợp để rút ngắn thời gian và tiết kiệm chi phí chẩn đoán. Vì vậy, nghiên cứu sử dụng kỹ thuật ARMS-PCR đa mồi (MARMS-PCR) phát hiện 10 biến thể thường gặp, giải trình tự gen Sanger để phát hiện các biến thể hiếm gặp và MLPA để xác định các biến thể gây mất

Tác giả liên hệ: Nguyễn Quang Tùng
Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương
Email: nguyenquangtung@hmu.edu.vn
Ngày nhận: 24/09/2024
Ngày được chấp nhận: 09/10/2024

đoạn gen *HBB* với mục tiêu: Xác định tỉ lệ các biến thể gen *HBB* ở người bệnh β -thalassemia tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương từ năm 2022 đến 2023.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

224 người bệnh được chẩn đoán xác định β -thalassemia theo “Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh lý huyết học” của Bộ Y tế, ban hành năm 2022 và được xét nghiệm để phát hiện biến thể gen *HBB*.⁶

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Địa điểm nghiên cứu

Khoa Di truyền – Sinh học phân tử, Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương.

Quy trình thực hiện:

Thu thập mẫu: Khoảng 2mL máu ngoại vi chống đông EDTA-K2.

Tách chiết và đo độ tinh sạch DNA: DNA tổng số được tách chiết DNA bằng bộ kit Wizard Genomic DNA Purification của hãng Promega (Mỹ). Kiểm tra độ tinh sạch bằng máy đo Nanodrop 2000. Bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích.

Phân tích mẫu: Lần lượt thực hiện các kỹ thuật sau:

(1) *MARMS-PCR:* Xác định 10 biến thể thường gặp ở Việt Nam là IVS2-654, IVS1-1, CD8/9, CD95, CD41/42, CD17, IVS1-5, -28,

CD26 (HbE), CD71/72, sử dụng hóa chất của hãng Promega (Mỹ) thực hiện trên máy Mastercycler Nexus.

(2) *Phương pháp phân tích biến thể gây bệnh hiếm gặp:*

- Giải trình tự gen Sanger sử dụng bộ kit của hãng Applied Biosystem (Mỹ). Phân tích kết quả bằng phần mềm CLC Genomic Workbench 20 hãng Qiagen (Đức).

- Kỹ thuật MLPA sử dụng bộ kit SALSA MLPA của hãng MRC (Hà Lan).

Các kỹ thuật MARMS-PCR, giải trình tự gen Sanger và MPLA được thực hiện tại khoa Di truyền- Sinh học phân tử, viện Huyết học - Truyền máu Trung ương theo quy trình kỹ thuật đã được phê duyệt và áp dụng thường quy tại Viện.

Xử lý số liệu

Bằng phần mềm SPSS 20.0

3. Đạo đức nghiên cứu

Đây là nghiên cứu mô tả cắt ngang, thông tin được thu thập từ kết quả lưu trong hồ sơ xét nghiệm của người bệnh và được bảo mật. Số liệu được thu thập trung thực và chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ

Bằng phương pháp MARMS-PCR, có 215/224 người bệnh phát hiện mang biến thể gen *HBB*, 9 người bệnh được xác định các biến thể hiếm gặp bằng phương pháp giải trình tự gen Sanger hoặc MLPA.

Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	Giá trị trung vị	Đặc điểm	Giá trị trung vị
Tuổi	9	HbA1 (%)	40,7
Hb (g/L)	75,5	HbA2 (%)	1,8
MCV (fL)	67,6	HbE (%)	38,4
MCH (pg)	20,9	HbF (%)	26,7

Giá trị trung vị của tuổi trong nghiên cứu là 9 tuổi. Đặc điểm nổi bật là hồng cầu nhỏ với thể tích trung bình hồng cầu (MCV) thấp (trung vị

là 67,6 fL) và nhược sắc với lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) giảm (trung vị 20,9 pg).

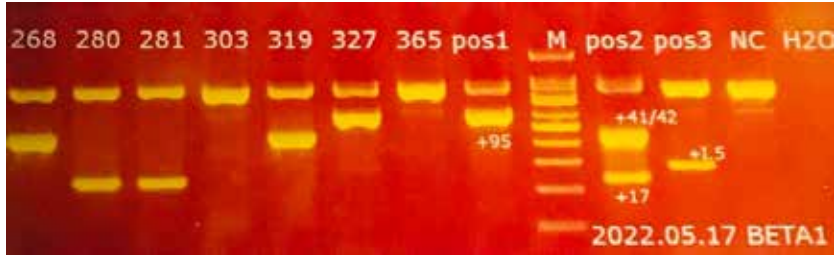
Bảng 2. Tỷ lệ các biến thể gen *HBB* bằng phương pháp MARMS-PCR, giải trình tự Sanger và MLPA

STT	Kỹ thuật	Biến thể	Kiểu hình	Số lượng	Tỷ lệ %	
1	MARMS-PCR	CD26 (HbE)	β^E	132	31,7	
2		CD17	β^0	127	30,5	
3		CD41/42	β^0	95	22,8	
4		-28	β^+	16	3,8	
5		CD71/72	β^0	15	3,6	
6		IVS-I-1	β^0	11	2,6	
7		CD95	β^0	6	1,4	
8		IVS-II-654	β^+	4	1,0	
9		CD146	β^+	2	0,5	
10		HbKing'sMillG>C	β^+	1	0,2	
11		Giải trình tự gen Sanger	IVS-II-666	β^+	1	0,2
12			CD22	β^+	2	0,5
13			-88	β^+	1	0,2
14	MLPA	Mất đoạn	β^+	3	0,7	
Tổng				416	100	

β^0 -thalassemia là các đột biến làm mất chức năng gen β -globin nên không tổng hợp được chuỗi β -globin;

β^+ -thalassemia là các đột biến làm giảm chức năng gen β -globin nên giảm tổng hợp chuỗi β -globin ở nhiều mức độ khác nhau.

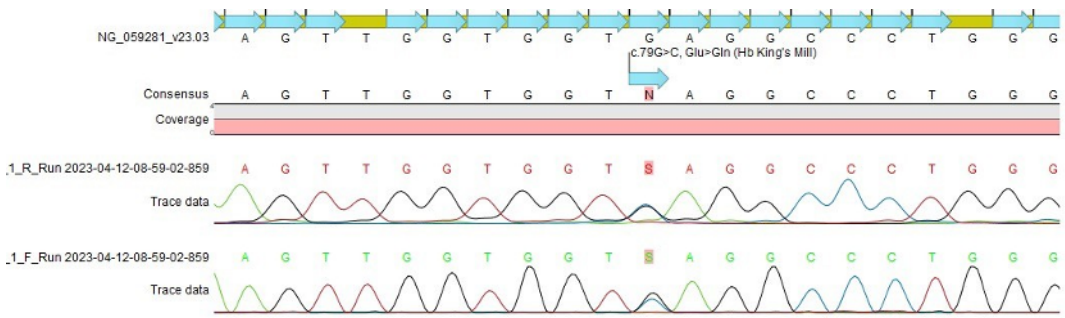
Phương pháp MARMS-PCR phát hiện hơn 97% biến thể gen *HBB* trong tổng số 416 biến thể được phát hiện ở 224 đối tượng nghiên cứu. CD26, CD17 và CD41/42 là ba biến thể chiếm tỉ lệ cao lần lượt là: 31,7%, 30,5% và 22,8%. Một vài biến thể hiếm gặp được phát hiện bằng phương pháp giải trình tự gen Sanger và MLPA.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm MARMS- PCR

M: Marker; pos1,2,3: chứng dương biến thể CD95, CD41/42, CD17, IVS1-5; NC: chứng âm; 268, 280, 281, 303, 319, 327, 365: viết tắt mã người bệnh.

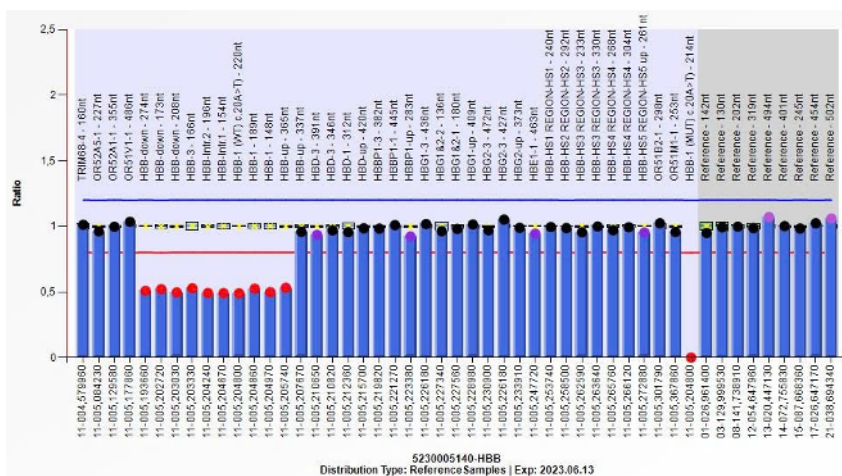
Có 07 biến thể được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger trên 6 người bệnh. Trong đó, có hai biến thể là *HBB:c.79G>C* (pGlu27Gln) và *HBB:c.316-185C>T* chưa từng được báo cáo tại Việt Nam.



Hình 2. Kết quả giải trình tự Sanger

Người bệnh mang biến thể hiếm gặp *HBB:c.79G>C* (HbKing'sMillG>C) dị hợp tử

được phát hiện bằng giải trình tự gen Sanger.



Hình 3. Kết quả MLPA phát hiện biến thể mất đoạn gen *HBB*

Người bệnh mã số 5230005140 mang biến thể mất đoạn lớn gen *HBB* bao gồm vùng

promoter đến exon 3.

Bảng 3. Tần suất các biến thể gen *HBB* theo vị trí

STT	Tên biến thể	Biến đổi c.DNA	Biến đổi protein	Exon/ Intron	Tần số (n)	Tỉ lệ (%)
1	-28	<i>HBB</i> :c.-78A>G		UTR (5')	16	3,8
2	-88	<i>HBB</i> :c.-138C>T		UTR (5')	1	0,2
3	CD26	<i>HBB</i> :c.79G>A	p.Glu27Lys	Exon 1	132	31,7
4	HbKing'sMill	<i>HBB</i> :c.79G>C	p.Glu26Gln	Exon 1	1	0,2
5	CD17	<i>HBB</i> :c.52A>T	p.Lys18*	Exon 1	127	30,5
6	CD22	<i>HBB</i> :c.67G>C	p.Glu22Gln	Exon 1	2	0,5
7	CD41/42	<i>HBB</i> :c.126_129delTTCT	p.Phe42fs	Exon 2	95	22,8
8	CD71/72	<i>HBB</i> :c.216_217insA	p.Ser73fs	Exon 2	15	3,6
9	CD95	<i>HBB</i> :c.287_288insA	p.Lys96fs	Exon 2	6	1,4
10	IVS-I-1	<i>HBB</i> :c.92+1G>T		Intron 1	11	2,6
11	IVS-II-654	<i>HBB</i> :c.316-197C>T		Intron 2	4	1,0
12	IVS-II-666	<i>HBB</i> :c.316-185C>T		Intron 2	1	0,2
13	CD146	<i>HBB</i> :c.441_442insAC		Intron 2	2	0,5
14	Mất đoạn lớn gen <i>HBB</i> bao gồm vùng promoter đến exon 3			Gen <i>HBB</i>	3	0,7

UTR (untranslated region: Vùng không dịch mã)

Các biến thể xảy ra tại 5 vị trí khác nhau của gen *HBB*; hầu hết ở exon 1 và exon 2 (tổng là 90,9%); hiếm khi xảy ra ở intron II (chỉ khoảng 1,7%), còn biến thể ở vùng khởi động chỉ là 4,1%. Có ba biến thể mất đoạn lớn toàn bộ gen *HBB* bao gồm vùng promoter đến exon 3.

IV. BÀN LUẬN

MARMS-PCR là kỹ thuật đơn giản được sử dụng rộng rãi để phát hiện biến thể gen *HBB* tại Việt Nam.^{3,5} Tuy nhiên, một số trường hợp có MCV < 80fL, MCH < 28pg, kết quả điện di

có thành phần hemoglobin bất thường, nhưng không phát hiện biến thể thường gặp bằng các kỹ thuật MARMS-PCR, chúng tôi tiến hành kỹ thuật giải trình tự DNA bằng phương pháp Sanger hoặc tìm biến thể mất đoạn bằng kỹ thuật MLPA. Nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện được tổng số 416 biến thể trong 224 đối tượng nghiên cứu với tần suất xuất hiện của ba biến thể thường gặp là CD26 (HbE), CD17 và CD41/42 với tỉ lệ lần lượt là 31,7%, 30,5% và 22,8%. So sánh với một số nghiên cứu trong nước:

Bảng 4. So sánh tần suất biến thể gen *HBB* ở Việt Nam

Biến thể	Nghiên cứu này (%)	Miền Trung (%)	Miền Nam (%)
CD26/ HbE	31,7	35,5	31,3
CD17	30,5	25,0	17
CD41/42	22,8	18,8	24,0
-28	3,8	2,1	4,96
CD71/72	3,6	6,3	4,7
IVSI-1	2,6	8,3	3,9
CD95	1,4	2,1	7,1
IVSII-654	1	-	4,8
CD14/15	-	2,1	-
CD8/9	-	-	-
Khác	2,4	-	1
Tổng số biến thể	416	46	99

Thứ tự thường gặp của các biến thể trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu đã thực hiện tại miền Trung và tại miền Nam, Việt Nam. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi biến thể CD17 chiếm đến 30,5% cao hơn so với hai nghiên cứu còn lại là 25,0% ở miền Trung và 17,0% ở miền Nam. Tỷ lệ biến thể khác nhau tùy theo địa dư và dân tộc nên khác biệt này có thể do có sự khác nhau về đối tượng trong mỗi nghiên cứu. Trong tổng số các biến thể được phát hiện trong nghiên cứu, hai biến thể gồm *HBB:c.79G>C* (HbKing'Mill) và *HBB:c.316-185C>T* (IVS-II-666) chưa từng được báo cáo ở Việt Nam. Biến thể *HBB:c.79G>A* (CD26G>A) làm thay thế Glutamat bằng Lysin dẫn đến tổng hợp một chuỗi globin khác với chuỗi β -globin, khi kết hợp với chuỗi α -globin tạo nên huyết sắc tố E. Đây là dạng biến thể hemoglobin thường phối hợp với các biến thể gây bệnh β -thalassemia, thường gặp ở Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam. Trong khi đó, biến thể mới phát hiện là *HBB:c.79G>C* lại thay thế Glutamat

thành Glutamin tạo kiểu hình Hb King'sMill. Cụ thể, kết quả điện di huyết sắc tố ở người bệnh mang biến thể này thấy hình ảnh HbA là 55,1%, HbA2 là 2,7%, Hb King'sMill là 42,2%, không có hình ảnh HbE. Biến thể *HBB:c.79G>C* không gây bệnh HbE và cũng được ghi nhận là biến thể hiếm gặp ở Iraq theo AlMosawi (2020).⁷ Bên cạnh đó, biến thể *HBB:c.316-185C>T* là một trong các đa hình trên intron II thường được tìm thấy ở khu vực Trung Đông, tuy nhiên ở khu vực Đông Nam Á còn ít báo cáo, Aziz và cộng sự đã ghi nhận có biến thể này tại cộng đồng dân cư Malaysia (2021).⁸ Hai trường hợp mang kiểu gen dị hợp tử CD17 phối hợp *HBB:c.67G>C* (pGlu23Gln), người bệnh có kết quả điện di huyết sắc tố với tỷ lệ HbE trên 82%, tuy nhiên kỹ thuật MARMS-PCR chỉ phát hiện biến thể CD17, biến thể CD26 âm tính, vì vậy chúng tôi tiếp tục tiến hành giải trình tự Sanger và phát hiện thêm biến thể *HBB:c.67G>C* (pGlu23Gln). Sự xuất hiện các biến thể mới này tại Việt Nam có thể do tác động bởi quá trình di cư. Bên cạnh đó, 3

người bệnh có đặc điểm điện di hemoglobin bất thường với tỉ lệ HbF lần lượt là: 17,6%, 23,8% và 24,2% được phát hiện mang biến thể mất đoạn gen *HBB* bằng kỹ thuật MLPA.

Các biến thể được phát hiện trong nghiên cứu nằm trên các vị trí khác nhau của gen *HBB*. Các biến thể này thường xảy ra trên exon 1 và exon 2. Có 3 biến thể mất đoạn lớn toàn bộ gen *HBB* bao gồm vùng Promoter đến exon 3. Từ kết quả này cho thấy tỉ lệ người bệnh β^0 -thalassemia phổ biến hơn β^+ -thalassemia. Kết quả của chúng tôi tương đồng với công bố của Phan Thị Xinh (2022).⁵

V. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật MARMS- PCR, giải trình tự gen Sanger và MLPA phân tích trên 224 người bệnh β -thalassemia đã phát hiện 14 kiểu biến thể tại 5 vị trí khác nhau trên gen *HBB*, trong đó CD26 (HbE), CD17 là hai biến thể được tìm thấy với tỉ lệ cao nhất. Kỹ thuật giải trình tự gen Sanger phát hiện hai biến thể mới tại Việt Nam là *HBB*:c.79G>C và *HBB*:c.316-185C>T.

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Khoa Di truyền - Sinh học phân tử và các đồng nghiệp tại Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Thalassemia international federation, Global Thalassemia Review. *TIF Accessed: Apr. 21, 2023. [Online]. Available: https://*

thalassaemia.org.cy/what-we-do/global-thalassaemia-review/.

2. Costa E, Cappellini MD, Rivella S, et al. Emergent treatments for β -thalassemia and orphan drug legislations. *Drug Discovery Today*. 2022; 27 (11): 103342.

3. Doro MG, Casu G, Frogheri L, et al. Molecular Characterization of β -Thalassemia Mutations in Central Vietnam. *Hemoglobin*. 2017; 41 (2): 96–99.

4. Svasti MLS, Hieu T M, Munkongdee T, et al. Molecular analysis of β -thalassemia in South Vietnam. *American Journal of Hematology*. 2002; 71 (2): 85–88.

5. Xinh PT, Chuong HQ, Ha NTT, et al. Spectrum of *HBB* gene mutations among 696 β -thalassemia patients and carriers in Southern Vietnam. *Mol Biol Rep*. 2022; 49(4): 2601–2606.

6. Bộ Y Tế, Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh lý huyết học, *Quyết định số 1832/QĐ-BYT, 2022, 20-31.*

7. AlMosawi RHN, Al-Rashedi NAM, Ayoub NI. Clinical Laboratory Manifestation and Molecular Diagnosis of β -Thalassemia Patients in Iraq. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2020; 42 (1): 27–31.

8. Aziz NA, Taib WR, Kharolazaman NK, et al. Evidence of new intragenic *HBB* haplotypes model for the prediction of beta-thalassemia in the Malaysian population. *Scientific Reports*. 2021; 11 (1): 16772.

Summary

SPECTRUM OF *HBB* GENE VARIATIONS IN B-THALASSEMIA PATIENTS AT THE NATIONAL INSTITUTE OF HEMATOLOGY AND BLOOD TRANSFUSION

β -thalassemia is one of the most common hematological diseases caused by inherited autosomal pathogenic variants. DNA was extracted from peripheral blood samples anticoagulated with EDTA-K2 in 224 β -thalassemia patients, and the *HBB* gene variants were detected using MARMS-PCR, Sanger sequencing or MLPA. The results identified 416 variants in 224 β -thalassemia patients at five positions in the *HBB* gene cluster. The two most common variants found were CD26 (HbE) accounted for 31.7%, and CD17 accounted for 30.5%. Interestingly, we also identified HBB:c.79G>C and HBB:c.316-185C>T. This was the first time that both variants were discovered in the Vietnamese population.

Keywords: β -thalassemia, MARMS-PCR, Gene sequencing, MLPA *HBB*.