

# PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN G6PD Ở BỆNH NHÂN DÂN TỘC THÁI THIẾU HỤT ENZYME GLUCOSE-6-PHOSPHATASE DEHYDROGENASE

Trần Huy Thịnh, Ngô Thị Thảo và Trần Văn Khánh✉

Trường Đại học Y Hà Nội

*Xác định đột biến gen Glucose-6-phosphatase dehydrogenase (G6PD) ở nhóm dân tộc Thái thiếu hụt enzyme G6PD. 16 bệnh nhân thuộc dân tộc Thái đã được chẩn đoán thiếu enzyme G6PD tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Các bệnh nhân này được tiến hành xác định đột biến gen G6PD; Phương pháp giải trình tự gen trực tiếp được sử dụng để phát hiện các đột biến. Phát hiện được 6 đột biến thay thế nucleotid làm thay đổi acid amin tương ứng trên exon 2, 9, 11 và 12. Trong đó, đột biến tại các vị trí c.871G>A (Viangchan), c.1360C>T (Union) chiếm tỷ lệ cao nhất 25%, 18.8%, còn lại các dạng đột biến c.1388G>A (Kaiping), c.95A>G (Gaohe) và c.1376G>T (Canton) được phát hiện với tỷ lệ bằng nhau 12.5%. 1 trường hợp mang đột biến Chinese-5 (c.1024C>T). Biến đổi nucleotide vị trí số c.1311C>T có 4 trường hợp.*

**Từ khóa:** enzyme G6PD, dân tộc Thái.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thiếu Glucose-6-phosphatase dehydrogenase (G6PD) là bệnh lý di truyền về enzyme hay gặp nhất ở người với khoảng 400 triệu người trên thế giới mắc bệnh, đặc biệt ở các nước thuộc châu Á, châu Phi, Trung Đông và Địa Trung Hải.<sup>1</sup> Bệnh gây nên bởi đột biến trên gen G6PD, dẫn đến việc giảm hoặc ngừng quá trình tổng hợp enzyme. Đa số các trường hợp thiếu hụt G6PD không có triệu chứng hoặc chỉ biểu hiện nhẹ như vàng da sơ sinh. Tuy nhiên, khi tiếp xúc với một số loại thuốc, hóa chất hay thức ăn có tính oxy hóa cao, hồng cầu của người bị thiếu G6PD sẽ bị tán huyết nhanh chóng, dẫn những cơn tan máu. Ở trẻ sơ sinh thiếu enzyme G6PD có liên quan đến tăng nguy cơ mắc bệnh vàng da sơ sinh và tổn thương não do tăng bilirubin.<sup>2</sup> Điều trị bệnh tạm thời dừng lại ở điều trị triệu chứng vì vậy phát hiện sớm nhằm

tư vấn giúp nâng cao chất lượng sống cho người bệnh, phòng tránh được các biến chứng có thể xảy ra do thiếu enzyme G6PD là việc làm quan trọng và ý nghĩa.

Gen quy định tổng hợp enzyme G6PD nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể giới tính X tại vị trí Xq28, gen có độ dài khoảng 18,5kb, gồm 13 exon và 12 intron. Exon 1 và một đầu 5' của exon 2 không mã hóa, bộ ba mã hóa đầu tiên nằm trên exon 2. Kích thước của các exon có mã hóa thay đổi rất nhiều từ 38 đến 236bp. Đến nay, hơn 180 đột biến đã được xác định trên thế giới, trong đó hầu hết là đột biến thay thế một nucleotid.<sup>3</sup>

Qua khảo sát cho thấy, tỷ lệ mắc bệnh có sự khác nhau khá lớn giữa các quốc gia, giữa các dân tộc và vùng miền trong mỗi quốc gia. Tỷ lệ thiếu hụt G6PD tại Việt nam vào khoảng 9,7%, với tỷ lệ mắc bệnh của nhóm dân tộc phía Bắc là từ 0,5 - 31% và ở các nhóm dân tộc phía Nam là 1,9 - 4,4%.<sup>4</sup> Ngoài ra, sự phân bố các dạng đột biến cũng mang tính đặc trưng giữa các quốc gia, dân tộc. Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã chia các biến thể của bệnh lý thiếu

Tác giả liên hệ: Trần Văn Khánh

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 18/05/2022

Ngày được chấp nhận: 26/05/2022

hạt G6PD thành 4 lớp, dựa vào hoạt độ của enzyme trong hồng cầu và biểu hiện lâm sàng của chúng.<sup>1</sup> Các dạng đột biến khác nhau có thể gây nên các mức độ thiếu hụt G6PD khác nhau, từ đó dẫn đến những hình thái lâm sàng khác nhau, tùy thuộc vào mức độ quan trọng về chức năng của vùng xảy ra đột biến. Tuy nhiên, tại Việt Nam các nghiên cứu về bệnh ở mức độ phân tử vẫn còn hạn chế và thông tin liên quan đến đặc điểm phân tử của G6PD của Việt Nam cho đến nay vẫn còn rời rạc. Để tiếp tục tìm hiểu về vấn đề này, chúng tôi tiến hành thăm dò đột biến gây bệnh cho các trẻ thuộc dân tộc Thái thiếu enzyme G6PD với mục tiêu: "*Phát hiện các đột biến trên gen G6PD ở bệnh nhân dân tộc Thái thiếu hụt enzyme G6PD*".

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

16 bệnh nhi thuộc dân tộc Thái đã được chẩn đoán thiếu hụt enzyme G6PD tại Bệnh viện Nhi Trung ương trong thời gian từ 7/2019 đến tháng 6/2021 với hoạt độ enzyme G6PD dưới 200U/10<sup>12</sup> hồng cầu.

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội trong khoảng thời gian từ tháng 7/2019 đến tháng 12/2021.

### 2. Phương pháp

#### Tách chiết DNA

Thu thập 2ml mẫu máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA. Sử dụng kit Wizard Genomic DNA purification của hãng Promega tách DNA từ bạch cầu máu ngoại vi. Đo nồng độ DNA và

độ tinh sạch bằng máy Nano-Drop, mẫu đạt tiêu chuẩn OD280/OD260 1,8 được sử dụng để phân tích gen.

#### Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)

Sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp (Sanger sequencing) để xác định đột biến, với 7 cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại toàn bộ chiều dài gen G6PD. Thành phần của phản ứng PCR tổng thể tích 10µl gồm: 1µl DNA mẫu, 0,5µl mồi xuôi 10 pM/µl và 0,5µl mồi ngược 10 pM/µl, GoTaq G2 Hot Start master mix (2X) 5µl, H<sub>2</sub>O 3µl. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C/2phút, 35 chu kỳ nhiệt [94°C/30 giây, 60°C/25 giây, 72°C/40 giây], 72°C/ 5 phút. Điện di sản phẩm PCR trên gel Agarose 1%, 90V trong 30 phút. Bảo quản mẫu ở 4°C.

#### Kỹ thuật giải trình tự gen

Tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự trên máy ABI 3500 Genetic Analyzer sử dụng bộ kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Phân tích kết quả bằng phần mềm CLC main workbench và so sánh với dữ liệu từ genbank NG\_009015.

### 3. Đạo đức nghiên cứu

- Các xét nghiệm phân tích gen chỉ thực hiện khi có sự đồng ý của các gia đình và sẽ được thông báo kết quả xác định vị trí đột biến gen.

- Các gia đình có trách nhiệm cung cấp đầy đủ các thông tin liên quan đến tình hình bệnh tật của con mình.

- Các thông tin về gia đình bệnh nhân, kết quả chẩn đoán được hoàn toàn giữ bí mật. Nghiên cứu được tiến hành hoàn toàn vì mục đích khoa học, không vì bất kỳ mục đích nào khác.

## III. KẾT QUẢ

**Bảng 1. Đặc điểm về địa dư của các đối tượng nghiên cứu**

| STT | Tỉnh      | Tổng |       |
|-----|-----------|------|-------|
|     |           | n    | %     |
| 1   | Điện Biên | 4    | 25    |
| 2   | Sơn La    | 3    | 18,75 |

| STT | Tỉnh      | Tổng |       |
|-----|-----------|------|-------|
|     |           | n    | %     |
| 3   | Thanh Hóa | 3    | 18,75 |
| 4   | Yên Bái   | 2    | 12,50 |
| 5   | Nghệ An   | 2    | 12,50 |
| 6   | Lai Châu  | 1    | 6,25  |
| 7   | Hà Nội    | 1    | 6,25  |
|     | Tổng      | 16   | 100.  |

Các đối tượng trong nghiên cứu đến từ 6 tỉnh, chủ yếu sinh sống tại các tỉnh miền núi phía Bắc và Bắc Trung Bộ.

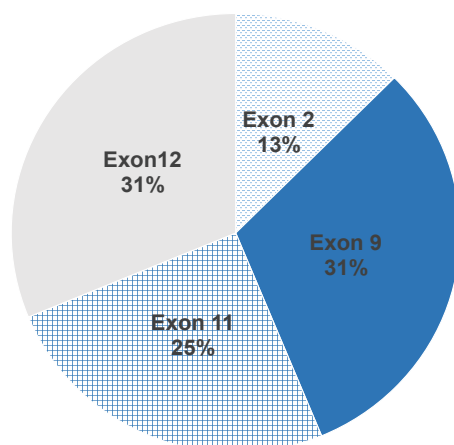
**Bảng 2. Đặc điểm của các đột biến gặp trong nghiên cứu**

| TT                          | Tên đột biến | Vị trí đột biến | Biến đổi acid amin | Exon | Số lượng | Tỷ lệ (%) | Hoạt độ enzyme |
|-----------------------------|--------------|-----------------|--------------------|------|----------|-----------|----------------|
| Thuộc phân lớp II: 93,7(%)  |              |                 |                    |      |          |           |                |
| 1                           | Gaohe        | 95A>G           | H32A               | 2    | 2        | 12,5      | 10,1 - 33,2    |
| 2                           | Viangchan    | 871G>A          | V291M              | 9    | 4        | 25        | 25,3 - 47,8    |
| 3                           | Union        | 1360C>T         | R454C              | 11   | 4        | 25        | 0,22 - 43,9    |
| 4                           | Canton       | 1376G>T         | R459L              | 12   | 2        | 12,5      | 15 - 78,8      |
| 5                           | Kaiping      | 1388G>A         | R463H              | 12   | 3        | 18,8      | 5,5 - 36,6     |
| Thuộc phân lớp III: 6,2 (%) |              |                 |                    |      |          |           |                |
| 6                           | Chinese-5    | 1024C>T         | L342F              | 9    | 1        | 6,2       | 116,2          |
|                             | Tổng         |                 |                    |      | 16       | 100       |                |
|                             | Silent       | c.1311C>T       | T437T              | 11   | 4        | 25        | 10,1 - 116,2   |

Xác định được 6 đột biến gây bệnh ở 16 đối tượng nghiên cứu, xảy ra trên exon 2,9,11 và 12. Chiếm ưu thế nhất trong nghiên cứu là đột biến Viangchan và Union có cùng tỷ lệ 25%, tiếp theo là Kaiping với tỷ lệ 18,75%, gặp với tỷ lệ thấp hơn là Gaohe 12,5% và Canton 12,5%. Có 1 trường hợp mang đột biến Chinese-5.

Biến đổi nucleotide vị trí số c.1311C>T có 4 trường hợp.

Các đột biến chủ yếu tập trung tại exon 2, 9, 11, 12. Tỷ lệ đột biến xác định được trên các exon 9 và exon 12 cùng chiếm tỷ lệ 31%, exon 11 chiếm 25%, exon 2 chiếm 12%.



**Biểu đồ 1. Tỷ lệ đột biến xác định được trên các exon của gen G6PD**

#### IV. BÀN LUẬN

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) là enzyme then chốt mở đầu cho chu trình pentose phosphate trong chuyển hóa glucose. Chu trình này cung cấp NADPH là một chất khử mạnh, có liên quan mật thiết với nhiều quá trình chuyển hóa và chuỗi phản ứng tiếp theo để bảo vệ các cấu tử hồng cầu chống lại sự oxy hóa, đảm bảo tính toàn vẹn của hồng cầu. Hồng cầu của người bị thiếu G6PD sẽ bị tán huyết nhanh chóng dưới tác dụng của các tác nhân oxy-hoá. Nhờ phương pháp định lượng hoạt độ enzyme G6PD, các trẻ trong nghiên cứu đến khám tại Bệnh viện Nhi Trung ương, đã được chẩn đoán thiếu hụt enzyme G6PD. 16 bệnh nhân thuộc dân tộc Thái, là nhóm dân tộc thiểu số ở Việt Nam được đưa vào khảo sát đột biến gây bệnh thiếu enzyme G6PD. Các bệnh nhân đến từ 7 tỉnh, trong đó 4 tỉnh miền núi phía Bắc như Lai Châu, Sơn La, Điện Biên, Yên Bái và 2 tỉnh Bắc Trung Bộ như Thanh Hóa, Nghệ An. Là nơi sinh sống chủ yếu của nhóm người Thái, số lượng người Thái ở các tỉnh này chiếm 97,6% tổng số người Thái ở Việt Nam. Chỉ có một trường hợp bệnh nhân sinh sống tại Hà Nội. Các mẫu máu được thu thập và tiến hành các kỹ thuật sinh học phân tử để xác định đột biến gây bệnh.

Qua nghiên cứu, tất cả các trường hợp đều xác định được vị trí trên gen chứa một nucleotide bị thay đổi. 6 đột biến được tìm thấy đều là các đột biến đã ghi trên thế giới và được báo cáo hay gặp trong quần thể người Việt Nam. 93,7% trường hợp thiếu G6PD trong nhóm đối tượng nghiên cứu mang đột biến thuộc phân lớp II với hoạt độ enzyme < 10% so với người bình thường. Chỉ có 1 trường hợp có đột biến thuộc lớp III, được miêu tả là biểu hiện lâm sàng nhẹ tới trung bình, có cơn tan máu cấp khi tiếp xúc với các yếu tố oxy hóa. Các đột biến tìm thấy xảy ra trên các exon 2, 9, 11 và 12 của gen, xảy ra nhiều hơn ở trên exon 9 và exon 12 với cùng tỷ lệ 31%, 25% trên exon 11, 12% trên exon 2. Đây được xem là những vùng exon trọng điểm chứa các đột biến hay gặp tại Việt Nam.<sup>5</sup> Đột biến gặp với tỷ lệ cao nhất trong nhóm đối tượng bệnh nhân người Thái là Viangchan (c.871G>A) và Union (c.1360C>T) với cùng tỷ lệ 25%, tiếp theo là Kaiping (c.1388G>A) với tỷ lệ 18,75%, các đột biến gặp với tỷ lệ thấp hơn lần lượt là Gaohe (c.95A>G) và Canton (c.1376G>T) 12,5%. Có 1 trường hợp mang đột biến Chinese-5 (c.1024C>T). Theo Nguyễn Minh Hùng và cộng sự tiến hành phân tích gen

của 17 bệnh nhân thiếu G6PD người dân tộc Thái cũng nhận thấy Viangchan và Union là hai đột biến chiếm ưu thế nhất.<sup>4</sup>

Đột biến Viangchan được mô tả lần đầu tiên trên một bệnh nhân người Lào có sự thay thế nucleotid số 871 trên gen G6PD từ G thành A. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 291 từ Valin thành Methionin dẫn đến kiểu hình thiếu hụt G6PD nghiêm trọng và được xếp vào phân lớp II theo phân loại của WHO. Đây cũng là đột biến chiếm ưu thế trong quần thể ở một số nước như Lào, Thái Lan, Campuchia.<sup>6</sup> Với tính tương đồng trong dịch tễ đột biến, sự xuất hiện biến thể G6PD Viangchan trong cộng đồng người Thái, Lào Campuchia, Việt Nam cùng với đặc điểm nguồn gốc di dân của người Thái gợi ý cho thấy khả năng về sự có liên quan gần trong nguồn gốc về tổ tiên chung.

Đột biến Union được báo cáo đầu tiên trên một bệnh nhân nam người Philipin, có sự thay thế một nucleotide C ở vị trí 1360 thành T, dẫn đến thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 454 Arginin thành Cystein. Đột biến thuộc phân lớp II này phân bố đa dạng về địa lý, được tìm thấy ở nhiều đất nước thuộc các châu lục khác nhau như Nhật Bản, Thái Lan và các nước Hy Lạp, Tây Ban Nha, Ý.<sup>7</sup> Tại Việt Nam, Union gặp trên nhóm dân tộc Kinh với tần suất thấp nhưng đặc biệt cao ở nhóm dân tộc Mường và Thái.<sup>4</sup> Với G6PD Union, đột biến về cấu trúc gây ra sự thay đổi tính đặc hiệu của cơ chất của enzym, với hoạt độ enzym chỉ khoảng 10% so với người bình thường. Bệnh nhân có hoạt độ enzyme thấp nhất trong nghiên cứu (0,22 U/10<sup>12</sup> HC) mang đột biến Union.

Đột biến gặp với tỷ lệ thấp hơn là Kaipping (c.1388G>A) với 18,8%. Theo phân loại của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), biến đổi này được xếp vào phân lớp II với hoạt độ chỉ bằng 1 - 10% so với người bình thường.<sup>8</sup> Hoạt độ

enzyme của những bệnh nhân mang đột biến này trong nghiên cứu dao động trong khoảng 5,5 - 36,6 U/10<sup>12</sup> HC. Trong nghiên cứu trước tiên hành trên nhóm dân tộc Kinh, chúng tôi cũng ghi nhận biến đổi c.1388G>A với tần suất là 14%.<sup>9</sup> Đây là một đột biến phổ biến trong quần thể người thiếu G6PD ở Trung Quốc, ngoài ra còn được ghi nhận ở các nước như Thái Lan, Indonesia.<sup>10</sup>

Các đột biến gặp với tỷ lệ thấp hơn là Gaohe (c.95A>G), Canton (c.1376G>T) và Chinese-5. Đây đều là các biến thể được phát hiện đầu tiên tại Trung Quốc. Sự hiện diện của các biến thể phổ biến của Trung Quốc tại Việt Nam nói chung và các dân tộc thiểu số như dân tộc Thái được cho là do sự tiếp giáp về ranh giới địa lý và nguồn gốc cũng như mối quan hệ giao lưu lâu dài giữa dân cư hai nước.

Biến đổi nucleotide vị trí số c.1311C>T có 4 trường hợp. Do bộ ba TAC → TAT cùng mã hoá cho acid amin Tyrosine, biến đổi này được coi là không ảnh hưởng đến sự mã hóa acid amin trong cấu trúc G6PD.

## V. KẾT LUẬN

Đột biến gây thiếu enzyme G6PD gặp với tỷ lệ cao nhất trong nhóm người Thái là Viangchan (c.871G>A) và Union (c.1360C>T). Các đột biến gặp với tỷ lệ thấp hơn là Kaipping (c.1388G>A), Gaohe (c.95A>G), Canton (c.1376G>T) và Chinese-5 (c.1024C>T). Biến đổi nucleotide vị trí số c.1311C>T có 4 trường hợp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2016;30(2):373-393.
2. Belfield KD, Tichy EM. Review and drug therapy implications of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency. *Am J Health Syst Pharm.* 2018;75(3):97-104.

3. Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Vanoye-Carlo A, et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and analysis of new mutations around the world. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
4. Nguyễn Minh Hùng, Tạ Thị Tĩnh, Hiroyuki Matsuoka. Đột biến gen Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) ở ba nhóm dân tộc Mường, Tày, Thái ở Việt Nam. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*. 2009;62(3):10-14.
5. Hue NT, Charlieu JP, Chau TTH, et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) mutations and haemoglobinuria syndrome in the Vietnamese population. *Malar J*. 2009;8(1):152.
6. Matsuoka H, Nguon C, Kanbe T, et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) mutations in Cambodia: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common variant in the Cambodian population. *J Hum Genet*. 2005;50(9):468-472.
7. Yoshida A, Baur EW, Moutlsky AG. A Philippino Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase variant (G6PD Union) with enzyme deficiency and altered substrate specificity. *Blood*. 1970;35(4):506-513.
8. Jiang W, Yu G, Liu P, et al. Structure and function of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-deficient variants in Chinese population. *Hum Genet*. 2006;119(5):463-478.
9. Trần Thị Mai Anh, Nguyễn Thị Phương, Trần Văn Khánh. Xác định đột biến một số vùng trọng điểm của gen G6PD ở bệnh nhân thiếu hụt enzyme G6PD. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 2020;493(2):128-131.
10. Iwai K, Hirono A, Matsuoka H, et al. Distribution of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase mutations in Southeast Asia. *Hum Genet*. 2001;108(6):445-449.

## Summary

### IDENTIFICATION OF G6PD MUTATION IN THAI ETHNIC PATIENTS WITH GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DEFICIENCY

Identification of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutation in Thai ethnic patients with G6PD deficiency. 16 Thai ethnic patients were diagnosed with G6PD deficiency at the National Pediatrics Hospital. The patients were analyzed to find mutation in G6PD gene. Direct sequencing were used to identify mutation in G6PD gene. Results: 6 missense mutations were found, in which the mutation with highest rate was Viangchan (c.871G>A) with 25%, following were Union (c.1360C>T) with 18.8%. We found c.1388G>A (Kaiping), c.95A>G (Gaohe) and c.1376G>T (Canton) mutation with 12.5%. Silent mutation at 1311C>T were found with 4 cases.

**Keywords:** G6PD mutation, G6PD deficiency, Thai ethnic.