

Tính chất đột biến gene *APOB* và *LDLR* trên bệnh tăng cholesterol máu ở người Việt Nam

The characteristics of *APOB* and *LDLR* gene mutations in Vietnamese patients with hypercholesterolemia

Trương Kim Phượng^{1*}, Đỗ Nguyễn Mai Thy¹, Nguyễn Bảo Toàn², Lê Huyền Ái Thúy¹

¹Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Công ty TNHH Y Tế Hoà Hảo, Phòng khám đa khoa Medic, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: phuong.tk@ou.edu.vn

THÔNG TIN	TÓM TẮT
DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.17.1.2053.2022	Bệnh lý rối loạn tăng cholesterol máu ở dạng có tính chất gia đình (FH) với nguyên nhân là sự xuất hiện đột biến tác động đến chức năng của gene <i>APOB</i> và <i>LDLR</i> . Nghiên cứu phân tích đặc điểm phân tử tập trung ở vùng trình tự exon 26 gene <i>APOB</i> và exon 4 gene <i>LDLR</i> trên người bệnh tăng cholesterol máu ở Việt Nam, bằng phương pháp PCR kết hợp với giải trình tự. Trên bộ mẫu bệnh phẩm máu (37 mẫu), nghiên cứu ghi nhận tỷ lệ đột biến trên gene <i>APOB</i> là 32.42%, gene <i>LDLR</i> là 35.10%, đột biến xuất hiện đồng thời trên gene <i>APOB</i> và <i>LDLR</i> có tỷ lệ 10.81% trong 37 mẫu tăng cholesterol máu. Một số dạng biến thể mới, đặc trưng xuất hiện trên DNA bộ gen người bệnh tăng cholesterol máu ở Việt Nam, cụ thể là c.10550C>G (p.A3517G), c.10575C>A (p.S3525R) và c.10560C> (p.Y3520*) ở gene <i>APOB</i> ; c.21038C>T (p.P171L), c.21001A>T (p.T159S) và insC376 (c.ins20903C) ở gene <i>LDLR</i> . Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học thực tiễn, hỗ trợ phát triển công cụ sàng lọc, chẩn đoán sớm bệnh lý tăng cholesterol máu - bệnh FH ở Việt Nam.
Ngày nhận: 18/09/2021	
Ngày nhận lại: 09/10/2021	
Duyệt đăng: 10/10/2021	
Từ khóa: <i>APOB</i> ; FH; giải trình tự; <i>LDLR</i> ; PCR; tăng cholesterol máu	

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is known as Familial Hypercholesterolemia (FH) that is caused by the presence of mutations in *APOB* and *LDLR* genes. Study was conducted to analysis the genetic characteristics of exon 26 *APOB* gene and exon 4 *LDLR* gene in Vietnamese patients with hypercholesterolemia, by performing the combination of PCR and Sanger sequencing. On total of 37 blood samples, the study found out the mutation frequencies of *APOB* and *LDLR* genes were 32.42% and 35.10%, respectively. Rate of mutations which occurred on both of those target genes in one same sample was 10.81%. Some novel variants were characterized, namely c.10550C>G (p.A3517G), c.10575C>A (p.S3525R), and c.10560C> (p.Y3520*) in *APOB* gene; c.21038C>T (p.P171L), c.21001A>T (p.T159S), and insC376 (c.ins20903C) in *LDLR* gene. Results of this study are critical data onto supporting the development of effective tools for diagnosis and early treatment of hypercholesterolemia as FH in Vietnam.

Keywords:

APOB; Familial Hypercholesterolemia (FH); sequencing; *LDLR*; PCR; hypercholesterolemia

1. Giới thiệu

Tăng cholesterol (trong) máu (Hyperlipidemia) là dạng bệnh lý rối loạn chuyển hóa cholesterol theo hướng tăng bất thường, còn được gọi là rối loạn mỡ máu hoặc lipid máu (Cục Y tế dự phòng Việt Nam, 2016; Hill & Bordini, 2021; Ibrahim, Asuka, & Jialal, 2021; Ma & Shieh, 2006). Theo World Health Organization (WHO) (n.d.) hằng năm trên thế giới, bệnh tăng cholesterol máu là bệnh lý dẫn đến khoảng 2.6 triệu ca tử vong, chiếm khoảng 4.5% tổng số ca tử vong do mắc bệnh trên toàn thế giới và khoảng 29.7 triệu DAILYS (2% DALYS - chỉ số về số năm sống hiệu chỉnh theo mức độ bệnh tật). Bệnh lý tăng cholesterol máu ở hai dạng: (1) dạng bệnh lý nguyên phát là tăng cholesterol có tính chất gia đình (Hypercholesterolemia Familial); (2) dạng bệnh lý thứ phát là tăng cholesterol có yếu tố “thu nhận” bởi sự tác động của các yếu tố về dinh dưỡng, thừa cân, ... (Hill & Bordini, 2021). Một số yếu tố nguy cơ dẫn đến rối loạn chuyển hóa lipid, cholesterol trong máu gồm có tiểu đường, cao huyết áp, sử dụng bia rượu, thói quen sinh hoạt hàng ngày ít vận động, thói quen ít hoặc không tập thể dục, chế độ ăn uống không cân bằng dinh dưỡng, thừa cân, sử dụng một số thuốc về nội tiết tố (estrogene), ... (Abdul-Razak & ctg., 2017; NCBI, n.d.; Verma, 2016). Đáng chú ý, nguyên nhân chính dẫn đến tăng cholesterol máu là sự các biến thể (đột biến) trên một số gene thường trực như là *APOB*, *LDLR* có vai trò mã hóa các protein hiện diện trên bề mặt tế bào và tham gia trong quá trình chuyển hóa cholesterol ở gan và hệ máu (P. K. Truong, Lao, & Le, 2018). Dạng bệnh này được gọi là tăng cholesterol máu có tính gia đình (Familial hypercholesterolemia, FH: OMIM #143890), được phát hiện đầu tiên vào cuối thập niên 1930 (Moyer & Baudhuin, 2015; Najam & Ray, 2015). Dựa vào cơ sở khoa học nêu trên, mục tiêu của nghiên cứu khảo sát đặc điểm phân tử tập trung ở vùng trình tự gene *APOB* và gene *LDLR* trên một số mẫu bệnh phẩm (mẫu máu) của người bệnh tăng cholesterol máu ở Việt Nam, bằng phương pháp PCR kết hợp với giải trình tự.

2. Cơ sở lý thuyết

Theo Tổ chức Y tế Thế giới và hệ thống tiêu chí, khuyến cáo của một số tổ chức trên thế giới về bệnh tăng cholesterol và các bệnh liên quan như là EAS và DLCNS (Dutch Lipid Clinic Network Score), Simon Broome hoặc MEDPED (Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths), NLA (National Lipid Association), bệnh tăng cholesterol máu và dạng FH được xác định dựa vào các chỉ số cholesterol trong máu (Ma & Shieh, 2006; Moyer & Baudhuin, 2015; Mytilinaiou, Kyrou, Khan, Grammatopoulos, & Randeva, 2018; Najam & Ray, 2015; Nordestgaard & ctg., 2013). Chỉ số cholesterol máu ở ngưỡng bình thường với nồng độ cholesterol toàn phần thấp hơn 200 mg/dl (< 5.2 mmol/l), nồng độ LDL-cholesterol (LDL-C) thấp hơn 100 mg/dl (< 2.6 mmol/l). Chỉ số cholesterol máu vượt khỏi ngưỡng biểu thị tình trạng tăng cholesterol máu và nguy cơ mắc các bệnh lý tim mạch, khi đó nồng độ cholesterol toàn phần tăng cao hơn 200 mg/dl (> 5.2 mmol/l), nồng độ LDL-C tăng cao hơn 160 mg/dl (> 4.1 mmol/l) (Ma & Shieh, 2006; Moyer & Baudhuin, 2015; Mytilinaiou & ctg., 2018; Najam & Ray, 2015; Nordestgaard & ctg., 2013). Trong một số trường hợp mắc bệnh tim mạch, chỉ số LDL-C cao hơn 160 mg/dl (> 4.1 mmol/l) hoặc 130 mg/dl (> 3.4 mmol/l) biểu thị tăng cholesterol máu là yếu tố chính hoặc kết hợp thêm các yếu tố khác (tiểu đường, tăng cân, ...) là nguyên nhân dẫn đến các bệnh lý tim mạch (Abdul-Razak & ctg., 2017).

Gene *Apolipoprotein B* (*APOB*) định vị ở vị trí 2p24.1 trên nhiễm sắc thể số 2 (Genbank), gồm 29 exon (Genbank, NCBI). Gene *APOB* mã hóa protein *APOB* (*APOB*-100 và *APOB*-48), cấu tạo bởi 4536 amino acid (43 kD), có vai trò chuyển hóa cholesterol trong máu. Protein *APOB* là phối tử hình thành phức hợp giữa LDL thụ thể (*LDLR*) tương tác đặc hiệu với LDL-C, phức hợp này được xâm nhập nội bào bằng các thể endosome, lysosome (P. K. Truong, Lao, & ctg., 2018). Gene *Low Density Lipoprotein Receptor* (*LDLR*) ở vị trí 19p13.1- p13.3, trên nhiễm sắc thể số 19, gồm 18 exon (Genbank, NCBI). Gene *LDLR* mã hóa cho protein thụ thể LDL, cấu tạo

bởi 860 amino acid (160 kD), tham gia vào quá trình chuyển hóa cholesterol, acid béo trong máu và tế bào khác (P. K. Truong, Lao, & ctg., 2018). Trong con đường chuyển hóa cholesterol, miền ngoại bào của protein LDLR tương tác với APOB và tạo phức hợp LDLR-LDL/LDL-C trên bề mặt tế bào máu, sau đó tế bào máu theo hệ thống ngoại vi chuyển LDL-C vào lysosome ở gan. Sau đó, LDL-C được chuyển hóa trong lysosome, LDLR-LDL/LDL-C bị thoái biến và LDLR được tái tạo để tiếp tục thực hiện chức năng trong cơ chế chuyển hóa cholesterol (P. K. Truong, Lao, & ctg., 2018).

Bệnh tăng cholesterol ở dạng có tính chất gia đình (FH) khởi phát trong tình trạng tăng bất thường lượng LDC-C trong huyết tương, nguyên nhân chính là do sự xuất hiện biến thể (đột biến) xảy ra trên các gene chức năng trong cơ chế chuyển hóa cholesterol: *APOB* và *LDLR* (Henderson, O’Kane, McGilligan, & Watterson, 2016; Ma & Shieh, 2006; Meshkov & ctg., 2021; Turgeon, Barry, & Pearson, 2016; P. K. Truong, Lao, & ctg., 2018; Youngblom, Pariani, & Knowles, 2016). Trên bệnh nhân mắc tăng cholesterol máu (FH), có khoảng 85% - 95% trường hợp là do đột biến trải dài trên gene *LDLR*, chủ yếu tập trung nhiều ở exon 4 (P. K. Truong, Lao, & ctg., 2018); đồng thời khoảng 1% - 5% trường hợp là do đột biến trên gene *APOB* và tập trung ở exon 26 (P. K. Truong, Lao, & ctg., 2018). Cho đến nay, có ít dữ liệu nghiên cứu về đặc điểm phân tử trên các gene *APOB* và *LDLR* trên người bệnh tăng cholesterol máu cũng như bệnh FH ở Việt Nam, tiêu biểu là nghiên cứu công bố của nhóm tác giả thứ nhất: H. T. Truong và cộng sự (2020), nhóm tác giả thứ hai: P. K. Truong, Bui, Lao, và Le (2017) và P. K. Truong, Nguyen, Lao, và Le (2018). Nghiên cứu của P. K. Truong, Nguyen, và cộng sự (2018) phân tích tổng hợp và ghi nhận tỷ lệ đột biến trên gene *APOB* là đột biến là 31.7745 (95% CI = 8.288 - 61.912), dựa trên dữ liệu của 22 công bố khoa học phân tích đột biến trên các nhóm bệnh nhân tăng cholesterol có tính chất gia đình. Để đạt mục tiêu nghiên cứu, nghiên cứu được thực hiện với phương pháp PCR kết hợp giải trình tự trên exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR* trên bộ gene người thuộc các mẫu máu tăng cholesterol, đồng thời tra cứu trên cơ sở dữ liệu LOVD, Clinvar và các công trình trên thế giới về bệnh tăng cholesterol máu (FH), từ đó so sánh và ghi nhận những biến thể khác biệt, nổi trội đặc trưng có thể xuất hiện trên gene mục tiêu của những bệnh nhân tăng cholesterol máu ở Việt Nam.

3. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

3.1. Bộ mẫu bệnh phẩm

Nghiên cứu phân tích trên 37 mẫu bệnh phẩm máu được thu thập ở một số bệnh viện thuộc khu vực Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam. Bộ mẫu máu có thông tin chỉ số sinh hóa về cholesterol trong máu và vấn đề y đức được thực hiện theo quy định tại Trung tâm Y khoa Medic Thành phố Hồ Chí Minh (Bảng 1). Tiêu chí lựa chọn mẫu máu được tham khảo theo tiêu chuẩn của NLA, EAS, Simon Broome, DLCNS, MEDPED (Abdul-Razak & ctg., 2017; Hill & Bordonni, 2021; Ibrahim & ctg., 2021; Ma & Shieh, 2006).

Bảng 1

Tiêu chí về nồng độ cholesteorl trong mẫu bệnh phẩm

Cholesterol toàn phần	LDL-C	HDL-C	Triglyceride	Chú thích
> 6.2 mmol/l	> 4.1 mmol/l	< 0.9 mmol/l	02 - 06 mmol/l	Tăng cholesterol
> 5.2 mmol/	> 4.1 mmol/l	< 0.9 mmol/l	Biến động	Tăng cholesterol
2.6 - 5.2 mmol/l	< 3.1 mmol/l	>= 0.9 mmol/l	0.5 - 2.3 mmol/l	Bình thường

Nguồn: Abdul-Razak và cộng sự (2017), Ma và Shieh (2006), Hill và Bordonni (2021), Ibrahim và cộng sự (2021)

3.2. Phân tích trên máy tính (*In silico analysis*)

Tham khảo nguồn dữ liệu gene *APOB* và *LDLR* trên Genebank (NCBI) kết hợp với công cụ Annyb, BLAST (NCBI), Oligo analyzer, các trình tự oligonucleotide đặc hiệu với trình tự exon 26 gene *APOB*, exon 4 gene *LDLR* được thiết kế với trình tự tham khảo NG_011793.1 (exon 26 gene *APOB*: vị trí 36.423 - 43.994), NG_009060.1 (exon 4 gene *LDLR*: vị trí 20.840 - 21.220).

3.3. Khảo sát tính chất đột biến điểm gene *APOB* và *LDLR*

Nghiên cứu thu nhận bộ gene người từ các mẫu máu tăng cholesterol theo quy trình tách chiết bằng bộ kit tách chiết TopPURE® Blood DNA Extraction Kit (Bioline, ABT). Nồng độ DNA và độ sạch của DNA bộ gene sau tách chiết được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang 260 và 280 nm. Trình tự gene mục tiêu được khuếch đại bằng chương trình luân nhiệt như sau: 95°C - 5 phút; 35 chu kỳ gồm 95°C - 30 giây, 54°C - 30 giây với cặp mồi *APOB*-F1& *APOB*-R1, 56°C - 30 giây đối với cặp mồi *LDLR*-F1&*LDLR*-R1, 72°C - 30 giây; 72°C - 10 phút. Các sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1.5% với thang phân tử 100 bp (Bioline). Việc tinh sạch và giải trình tự hai chiều được tiến hành với các sản phẩm PCR có băng sáng rõ, đúng chiều dài sản phẩm lần lượt là 314 bp đối với gene *APOB* và 527 bp đối với gene *LDLR*. Nghiên cứu sử dụng các phần mềm Chromas Lite phiên bản 2.1.1, Mutation Surveyor phiên bản 5.1.1, CodonCode Aligner phiên bản 9.0.1 và kết hợp so sánh với dữ liệu của gene *APOB* và *LDLR* trên bệnh tăng cholesterol máu (FH) trong hệ thống LOVD (n.d.) và Clinvar (n.d.) để tìm thấy các dạng đột biến trên exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR* thuộc bộ gene người bệnh tăng cholesterol ở Việt Nam. Tỷ lệ đột biến được xác định theo thuật toán Chi bình phương, $p < 0.05$.

4. Kết quả nghiên cứu

4.1. Kết quả khảo sát trên máy tính

Các trình tự oligo DNA phù hợp được thiết kế và sử dụng trong phản ứng PCR khuếch đại vùng trình tự gene mục tiêu thuộc exon 26 gene *APOB*, exon 4 gene *LDLR* (Bảng 2). Cặp mồi *APOB*-F1&*APOB*-R1 khuếch đại vùng trình tự 334 bp, thuộc vị trí 42,638 - 42,971 trên trình tự NG_011793.1; cặp mồi *LDLR*-F1&*LDLR*-R1 khuếch đại vùng trình tự 527 bp, thuộc vị trí 20,753 - 21,279 trên trình tự NG_009060.1.

Bảng 2

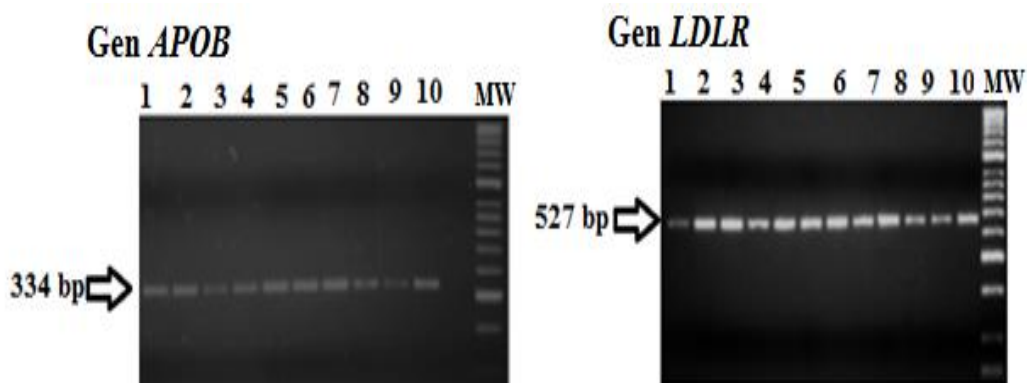
Thông tin cặp mồi khuếch đại gene mục tiêu

Mồi	Trình tự mồi (5' -3')	Chiều dài sản phẩm PCR (bp)	Chiều dài mồi (bp)
<i>APOB</i> -F1	GACCACAAGCTTAGCTTGG	334	19
<i>APOB</i> -R1	GGGTGGCTTTGCTTGTATG		19
<i>LDLR</i> -F1	ACTGCGGCAGCGTCCCCGGC	527	20
<i>LDLR</i> -R1	TGGGGGAGCCCAGGGACAGG		20

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

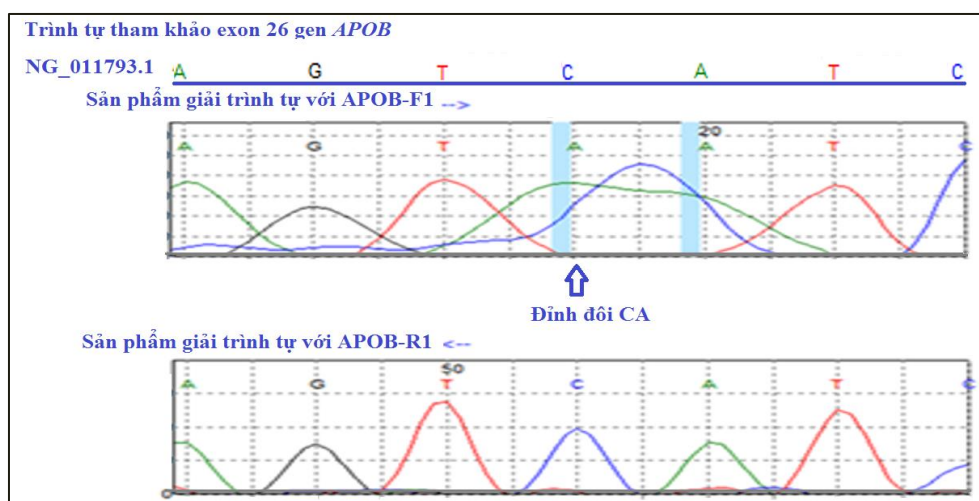
4.2. Khảo sát tính chất đột biến điểm gene *APOB* và *LDLR*

Đặc điểm phân tử exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR* được khảo sát trong 37 mẫu tăng cholesterol máu ở người Việt Nam. Sản phẩm phản ứng PCR được khuếch đại bởi cặp mồi *APOB*-F1&*APOB*-R1 và cặp mồi *LDLR*-F1&*LDLR*-R1 lần lượt có chiều dài dự kiến là 334 bp và 527 bp. Các sản phẩm khuếch đại gene mục tiêu được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1.5% và sử dụng thang phân tử 100 bp (Hình 1). Các sản phẩm có băng sáng rõ được giải trình tự và phân tích đặc điểm phân tử trên vùng trình tự exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR* (Hình 2, Hình 3). Hình 2 biểu thị một dạng biến thể ở vùng trình tự exon 26 gene *APOB* trên mẫu 10, là đột biến c.10481C>A ở thể dị hợp, với đỉnh đôi CA (C > A) và là đột biến sai nghĩa p.S3494Y. Hình 3 biểu thị một dạng biến thể ở vùng trình tự exon 4 gene *LDLR* trên mẫu 37, là dạng đột biến c.21193A>T ở thể dị hợp, với đỉnh đôi AT (A > T) và là dạng đột biến sai nghĩa p.K223X. Hai dạng biến thể này là dạng mới, chưa công bố (novel mutation), khi tham khảo hệ thống dữ liệu về SNP, biến thể liên quan đến bệnh tăng cholesterol máu (FH) của LOVD, Clinvar. Tổng hợp đặc điểm phân tử trên exon 26 gene *APOB* và gen *LDLR* của người bệnh tăng cholesterol máu ở Việt Nam, nghiên cứu ghi nhận nhiều dạng biến thể xuất hiện trên exon 26 gene *APOB* là c.10550C>G (p.A3517G), c.10556C>A (p.T3519N), c.10575C>A (p.S3525R), c.10583C>G (p.S3528C), c.10610delA, c.10722C>A (p.L3532M), ...; trên exon 4 gene *LDLR* là insC376 (c.ins20903C), c.20842C>A (p.P106T), c.20995A>C (p.S157R), c.21001A>T (p.T159S), c.21046G>T (p.E174X), c.21193A>T (p.K223X), ...

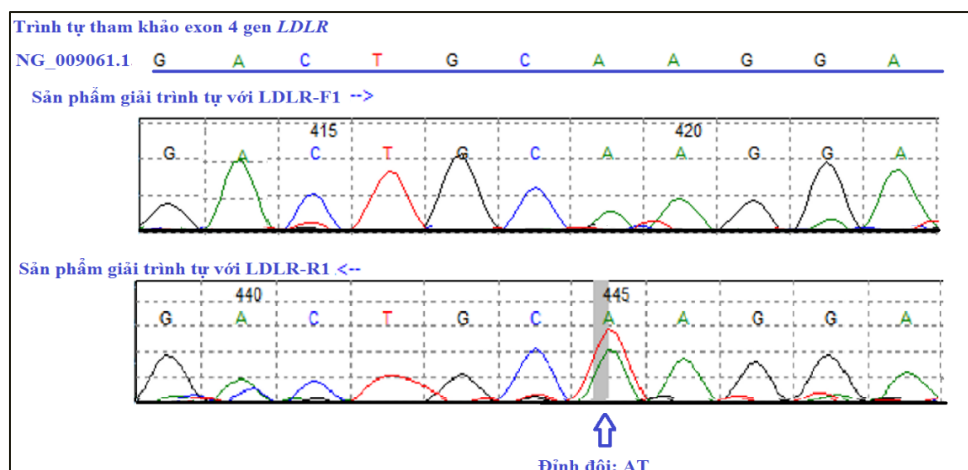


Chú thích: 1 đến 10 là sản phẩm PCR lần lượt khuếch đại với cặp mồi *APOB*-F1 và *APBO*-R1, cặp mồi *LDLR*-F1 và *LDLDR*-R1 của 10 mẫu sản phẩm đại diện; MW (Molecular weight): Thang phân tử (100 bp).

Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR*



Hình 2. Biến thể c.10481C>A trên exon 26 gene *APOB*



Hình 3. Biến thể c.21193A>T (p.K223X) trên exon 4 gene *LDLR*

Trong 37 mẫu máu có chỉ số tăng cholesterol máu ở Việt Nam, tính chất đột biến đơn gene (monogenic) xuất hiện với tỷ lệ lần lượt trên exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR* là 32.42% (12/37 mẫu, $p = 0.03$) và 35.10% (13/37 mẫu; $p = 0.07$) đều ở thể dị hợp, dữ liệu đột biến trình bày ở Bảng 3; tính chất đột biến đa gene (polygenic) xuất hiện đồng thời trên exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR* có tỷ lệ 10.81% (4/37 mẫu). Tỷ lệ đột biến ở gene *APOB* ở trong nhóm bệnh nhân nam là 41.18% và nhóm bệnh nhân nữ là 40%; tỷ lệ đột biến *LDLR* ở hai nhóm bệnh nhân nêu trên lần lượt là 35.30% và 35.00%. Kết quả nghiên cứu ghi nhận dấu hiệu đột biến trên gene *APOB* và có biểu hiện kiểu hình tăng cholesterol có khuynh hướng xuất hiện ở độ tuổi thấp hơn 50 tuổi, với tỷ lệ là 40.00% cao hơn so với độ tuổi ≥ 50 là 23.53%. Ngược lại, tỷ lệ đột biến trên gene *LDLR* ở độ tuổi < 50 tương đương với độ tuổi ≥ 50 là 35.30% và 35.00%. Tỷ lệ đột biến tổng thể gene *APOB* trên người bệnh tăng cholesterol máu ở Việt Nam (32.42%) có sự khác biệt so với người bệnh FH ở Phần Lan trong nghiên cứu của Sharifi (2016) là 43.48%, ở Hàn quốc trong nghiên cứu của Han (2015) là 66.67%, nhưng có sự xấp xỉ với tỷ lệ đột biến trên người trưởng thành mắc FH ở Anh trong nghiên cứu của Heath (2001) là 31.718%. Tỷ lệ đột biến trên gene *LDLR* thuộc người bệnh tăng cholesterol ở Việt Nam là 35.10%, có sự khác biệt với tỷ lệ đột biến trên gene *LDLR* trên người bệnh FH ở Nhật trong nghiên cứu của Ohta, Kuwayama, Hirose, Shimizu, và Ohishi (2016) là 62.05%, ở Hàn quốc trong nghiên cứu của Han và cộng sự (2015) là 27.54%, mặt khác có sự xấp xỉ với tỷ lệ đột biến trên người bệnh FH ở Hy Lạp trong nghiên cứu của Dedoussis, Schmidt, và Geneschel (2004) là 34.50% và ở Israel trong nghiên cứu của Ronen và cộng sự (2019) là 34.28%.

Bảng 3

Tỷ lệ đột biến trên bộ mẫu tăng cholesterol

Phân hạng	Gene đột biến (n, tỷ lệ)		
	<i>APOB</i>	<i>LDLR</i>	<i>APOB</i> và <i>LDLR</i>
Nam (n = 17)	7 (41.18%)	6 (35.30%)	3 (17.65%)
Nữ (n = 20)	5 (25.00%)	7 (35.00%)	1 (5.00%)
Tuổi < 50 (n = 20)	8 (40.00%)	7 (35.00%)	3 (15.00%)
Tuổi ≥ 50 (n = 17)	4 (23.53%)	6 (35.30%)	1 (5.88%)
Tổng mẫu (n = 37)	12 (32.42%)	13 (35.10%)	4 (10.81%)

Chú thích: Tỷ lệ (%) được xác định trên tổng số mẫu của từng phân hạng; n: số mẫu
 Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Bảng 4

Mức độ xuất hiện đột biến trên bộ mẫu tăng cholesterol

Chỉ số số gene đột biến	Chỉ số MI	Số mẫu (tỷ lệ)
0	0	16 (43.2%)
1	0.5	17 (45.95%)
2	1	4 (10.80%)
Ít nhất 1 gene bất kỳ	≥ 0.5	21 (56.76%) p = 0.0144

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Tổng thể về mức độ đột biến trên exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR* ở người bệnh tăng cholesterol máu ở Việt Nam được biểu thị bằng tỷ lệ chỉ số MI (Mutation index), số liệu ở Bảng 4. Tỷ lệ chỉ số MI = 1 tương ứng với đột biến xảy ra đồng thời ở exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR* với tỷ lệ 10.81% (04/37 mẫu), tỷ lệ chỉ số MI ≥ 0.5 tương ứng với đột biến trên ít nhất một trình tự gene mục tiêu với tỷ lệ 57.76% (24/27 mẫu).

Bảng 5Tính chất đột biến gene *APOB* và *LDLR* trong bộ mẫu tăng cholesterol máu

Mẫu	Gene <i>APOB</i>		Gene <i>LDLR</i>	
	Biến đổi nucleotide	Biến đổi amino acid	Biến đổi nucleotide	Biến đổi amino acid
1	c.10550C>G c.10556C>A c.10575C>A c.10583C>G	p.A3517G p.T3519N p.S3525R p.S3528C	insC376 (c.ins20903C)	
5	c.10610delA c.10722C>A c.10840delT	p.L3532M	Wt	
6	Wt		insC376 (c.ins20903C)	
7	c.10550C>G	p.A3517G	Wt	
8	c.10575C>A	p.S3525R	c.2084C>A	p.P106T
9	c.10435C>T	p.H3479Y	c.20911A>G c.21205C>G	p.D129G** p.D227E**
10	c.10481C>A	p.S3494Y	insC376 (c.ins20903C)	
11	c.10495G>A c.10550C>G c.10556C>A c.10560C>A c.10575C>A	p.D3499N** p.A3517G p.T3519N p.Y3520* p.S3525R	Wt Wt	

Mẫu	Gene APOB		Gene LDLR	
	Biến đổi nucleotide	Biến đổi amino acid	Biến đổi nucleotide	Biến đổi amino acid
	c.10550C>G	p.A3517G		
15	Wt		c.21034G>T	p.D170Y
16	c.10550C>G c.10556C>A c.10560C>A c.10575C>A	p.A3517G p.T3519N p.Y3520* p.S3525R	Wt	
17	Wt		insC376 (c.ins20903C)	
18	Wt		c.20911A>G	p.D129G**
22	Wt		c.21038C>T	p.P171L
24	c.10495G>A c.10550C>G	p.D3499N** p.A3517G	Wt	
25	Wt		insC376 (c.ins20903C) c.21205C>G	p.D227E**
26	c.10724G>C c.10684C>T	p.G3575A p.L3562F	Wt	
29	Wt	Wt	c.20995A>C c.21001A>T c.21046G>T insC376 (c.ins20903C)	p.S157R p.T159S p.E174X
31	c.10610delA c.10652C>A c.10722C>A c.10780C>A c.10812C>T c.10840delT	p.A3351D p.L3532M p.A3551D p.L3562F	Wt	
35	Wt		insC376 (c.ins20903C)	
36	c.10550C>G c.10556C>A c.10560C>A c.10575C>A	p.A3517G p.T3519N p.Y3520* p.S3525R	Wt	
37	Wt		c.21193A>T insC376 (c.ins20903C)	p.K223X

Chú thích: *: đột biến vô nghĩa; **: đột biến đã công bố

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Tham khảo hệ thống LOVD (n.d.), Clinvar (n.d.), Hobbs, Brown, và Goldstein (1992), Leren và cộng sự (2004), Lombardi và cộng sự (2000), Leitersdorf, Van der Westhuyzen, Coetzee, và Hobbs (1989), Callis và cộng sự (1998), Alves và cộng sự (2018), nghiên cứu xác định một số dạng đột biến đã được công bố có liên quan đến bệnh FH hoặc ở dạng mới (novel mutation) đã xuất hiện trên exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR* trên bộ gene người của người bệnh tăng cholesterol ở Việt Nam. Diễn hình trên exon 26 gene *APOB*, một dạng đột biến đã được công bố là c.10495G>A (p.D3499N) xuất hiện ở mẫu 11 và 24 (5.40%, 02/37 mẫu). Hệ thống LOVD ghi nhận c.10495G>A (p.D3499N) là dạng biến thể ở trạng thái là VUS - trạng thái chưa có dữ liệu khẳng định có hay không có liên quan đến bệnh FH, tăng cholesterol máu (Bảng 5). Mặt khác, tất cả biến thể khác trên exon 26 gene *APOB* xuất hiện trong bộ mẫu cholesterol tăng máu ở người Việt Nam là các dạng đột biến sai nghĩa, chưa được công bố trên LOVD (n.d.), Clinvar (n.d.) và các công bố khoa học trên thế giới. Các đột biến mới trên exon 26 gene *APOB* xuất hiện trên nhiều mẫu, như là c.10550C>G (p.A3517G) ở mẫu 01, 07, 11, 16, 24, 36 (06/37 mẫu, 16.21%), c.10556C>A (p.T3519N) ở mẫu 01, 11, 16 và 36 (04/37 mẫu, 10.81%), c.10575C>A (p.S3525R) ở mẫu 01, 08, 11, 16 và 36 (05/37 mẫu, 13.51%), c.10560C>A (p.Y3520*) ở mẫu 11, 16 và 36 (03/37 mẫu, 8.10%). Một số đột biến chưa công bố xuất hiện với tỷ lệ 5.40% (02/37 mẫu) gồm có c.10610delA, c.10722C>A (p.L3532M), c.10840delT; xuất hiện với tỷ lệ 2.70% (01/37 mẫu) là c.10435C>T (p.H3479Y), c.10481C>A (p.S3494Y), c.10583C>G (p.S3528C), c.10652C>A (p.A3351D), c.10684C>T (p.L3562F), c.10780C>A (p.A3551D), c.10812C>T (p.L3562F). Đáng chú ý là một dạng biến thể mới c.10560C> (p.Y3520*) xuất hiện trên exon 26 gene *APOB* của bộ gene người bệnh tăng cholesterol máu với tỷ lệ là 8.10%, đây là dạng đột biến vô nghĩa gây ảnh hưởng đến sự biểu hiện protein *APOB*.

Phân tích trên exon 4 gene *LDLR*, nghiên cứu ghi nhận hai dạng đột biến sai nghĩa đã được công bố trên LOVD, Clinvar và là yếu tố có liên quan đến tính chất tăng cholesterol máu (FH), là c.21205C>G (p.D227E) với tỷ lệ 5.40% (02/37 mẫu) trên mẫu số 08 và 09; c.20911A>G (p.D129G) là dạng đột biến đã được công bố ở bệnh nhân FH ở Trung Quốc (Chen & ctg., 2007) với tỷ lệ 2.7% (01/37 mẫu) trên mẫu 09. Hơn nữa, các dạng biến thể khác đều là dạng sai nghĩa, chưa được công bố ở các hệ thống dữ liệu về đặc điểm phân tử gene *LDLR* trên bệnh FH, trong đó insC376 (c.ins20903C) là dạng đột biến thêm nucleotide - ảnh hưởng sự biểu hiện protein *LDLR* với tỷ lệ 21.26%, trên các mẫu 01, 06, 10, 17, 25, 29, 35 và 37. Bên cạnh đó, đột biến chưa công bố xuất hiện trên exon 4 gene *LDLR* với tỷ lệ 5.40% (02/37 mẫu) là c.21038C>T (p.P171L); với tỷ lệ 2.70% (01/37 mẫu) là c.21034G>T (p.D170Y), c.20995A>C (p.S157R), c.21001A>T (p.T159S), c.21046G>T (p.E174X), c.21193A>T (p.K223X).

Dạng biến thể trên exon 26 gene *APOB* là c.10550C>G (p.A3517G), c.10556C>A (p.T3519N), c.10575C>A (p.S3525R) và c.10560C> (p.Y3520*) có tỷ lệ xuất hiện lần lượt là 16.21%, 10.81%, 13.51% và 8.10%, trên exon 4 gene *LDLR* là insC376 (c.ins20903C) với tỷ lệ xuất hiện là 21.26% có thể là các dạng đột biến nổi trội, đặc trưng trên người bệnh tăng cholesterol máu ở Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu cần phát triển chuyên sâu để củng cố thêm dữ liệu về tính chất đột biến nổi trội xuất hiện trên gene *APOB* và *LDLR* với sự mở rộng vùng trình tự mục tiêu (exon và intron) của các gene ứng viên ở người Việt Nam, trên cơ sở đó thiết lập các công cụ chẩn đoán, hướng điều trị phù hợp cho người mắc bệnh tăng cholesterol trong máu - do mang những đột biến nổi trội trên gene *APOB* và *LDLR*.

5. Kết luận - Kiến nghị

Nghiên cứu ghi nhận tính chất đột biến trên exon 26 gene *APOB* và exon 4 gene *LDLR* trong 37 mẫu bệnh phẩm máu có chỉ số tăng cholesterol máu, lần lượt với tỷ lệ 32.42%, 35.10% lần lượt trên từng gene và 10.81% đồng thời trên gene *APOB* và *LDLR*. Nghiên cứu xác định được

một số dạng đột biến nổi đặc trưng của tính chất đột biến trên gene *APOB* và *LDLR* ở người bệnh tăng cholesterol máu ở Việt Nam, góp phần vào dữ liệu phân tử của các gene ứng viên để phát triển công cụ phân tử phù hợp trong sàng lọc, chẩn đoán, tiên đoán và trị liệu rối loạn mỡ máu, tăng cholesterol trong máu ở dạng FH.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với nguồn kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học công nghệ cấp Bộ năm 2018, mã số B2018 - MBS - 08. Nghiên cứu được sự hỗ trợ của nguồn kinh phí đối ứng của Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh. Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Nhà trường, Công ty TNHH Y Tế Hòa Hảo, Phòng khám đa khoa Medic, giảng viên và sinh viên đã hỗ trợ, tạo điều kiện cho nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- Abdul-Razak, S., Rahmat, R., Kasim, A. M., Rahman, T. A., Muid, S., Nasir, N. M., ... Nawawi, H. (2017). Diagnostic performance of various familial hypercholesterolaemia diagnostic criteria compared to Dutch lipid clinic criteria in an Asian population. *BMC Cardiovascular Disorders*, 17(1), 1-8.
- Alves, A. C., Benito-Vicente, A., Medeiros, A. M., Reeves, K., Martin, C., & Bourbon, M. (2018). Further evidence of novel *APOB* mutations as a cause of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*, 277(2018), 448-456.
- Callis, M., Jansen, S., Thiart, R., de Villiers, J. N. P., Raal, F. J., & Kotze, M. J. (1998). Mutation analysis in familial hypercholesterolemia patients of different ancestries: Identification of three novel *LDLR* gene mutations. *Molecular and Cellular Probes*, 12(3), 149-152.
- Chen, K., Mu, Y. M., Wang, B. A., Guo, Q. H., Lu, Z. H., Dou, J. T., & Lu, J. M. (2007). Two novel mutations 685del 1 and D129G in the low-density lipoprotein receptor gene in a compound heterozygote Chinese family with familial hypercholesterolemia. *Metabolism*, 56(5), 636-640.
- Clinvar. (n.d.). Truy cập ngày 10/05/2021 tại Clinvar web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
- Cục Y tế dự phòng Việt Nam. (2016). *Rối loạn chuyển hóa lipid máu [Disorders of blood lipid metabolism]*. Truy cập ngày 10/05/2021 tại <https://vncdc.gov.vn/roi-loan-chuyen-hoa-lipid-mau-nd14588.html>
- Dedoussis, G. V., Schmidt, H., & Geneschel, J. (2004). LDL- receptor mutations in Europe. *Human Mutation*, 24(6), 443-459.
- Han, S. M., Hwang, B., Park, T. G., Kim, D. I., Rhee, M. Y., Lee, B. K., ... Lee, S. H. (2015). Genetic testing of Korean familial hypercholesterolemia using whole-exome sequencing. *PloS One*, 10(5), Article e0126706.
- Heath, K. E., Humphries, S. E., Middleton-Price, H., & Boxer, M. (2001). A molecular genetic service for diagnosing individuals with Familial Hypercholesterolaemia (FH) in the United Kingdom. *European Journal of Human Genetics*, 9(4), 244-252.
- Henderson, R., O'Kane, M., McGilligan, V., & Watterson, S. (2016). The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 1-12.

- Hill, M. F., & Bordini, B. (2021). *Hyperlipidemia*. Truy cập ngày 11/08/2021 tại NCBI web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559182/>
- Hobbs, H. H., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1992). Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation*, 1(6), 445-466.
- Ibrahim, M. A., Asuka, E., & Jialal, I. (2021). *Hypercholesterolemia*. Truy cập ngày 11/08/2021 tại NCBI web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459188/>
- Leitersdorf, E., Van der Westhuyzen, D. R., Coetzee, G. A., & Hobbs, H. H. (1989). Two common low density lipoprotein receptor gene mutations cause familial hypercholesterolemia in Afrikaners. *The Journal of Clinical Investigation*, 84(3), 954-961.
- Leren, T. P., Manshaus, T., Skovholt, U., Skodje, T., Nossen, I. E., Teie, C., ... Bakken, K. S. (2004, February). Application of molecular genetics for diagnosing familial hypercholesterolemia in Norway: Results from a family-based screening program. In *Seminars in vascular medicine* (pp. 75-85). New York, NY: Thieme Medical Publishers.
- Lombardi, M. P., Redeker, E. J., Defesche, J. C., Kamerling, S. W., Trip, M. D., Mannens, M. M., ... Kastelein, J. J. (2000). Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: Spectrum of LDL receptor gene mutations in The Netherlands. *Clinical Genetics*, 57(2), 116-124.
- LOVD. (n.d.). Truy cập ngày 11/05/2021 tại LOVD web: <https://www.lovd.nl/>
- Ma, H., & Shieh, K. J. (2006). Cholesterol and human health. *The Journal of American Science*, 2(1), 46-50.
- Meshkov, A., Ershova, A., Kiseleva, A., Zotova, E., Sotnikova, E., Petukhova, A., ... Drapkina, O. (2021). The LDLR, APOB, and PCSK9 variants of index patients with familial hypercholesterolemia in Russia. *Genes*, 12(1), Article 66.
- Moyer, A. M., & Baudhuin, L. M. (2015). Genetic considerations in the treatment of familial hypercholesterolemia. *Clinical Lipidology*, 10(5), 387-403.
- Mytilinaiou, M., Kyrou, I., Khan, M., Grammatopoulos, D. K., & Randeva, H. S. (2018). Familial hypercholesterolemia: New horizons for diagnosis and effective management. *Frontiers in Pharmacology*, 9(707), 1-29. doi:10.3389/fphar.2018.00707
- Najam, O., & Ray, K. K. (2015). Familial hypercholesterolemia: A review of the natural history, diagnosis, and management. *Cardiology and Therapy*, 4(1), 25-38.
- NCBI. (n.d.). *High cholesterol: Overview*. Truy cập ngày 11/05/2021 tại <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279318/?report=printable>
- Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Humphries, S. E., Ginsberg, H. N., Masana, L., Descamps, O. S., ... European Atherosclerosis Society Consensus Panel. (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal*, 34(45), 3478-3490.
- Ohta, K., Kuwayama, Y., Hirose, K., Shimizu, K., & Ohishi, Y. (2016). Experimental determination of the electrical resistivity of iron at Earth's core conditions. *Nature*, 534(7605), 95-98.

- Ronen, D., Ibe, U. K., Shoshi, S., Daniel, S., Marta, F., Ros, W., ... Meiner, V. (2017). Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Israel-revisited. *Atherosclerosis*, 263(2017), e279-e280.
- Sharifi, M., Higginson, E., Bos, S., Gallivan, A., Harvey, D., Li, K. W., ... Humphries, S. E. (2017). Greater preclinical atherosclerosis in treated monogenic familial hypercholesterolemia vs. polygenic hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 263(2017), 405-411.
- Sharifi, M., Walus-Miarka, M., Idzior-Waluś, B., Malecki, M. T., Sanak, M., Whittall, R., ... Humphries, S. E. (2016). The genetic spectrum of familial hypercholesterolemia in south-eastern Poland. *Metabolism*, 65(3), 48-53.
- The European Atherosclerosis Society (EAS). (n.d.). Truy cập ngày 11/05/2021 tại EAS web: <https://www.eas-society.org/>
- Truong, H. T., Do, L. D., Kim, T. N., Nguyen, N. T. M., Le, T. T., & Le, A. H. (2020). Genetics, screening, and treatment of familial hypercholesterolemia: Experience gained from the implementation of the Vietnam familial hypercholesterolemia registry. *Frontiers in Genetics*, 11, Article 914.
- Truong, P. K., Bui, C. V., Lao, T. D., & Le, T. H. A. (2017). Detection of defective Apolipoprotein B-100 R3500Q mutation caused familial hypercholesterolemia in Vietnamese patients. In *International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam* (pp. 275-279). Singapore: Springer.
- Truong, P. K., Lao, T. D., & Le, T. H. A. (2018). The major molecular causes of familial hypercholesterolemia. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*, 10(2), 60-68.
- Truong, P. K., Nguyen, P. M. T., Lao, T. D., & Le, T. H. A. (2018). A meta-analysis of apolipoprotein B gene mutation in hypercholesterolemia based on previous studies. In *International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam* (pp. 611-615). Singapore: Springer.
- Turgeon, R. D., Barry, A. R., & Pearson, G. J. (2016). Familial hypercholesterolemia: Review of diagnosis, screening, and treatment. *Canadian Family Physician*, 62(1), 32-37.
- Verma, N. (2016). Introduction to hyperlipidemia and its treatment: A review. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(1), 6-14.
- World Health Organization (WHO). (n.d.). *Raised cholesterol*. Truy cập ngày 10/05/2021 tại <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/3236>
- Youngblom, E., Pariani, M., & Knowles, J. W. (2016). *Familial hypercholesterolemia*. Seattle, Washington D.C.: University of Washington.

