

# Phát hiện đột biến gen *RBI* trên mẫu mô u nguyên bào võng mạc tại miền Bắc Việt Nam năm 2020

Lê Thị Phương, Đào Nguyễn Hà Linh, Nguyễn Minh Ngọc, Trần Huy Thịnh, Trần Vân Khánh\*

Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 18/5/2021; ngày chuyển phản biện 21/5/2021; ngày nhận phản biện 24/6/2021; ngày chấp nhận đăng 28/6/2021

## Tóm tắt:

U nguyên bào võng mạc, một bệnh ung thư mắt ở trẻ em, đa phần là do đột biến bất hoạt cả 2 bản sao của gen *RBI*. Chẩn đoán sớm và xác định đột biến gen *RBI* giúp cải thiện kết quả điều trị và quản lý bệnh nhân tốt hơn. Nghiên cứu được thực hiện trên 10 mẫu khối u của bệnh nhân u nguyên bào võng mạc bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp. 11 đột biến khác nhau đã được tìm thấy ở 9/10 mẫu mô nghiên cứu bao gồm 6 đột biến vô nghĩa, 1 đột biến sai nghĩa, 1 đột biến vị trí cắt nối intron-exon và 3 đột biến lệch khung dịch mã, trong đó có 1 đột biến mới chưa được mô tả trước đó. Cần làm thêm phương pháp MLPA để xác định đột biến xóa đoạn lớn trên gen *RBI* và nghiên cứu mở rộng trên cơ mẫu lớn hơn để đưa ra bức tranh về các đột biến gen *RBI* trên các bệnh nhân u nguyên bào võng mạc tại Việt Nam.

**Từ khóa:** đột biến, gen *RBI*, giải trình tự gen, u nguyên bào võng mạc.

**Chỉ số phân loại:** 3.2

## **Đặt vấn đề**

U nguyên bào võng mạc (UNBVM) hay ung thư võng mạc là một loại khối u nguyên bào thần kinh ác tính, nội nhãn, phổ biến ở trẻ em với tỷ lệ mắc là 1/16000 trẻ sơ sinh còn sống. Bệnh gây tử vong do di căn nếu không được điều trị kịp thời, vì vậy phát hiện sớm và áp dụng các phương pháp điều trị phù hợp là yếu tố quyết định sự sống còn của trẻ, giúp cứu vãn thị lực cho 1 hoặc cả 2 mắt. Tuy nhiên, việc nhận thức về những dấu hiệu ban đầu của bệnh còn hạn chế, đặc biệt là ở các nước đang phát triển trong đó có Việt Nam. Phần lớn các trường hợp UNBVM ở trẻ em được phát hiện muộn, khi khối u đã phát triển ra ngoài nhãn cầu hay di căn nên rất ít khả năng giữ lại mắt và duy trì thị lực [1].

Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng UNBVM là do đột biến bất hoạt cả 2 bản sao của gen ức chế khối u *RBI* (Retinoblastoma Transcriptional Corepressor 1). Đây là gen nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 13 vị trí 13q14.2, có kích thước DNA là 183 kb gồm 27 exon mã hóa 928 acid amin, lần đầu tiên được mô tả bởi Fung và cs vào năm 1987. Khoảng 45% các trường hợp UNBVM là do di truyền, kiểu di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường, những người mang đột biến gen *RBI* di truyền cũng làm tăng nguy cơ mắc các khối u không phải mắt trong suốt đời sống của họ; khoảng 55% các trường hợp còn lại chỉ phát hiện đột

biến trên mẫu mô ung thư võng mạc, và không có khuynh hướng phát triển khối u ở các vị trí khác. Đến nay, hơn 1000 đột biến gen *RBI* đã được ghi nhận trong các mẫu UNBVM, bao gồm các đột biến tạo mã kết thúc sớm, đột biến sai nghĩa, đột biến vị trí cắt nối intron-exon, đột biến lệch khung, và một phần nhỏ là đột biến mất đoạn lớn nằm rải rác trên vùng promoter và toàn bộ 27 exon [1-3]. 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. Chẩn đoán phân tử để xác định đột biến gen *RBI* cho những bệnh nhân UNBVM là rất cần thiết, không chỉ giúp bác sĩ lâm sàng lựa chọn liệu pháp điều trị thích hợp và có kế hoạch quản lý bệnh nhân hiệu quả, mà còn có ý nghĩa to lớn đối với việc tư vấn di truyền và dự đoán rủi ro cho các gia đình bị ảnh hưởng [4].

Ở Việt Nam, các nghiên cứu chủ yếu tập trung về tỷ lệ mắc bệnh, biểu hiện lâm sàng và các biến chứng của bệnh, một vài nghiên cứu xác định đột biến gen *RBI* đã được tiến hành trên bệnh nhân ở miền Bắc và miền Nam Việt Nam. Tuy nhiên, nghiên cứu trên bệnh nhân miền Bắc mới chỉ phân tích phát hiện đột biến gen *RBI* tế bào dòng mầm trong mẫu máu mà chưa tiến hành xác định đối chiếu trên cả mẫu mô sau phẫu thuật. Do đó, bức tranh về đột biến gen *RBI* ở bệnh nhân UNBVM Việt Nam vẫn chưa được nghiên cứu

\*Tác giả liên hệ: Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

# Detecting *RB1* gene mutations in retinoblastoma tumour of patients in Northern Vietnam in 2020

Thi Phuong Le, Nguyen Ha Linh Dao,  
Minh Ngoc Nguyen, Huy Thinh Tran, Van Khanh Tran\*

Hanoi Medical University

Received 18 May 2021; accepted 28 June 2021

## Abstract:

Retinoblastoma, a type of eye cancer in children, is mostly caused by inactivating mutations of both copies of the *RB1* gene. Early diagnosis and identification of *RB1* gene mutations would improve treatment outcomes and patients' management. This study was performed on 10 tumour samples of retinoblastoma patients using the direct sequencing technique. 11 different mutations were found in 9 out of 10 tumour samples, including 6 nonsense mutations, 1 missense mutation, 1 splice site mutation, and 3 frameshift mutations with 1 novel mutation that has not been reported before. The MLPA method was required to identify large deletion mutations in the *RB1* gene and the study on more samples to provide a picture of *RB1* gene mutations in Vietnamese retinoblastoma patients.

**Keywords:** mutation, *RB1* gene, retinoblastoma, sequencing.

**Classification number:** 3.2

đầy đủ và còn nhiều khó khăn để tư vấn di truyền, quản lý hiệu quả người mang gen bệnh cũng như chăm sóc, theo dõi bệnh nhân UNBVM sống sót sau khối u đầu tiên.

Từ những thực tiễn trên, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu: “Phát hiện các đột biến gen *RB1* trên mẫu mô ung thư của một số bệnh nhân UNBVM tại miền Bắc Việt Nam năm 2020 bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger”.

## Đối tượng và phương pháp

### Đối tượng

- 3 mẫu DNA tách từ mẫu máu người khỏe mạnh để làm mẫu đối chứng và tối ưu quy trình kỹ thuật sinh học phân tử, phân tích gen.

- Nhóm bệnh: 10 mẫu dịch chọc hút khối UNBVM của bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định ung thư võng mạc

theo tiêu chuẩn nhãn khoa.

- Các mẫu bệnh nhân được thu thập tại Bệnh viện Mắt Trung ương năm 2020, các kỹ thuật sinh học phân tử được thực hiện nghiên cứu tại Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

## Phương pháp

*Thiết kế nghiên cứu mô tả cắt ngang:*

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

- Tách chiết DNA: DNA được tách chiết từ khối UNBVM bằng bộ kit The QIAamp DNA Mini Kit (hãng Qiagen - Đức), quy trình tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất; kiểm tra nồng độ, độ tinh sạch DNA sau tách chiết bằng phương pháp quang phổ.

- Kỹ thuật PCR khuếch đại 27 exon của gen *RB1* sử dụng các cặp mồi đã công bố của Abouzeid và cs (2007) [5] bằng bộ kit GoTaq® Hot Start Master Mixes - Promega, với chu trình nhiệt như sau: 95 độ 15 phút, (95 độ 30 giây, 58 độ 30 giây, 72 độ 30 giây) x35 chu kỳ, 72 độ 10 phút.

- Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1,5%.

- Phản ứng giải trình tự Sanger toàn bộ gen *RB1* sử dụng bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI - Mỹ).

- Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing bằng kit BigDye XTerminator™ Purification Kit (ABI - Mỹ).

- Điện di sản phẩm giải trình tự trên hệ thống phân tích di truyền ABI3500 (Applied Biosystem - Mỹ).

- So sánh kết quả gen *RB1* của bệnh nhân với trình tự chuẩn trên GeneBank (NG\_009009) bằng phần mềm CLC main workbench để phát hiện các đột biến.

*Đạo đức nghiên cứu trong y học:* mẫu nghiên cứu được lấy khi bố mẹ bệnh nhân hoàn toàn đồng ý tham gia nghiên cứu; gia đình có quyền rời khỏi nghiên cứu khi không muốn tiếp tục tham gia vì bất kỳ lý do nào. Kết quả xét nghiệm gen sẽ được thông báo cho bố mẹ bệnh nhân để giúp cho các bác sỹ tư vấn điều trị và tư vấn di truyền. Các thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo bí mật.

## Kết quả

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen toàn bộ 27 exon của gen *RB1* trên mẫu DNA tách từ khối UNBVM, nghiên cứu đã phát hiện được 9/10 (90%) bệnh nhân có đột biến trên gen *RB1*, trong đó có 6/9 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử, 3/9 bệnh nhân mang 2 đột biến dị hợp tử kết hợp. 11 đột biến khác nhau đã được tìm thấy như bảng 1 dưới đây:

**Bảng 1. Kết quả xác định đột biến gen *RB1* trên các bệnh nhân nghiên cứu.**

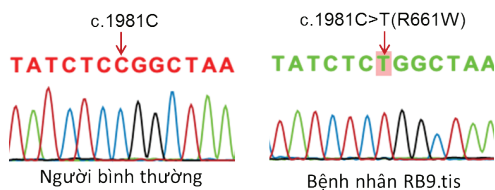
STT	Đột biến	Biến đổi acid amin	Vị trí	Bệnh nhân mang đột biến
<b>Đột biến tạo mã kết thúc sớm (nonsense)</b>				
1	c.179T>A	p.Leu60Ter	Exon 2	RB7
2	c.1333C>T	p.Arg445Ter	Exon 14	RB5, RB10
3	c.1363C>T	p.Arg455Ter	Exon 14	RB4
4	c.1399C>T	p.Arg467Ter	Exon 15	RB6
5	c.1654C>T	p.Arg552Ter	Exon 17	RB10
6	c.2415T>A	p.Tyr805Ter	Exon 23	RB3
<b>Đột biến sai nghĩa (missense)</b>				
7	c.1981C>T	p.Arg661Trp	Exon 20	RB9
<b>Đột biến vị trí cắt nối (splice)</b>				
8	c.2520+5G>A	Mất vị trí cắt nối các exon/intron	Intron 24	RB2
<b>Đột biến lệch khung (frameshift)</b>				
9	c.32_63del	p.Ala11Glyfs*9	Exon 1	RB1
10	c.1044delA	p.Ile348Metfs*19	Exon 10	RB2
11	c.2330delC	p.Pro777Leufs*33	Exon 23	RB3

11 đột biến khác nhau bao gồm: 6 đột biến tạo mã kết thúc sớm hay còn gọi là đột biến vô nghĩa (nonsense), 1 đột biến thay đổi acid amin (missense), 1 đột biến vị trí cắt nối exon-intron (splice) và 3 đột biến lệch khung (frameshift).

**Đột biến thay thế nucleotide**

Nghiên cứu đã xác định được 8 đột biến thay thế nucleotide bao gồm 6 đột biến tạo mã kết thúc sớm hay còn gọi là đột biến vô nghĩa (nonsense), 1 đột biến thay đổi acid amin (missense) và 1 đột biến vị trí cắt nối exon-intron (splice).

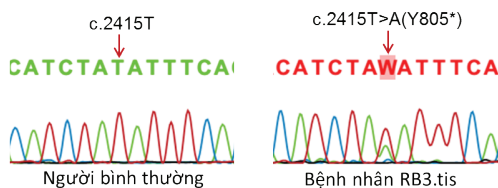
*Đột biến thay thế đồng hợp tử:*



**Hình 1. Đột biến thay thế nucleotide đồng hợp tử.**

Hình 1 cho thấy, vị trí 1981 trên cDNA gen *RB1* tương ứng với trình tự nucleotide C ở người bình thường đã bị thay thế bằng nucleotide T ở bệnh nhân RB9 trên cả 2 alen, điều này làm thay đổi bộ 3 CGG mã hóa acid amin Arginin ở vị trí codon 661 thành bộ 3 TGG mã hóa Tryptophan, đây là đột biến đồng hợp tử hay đột biến sai nghĩa (missense).

*Đột biến thay thế dị hợp tử:*

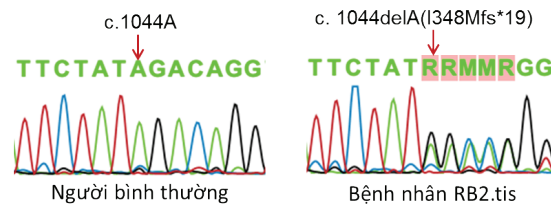


**Hình 2. Đột biến thay thế nucleotide dị hợp tử.**

Hình 2 cho thấy, tại vị trí c.2415 của gen *RB1* có trình tự là nucleotide T ở người bình thường đã được thay thế bằng nucleotide A ở bệnh nhân RB3, sự thay thế chỉ xảy ra trên 1 alen nên kết quả giải trình tự tại điểm này có 2 đỉnh chồng lên nhau. Đột biến thay thế dị hợp tử T bằng A dẫn đến sự thay thế bộ 3 TAT mã hoá tyrosine (Y) ở vị trí codon 805 bằng bộ 3 kết thúc TAA.

**Đột biến làm lệch khung dịch mã (frameshift)**

Có 3 đột biến xoá nucleotide đã được tìm thấy trong nghiên cứu, bao gồm đột biến đồng hợp c.32\_63del (p.Ala11Glyfs\*9) ở bệnh nhân RB1, đột biến dị hợp c.1044delA (p.Ile348Metfs\*19) ở bệnh nhân RB2 và đột biến dị hợp c.2330delC (p.Pro777Leufs\*33) ở bệnh nhân RB3.



**Hình 3. Đột biến dị hợp tử xoá nucleotide A ở bệnh nhân RB2.**

Tại vị trí nucleotide c.1044 gen *RB1* ở người bình thường là A, còn ở bệnh nhân RB2 vị trí này bị mất nucleotide A dị hợp tử nên kết quả giải trình tự sau đó các đỉnh bị chồng lên nhau (hình 3). Việc mất nucleotide A sẽ gây nên lệch khung dịch mã và tạo mã kết thúc sớm ở vị trí acid amin thứ 19 bắt đầu từ vị trí đột biến mất nucleotide.

**Bàn luận**

Ung thư võng mạc xảy ra khi đột biến bất hoạt cả 2 alen của gen áp chế khối u RB1 [6]. Các đột biến trong gen *RB1* mang tính chất không đồng nhất, phân bố trên cả vùng promoter cũng như 27 exon. Hơn 2/3 các đột biến trong gen *RB1* được dự đoán là tạo nên mã kết thúc sớm (nonsense) dẫn tới hình thành protein RB1 không hoàn chỉnh. Cho đến nay, trên 1000 đột biến gen *RB1* đã được đưa vào ngân hàng dữ liệu ClinVar [3]. 16 điểm nóng đột biến của gen *RB1* bao gồm các đột biến vô nghĩa, đột biến ảnh hưởng tới phân cắt mRNA và đột biến sai nghĩa đã được thống kê thường xảy ra tại các exon 9, 10, 14, 17, 18, 20 và 23 trong nghiên cứu tổng hợp (meta-analysis) của Valverde và cs (2005) cũng như nghiên cứu của Tomar và cs trên bệnh nhân Singapore năm 2017 [4, 7].

Các đột biến tạo mã kết thúc sớm là dạng đột biến gen *RB1* thường gặp nhất, đột biến làm thay thế nucleotide tạo nên bộ 3 kết thúc sớm hay tín hiệu dừng dịch mã sớm dẫn đến hậu quả không tạo được sản phẩm protein RB1 hoặc tạo ra protein RB1 không có chức năng gây nên bệnh UNBVM [4]. Có 6/11 đột biến tạo mã kết thúc sớm đã phát hiện được trong nghiên cứu, các đột biến này đã được báo cáo trong các

nghiên cứu trên thế giới. Đột biến c.179T>A(p.Leu60Ter) được công bố lần đầu tiên bởi He và cs (2014) [8] trên các bệnh nhân Trung Quốc, sự thay thế T bằng A làm thay đổi bộ 3 TTA mã hoá Leucin ở vị trí codon 60 trên exon 2 thành bộ 3 kết thúc TAA. Một đột biến thay thế nucleotide dạng đột biến sai nghĩa đã được tìm thấy là c.1981C>T(p.Arg661Trp) ở exon 20, đột biến này cũng đã được báo cáo ở nhiều bệnh nhân UNBVM trên toàn thế giới, Whitaker và cs (1988) đã chứng minh đột biến c.1981C>T(p.Arg661Trp) làm giảm hoạt động của protein RB1 gây nên bệnh lý UNBVM [9]. Một đột biến thay thế nucleotide ở vị trí cắt nối cũng được tìm thấy trong nghiên cứu là c.2520+5G>A ở intron 24, tuy không trực tiếp làm thay đổi trình tự mã hoá acid amin của protein RB1 nhưng ảnh hưởng đến vị trí cắt bỏ intron 24 để nối exon 24 và 25 vào nhau tạo nên mRNA hoàn chỉnh. Đột biến này đã được công bố gây bệnh và được mô tả trên ngân hàng dữ liệu biến thể gen *RB1* (variant ID: 428703) [3].

Những đột biến lệch khung được tìm thấy trong nghiên cứu là c.32\_63del(p.Ala11Glyfs\*9) ở exon 1, c.1044delA(p.Ile348Metfs\*19) ở exon 10 và c.2330delC(p.Pro777Leufs\*33) ở exon 23. Những đột biến này sẽ gây lệch khung dịch mã ngay tại vị trí nucleotide bị mất và sẽ tạo nên một tín hiệu kết thúc sớm sau đó một hoặc một số acid amin vì vậy sẽ không tạo được protein RB1 hoặc tạo ra protein RB1 không có chức năng gây nên bệnh UNBVM. Đột biến c.32\_63del(p.Ala11Glyfs\*9) ở exon 1 đã được mô tả gây bệnh UNBVM trên các công bố khác nhau [3]. Đột biến c.2330delC(p.Pro777Leufs\*33) ở exon 23 chưa được ghi nhận trên các ngân hàng dữ liệu đột biến gen *RB1* trong bệnh UNBVM, tuy nhiên đã được George và cs (2015) [10] tìm thấy trong ung thư phổi không tế bào nhỏ c.1044delA(p.Ile348Metfs\*19) ở exon 10 là đột biến mới lần đầu tiên được tìm thấy trong nghiên cứu, vị trí c.1044 bị mất nucleotide A dị hợp tử làm cho một mạch của mRNA bị lệch khung dịch mã, các acid amin từ vị trí codon 348 sẽ bị thay thế bằng các acid amin khác, sự thay thế này sẽ dừng lại sau đó 19 acid amin do tạo thành mã kết thúc. Đột biến này được tìm thấy ở bệnh nhân mã số RB2, ngoài đột biến dị hợp tử làm lệch khung dịch mã ở exon 10, bệnh nhân còn mang một đột biến dị hợp tử c.2520+5G>A làm mất vị trí cắt nối ở intron 24.

Nghiên cứu mới chỉ tiến hành được trên 10 mẫu dịch chọc hút khối UNBVM nhưng đã phát hiện được 11 đột biến khác nhau trên 9 bệnh nhân. Việc xác định đột biến tế bào soma trên mẫu mô ung thư là chỉ điểm cho việc xác định đột biến tế bào mầm trên mẫu máu ở các bệnh nhân UNBVM, làm cơ sở để xác định tình trạng mang gen trên các thành viên gia đình bệnh nhân. Việc này không chỉ giúp bác sĩ lâm sàng khẳng định chẩn đoán, lựa chọn phương pháp điều trị kịp thời, mà còn giúp tăng nhận thức về nguy cơ mắc đề khám đáy mắt định kỳ ở những thành viên gia đình. Đồng thời, đây cũng là cơ sở để tư vấn di truyền, tư vấn trước hôn nhân, chẩn đoán trước sinh hay trước làm tổ đối với những người mang gen nhóm bệnh lý này.

Một bệnh nhân chưa tìm thấy đột biến bằng phương pháp giải trình tự gen trực tiếp có thể do bệnh nhân mang đột biến xoá đoạn lớn gen *RB1* hoặc đột biến ở một gen khác, cần làm thêm phương pháp MLPA hoặc giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing) để khẳng định thêm. Nghiên cứu cũng cần mở rộng trên nhiều bệnh nhân hơn để đưa ra bức tranh về các đột biến gen *RB1* trên bệnh nhân UNBVM tại Việt Nam.

## Kết luận

Nghiên cứu đã phát hiện được 9/10 (90%) bệnh nhân có đột biến trên gen *RB1* ở mẫu UNBVM. 11 đột biến khác nhau đã được phát hiện, trong đó có 6 đột biến vô nghĩa (nonsense), 3 đột biến lệch khung (frameshift), 1 đột biến thay đổi acid amin (missense) và 1 đột biến vị trí cắt nối intron-exon (splice).

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này 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 trong gia đình; đề xuất quy trình xét nghiệm di truyền sàng lọc và chẩn đoán sớm” theo Quyết định số 2385/QĐ-BYT ngày 14/5/2021. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Dimaras and T.W. Corson (2019), “Retinoblastoma, the visible CNS tumor: a review”, *J. Neurosci. Res.*, **97**(1), pp.29-44.
- [2] H.R. Davies, et al. (2021), “Whole-genome sequencing of Retinoblastoma reveals the diversity of rearrangements disrupting *RB1* and uncovers a treatment-related mutational signature”, *Cancers (Basel)*, **13**(4), DOI: 10.3390/cancers13040754.
- [3] <https://clinvminer.genetics.utah.edu/variants-by-gene/RB1/significance/any>.
- [4] S. Tomar, et al. (2017), “Mutation spectrum of *RB1* mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling”, *PLOS ONE*, **12**(6), DOI: 10.1371/journal.pone.0178776.
- [5] H. Abouzeid, et al. (2007), “Ten novel *RB1* gene mutations in patients with retinoblastoma”, *Mol. Vis.*, **13**, pp.1740-1745.
- [6] J.L. Berry, et al. (2019), “The *RB1* story: characterization and cloning of the first tumor suppressor gene”, *Genes (Basel)*, **10**(11), DOI: 10.3390/genes10110879.
- [7] J.R. Valverde, et al. (2005), “*RB1* gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database”, *BMC Genet.*, **6**, DOI: 10.1186/1471-2156-6-53.
- [8] M.-Y. He, et al. (2014), “Screening of *RB1* gene mutations in Chinese patients with retinoblastoma and preliminary exploration of genotype-phenotype correlations”, *Molecular Vision*, **20**, pp.545-552.
- [9] L.L. Whitaker, et al. (1998), “Growth suppression by an E2F-binding-defective retinoblastoma protein (RB): contribution from the RB C pocket”, *Mol. Cell. Biol.*, **18**(7), pp.4032-4042.
- [10] J. George, et al. (2015), “Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer”, *Nature*, **524**(7563), pp.47-53.