

## ĐỘT BIẾN GEN RB1 Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ NGUYÊN BÀO VÔNG MẠC TẠI BỆNH VIỆN MẮT TRUNG ƯƠNG

Nguyễn Hải Hà<sup>1\*</sup>, Vũ Phương Nhung<sup>1</sup>, Lê Thị Thủy Quỳnh<sup>2</sup>, Nguyễn Huy Bình<sup>3</sup>,  
Phạm Văn Tuyền<sup>4</sup>, Nguyễn Đăng Tôn<sup>1</sup>, Nông Văn Hải<sup>1</sup>

### TÓM TẮT:

**Đặt vấn đề:** Ung thư nguyên bào võng mạc (UTNBVM) là bệnh ung thư võng mạc ác tính ở trẻ em thường được phát hiện trước 5 tuổi, có liên quan tới đột biến gen RB. Sáng lọc đột biến gen RB1 có ý nghĩa với điều trị, tiên lượng và tư vấn di truyền. **Mục tiêu:** Sáng lọc đột biến gen RB1 của một gia đình có trẻ ung thư nguyên bào võng mạc. **Đối tượng và phương pháp:** Thu thập mẫu máu của 4 thành viên trong gia đình (bố, mẹ và 2 con); phân tích đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen và phát hiện bản phiên mã bất thường của gen RB1 bằng kỹ thuật sao mã ngược. **Kết quả:** Phát hiện hai con và bố mang đột biến dị hợp tử c.G1960>C và 3 bệnh nhân này đều mang bản sao mRNA bất thường. **Kết luận:** Nghiên cứu đã phát hiện được đột biến di truyền dị hợp tử c.G1960>C là đột biến liên quan tới bất thường của bản sao mRNA. Kết quả nghiên cứu đóng góp vào việc hoàn thiện quy trình sàng lọc, tư vấn di truyền đối với các gia đình tiền sử ung thư nguyên bào võng mạc.

**Từ khóa:** Đột biến gen RB1, ung thư nguyên bào võng mạc, RT-PCR, giải trình tự.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư nguyên bào võng mạc là bệnh u ác tính mắt thường gặp ở trẻ em dưới 5 tuổi. Bệnh xuất hiện với tỷ lệ khoảng 1/200000 ở Mỹ [9] và ở nhiều khu vực trên thế giới. Bệnh xảy ra cân bằng ở cả hai giới tính nam và nữ, không phụ thuộc nguồn gốc chủng tộc. Rb có thể xuất hiện ở dạng di truyền (~40%) hoặc không di truyền (~60%) [4]. Dạng di truyền thường xảy ra ở hai mắt và nhiều ổ trong khi dạng không di truyền chỉ xảy ra ở 1 mắt và 1 khối u. Cả hai dạng này của Rb đều liên quan đến sự mất chức năng của cả hai alen của gen áp chế khối u RB1 (retinoblastoma 1) nằm trên nhiễm sắc thể số 13 [5].

Cho đến nay, hơn 900 đột biến đã được phát hiện trên gen RB1 ở các bệnh nhân Rb (Valverde et al., 2005) bằng nhiều phương pháp khác nhau như PCR-RFLP với multiplex PCR định lượng và giải trình tự gen... [3]. Ngoài ra, một số tác giả đã sử dụng phương pháp phân tích mRNA của gen RB1 nhằm xác định các đột biến mất toàn bộ exon, thay thế exon và điểm phân cắt exon-intron đối với bản phiên mã của gen RB1 [8]. Tại Việt Nam đã có một số nghiên cứu về đột biến gen RB1 trên bệnh nhân ung thư nguyên bào võng mạc của Nguyễn Công Kiệt và Nguyễn Trí Dũng trên 30 ca ung thư võng mạc [2]. Tuy nhiên, các tác giả mới chỉ xác định được 1 trường hợp bệnh nhân có mất đoạn. Hiện nay, phương pháp giải trình đã được ứng dụng để xác định thêm nhiều đột biến gen RB1 ở bệnh nhân ung thư nguyên bào võng mạc [1]. Do vậy, mục tiêu nghiên cứu là phát hiện thêm các đột biến gen RB1 có tính chất di truyền ở gia đình có tiền sử ung thư nguyên bào võng mạc và là cơ sở để thực hiện tư vấn di truyền cho gia đình bệnh nhân.

<sup>1</sup> Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup> Bệnh viện Mắt Trung ương

<sup>3</sup> Đại học Y Hà Nội

<sup>4</sup> Bệnh viện Bạch Mai

\* Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Nguyễn Hải Hà

Email: binhcom2003@yahoo.com

Ngày nhận bài: 20/9/2016

Ngày nhận bài phản biện: 18/10/2016

Ngày chấp nhận đăng: 21/10/2016

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là một gia đình gồm bố mẹ và hai con gái sinh năm 2010 và 2012 được chẩn đoán xác định là ung thư nguyên bào võng mạc tại bệnh viện Mắt Trung ương bằng lâm sàng và chẩn đoán mô bệnh học.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

\* Phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu mô tả

\* Kỹ thuật phân tích giải trình tự DNA và mRNA

Lấy mẫu bệnh phẩm: 2ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA

Tách chiết DNA từ máu ngoại vi bằng kit EZNA blood DNA mini (Omega) để tách chiết DNA tổng số từ máu ngoại vi.

*Giải trình tự DNA:* vùng điều khiển và toàn bộ các exon gen *RB1* được khuếch đại với các cặp mồi đặc hiệu. Các sản phẩm PCR sẽ được tiến hành giải trình tự trực tiếp trên máy ABI 3500 Genetic Analyzer. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm sinh học BioEdit.

*Phân tích mRNA:* tách RNA tổng số từ máu sau đó tổng hợp cDNA kit First-Strand cDNA Synthesis Kit for Real-time PCR (Affymetrix-Mỹ). Các sản phẩm cDNA được phân tích bằng kỹ thuật PCR và điện di trên agarose 1,2%.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Gia đình bệnh nhân có bố mẹ biểu hiện bình thường ở mắt. Con gái thứ nhất (kí hiệu KVN15) sinh năm 2010, phát hiện bệnh năm 2013 khi 3 tuổi với khối u ở 2 mắt bao gồm mắt phải là giai đoạn C, mắt trái giai đoạn D theo phân loại quốc tế. Con gái thứ 2 (kí hiệu K24) sinh năm 2012, phát hiện bệnh năm 2015 khi 2 tuổi với khối u nhỏ ở mắt phải giai đoạn A theo phân loại quốc tế. Mắt trái chưa phát hiện khối u ở thời điểm khám. Bệnh nhân được chỉ định laser mắt phải và hiện tại vẫn

được các bác sĩ tại Viện Mắt Trung ương theo dõi.

### 3.1. Kết quả phân tích giải trình tự DNA

Kết quả phân tích DNA hệ gen đã phát hiện bố và 2 con mang đột biến dị hợp tử c.G1960>C, đây là một đột biến thay thế xảy ra tại vị trí nucleotide cuối cùng của exon 19 (Hình 1).

### 3.2. Kết quả phân tích mRNA trên mẫu bệnh nhân

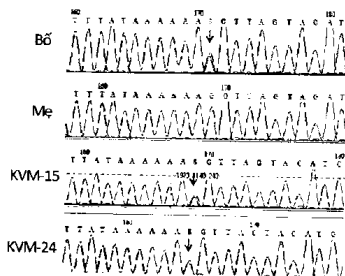
Sau phản ứng tổng hợp cDNA, cặp mồi nhân đoạn cDNA tương ứng với exon 19-22 của gen *RB1* được sử dụng khuếch đại. Kết quả PCR cho thấy 3 bệnh nhân (bố và 2 con gái) mang đột biến c.G1960>C đều xuất hiện 2 băng có kích thước 728bp và ~ 600bp (Hình 2), trong khi mẫu người bình thường (bà mẹ) chỉ cho 1 đoạn gen có kích thước 728bp.

## 4. BÀN LUẬN

Ung thư nguyên bào võng mạc là bệnh u ác tính mắt thường gặp ở trẻ em dưới 5 tuổi, với tỷ lệ phát hiện khoảng 40 trường hợp trong 1 năm tại Viện Mắt Trung ương. Mặc dù có nhiều nghiên cứu đã thống kê có hơn 900 đột biến gen *RB1* gây ra ra bệnh ung thư nguyên bào võng mạc, nhưng chỉ có một số đột biến có thể di truyền cho thế hệ sau [6]. Hiện nay, chưa có nghiên cứu đầy đủ về các đột biến di truyền gen *RB1* trên bệnh nhân người Việt Nam và do vậy chưa thể có quy trình sàng lọc và tư vấn di truyền đầy đủ cho các gia đình có tiền sử ung thư nguyên bào võng mạc. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện đột biến dị hợp tử c.G1960>C ở người cha và 2 người con; không phát hiện thấy đột biến này ở người mẹ. Như vậy, đột biến c.G1960>C đã được người cha truyền lại cho hai con. Đột biến c.G1960>C đã được báo cáo trong cơ sở dữ liệu đa hình/đột biến của gen *RB1* trên Leiden Open Variation Database. Đây là vị trí nằm trong chuỗi trình tự mang những dấu hiệu nhận biết cho enzyme trong quá trình cắt nối

mRNA, do đó nó được dự đoán là có ảnh hưởng đến việc tổ hợp lại phân tử mRNA của RB1. Giải thích này cũng rất phù hợp khi chúng tôi cũng phát hiện thấy các bản sao mã mRNA bất thường ở 3 bệnh nhân mang đột biến c.G1960>C của gen RB1. Theo y văn thế giới thì đột biến bất hoạt

gen RB1 là nguyên nhân chính của ung thư nguyên bào võng mạc. Nếu có đột biến gen RB1 làm mất chức năng ức chế sinh sản tế bào của protein RB. Vì vậy, các phôi bào sinh sản bất tận dẫn đến bệnh ung thư [7].

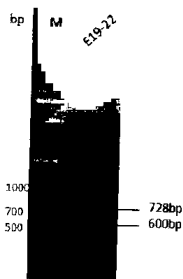


**Hình 1.** Kết quả phân tích đột biến gen RB1 tại exon 19 của gia đình bệnh nhân. Mỗi tên chỉ điểm xuất hiện đột biến thay thế nucleotide (c.G1960>C) ở dạng dị hợp tử trên mẫu bố (bình thường) và hai con gái (UTVM)

Với mong muốn hoàn thiện quy trình sàng lọc, tư vấn cho các gia đình có tiền sử ung thư nguyên bào võng mạc, nghiên cứu này đã cung cấp thêm thông tin về 1 đột biến gen RB1 có khả năng di truyền cho thế hệ sau. Hơn nữa, với việc sử dụng cùng lúc 2 xét nghiệm, được coi là kiểm tra chéo "double check", cung cấp thông tin chính xác là cơ sở cho các bác sỹ tư vấn di truyền và bác sỹ điều trị trong chẩn đoán, tiên lượng và tư vấn di truyền cho người thân trong gia đình của bệnh nhân.

## 5. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã định được một đột biến của gen RB1 truyền từ bố sang con là đột biến



**Hình 2.** Kết quả phân tích mRNA đoạn tương ứng exon 19-22 mẫu K15. Mẫu M: Thang DNA chuẩn

c.G1960>C. Đây là đột biến liên quan tới bất thường trong quá trình hoàn thiện mRNA được thể hiện thông qua kết quả phân tích mRNA. Kết quả thu được đóng góp vào việc hoàn thiện tư vấn di truyền đối với các gia đình có con mắc ung thư nguyên bào võng mạc.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hà NH, Hưng ĐM, Quỳnh LT, Dương NT, Tôn ND (2014) Phát hiện đột biến gen rb1 ở trẻ em ung thư nguyên bào võng mạc. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 12(1): 23-29.
- Kiệt NC, Dũng NT (2005) Đặc điểm di truyền trong ung thư nguyên bào võng mạc *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh* 9(1): 99-103.

3. Abidi O, Knari S, Sefri H, et. al. (2011) Mutational analysis of the RB1 gene in Moroccan patients with retinoblastoma. *Mol Vis* 173541-3547.

4. Balmer A, Zografos L, Munier F (2006) Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene* 25(38): 5341-5349.

5. Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, et. al. (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305(5937): 779-784.

6. Knudson AG (1971) Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68(4): 820-823.

7. Parsam V, Ali M, Honavar S, et. al. (2011) Splicing aberrations caused by constitutional RB1 gene mutations in retinoblastoma. *J Biosci* 36(2): 281-287.

8. Parsam V, Kannabiran C, Honavar S, et. al. (2009) A comprehensive, sensitive and economical approach for the detection of mutations in the RB1 gene in retinoblastoma. *J Genet* 88(4): 517-527.

9 Young J, Smidth M, Roffers S, et. al. (1999) Cancer incidence and survival among children and adolescent. *In Retinoblastoma* (ed. L. A. Ries): 1975-1995

Lời cảm ơn:

Công trình được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài cấp cơ sở năm 2015 của Viện Nghiên cứu hệ gen.

## SUMMARY

### RB1 GENE MUTATION IN RETINOBLASTOMA PATIENTS IN NATIONAL INSTITUTE OF OPHTHALMOLOGY

Nguyen Hai Ha<sup>1</sup>, Vu Phuong Nhung<sup>1</sup>, Le Thi Thuy Quynh<sup>2</sup>, Nguyen Huy Binh<sup>3,4</sup>,  
Pham Van Tuyen<sup>4</sup>, Nguyen Dang Ton<sup>1</sup>, Nong Van Hai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genome Research

<sup>2</sup>National Institute of Ophthalmology

<sup>3</sup>Ha Noi Medical University

<sup>4</sup>Bach Mai Hospital

**Background:** Retinoblastoma is a malignant tumor of the retina which related to RB1 gene mutation. This cancer occurs usually in children before age five. Screening mutations on RB1 gene is meaningful for treatment, diagnosis and genetic counseling. **Objectives:** Screening mutations on RB1 gene from a family with affected children. **Subjects and methods:** Peripheral blood was collected from 4 family members (father, mother and two children). Subsequently, RB1 mutation was detected by DNA sequencing and abnormal RB1 transcript was identified by RT-PCR. **Results:** Heterozygous mutation c.G1960>C was found in father and two children, all of them have abnormal RB1 transcript. **Conclusions:** This study reveals a hereditary heterozygous mutation c.G1960>C which is relevant to aberrant RB1 mRNA. Our results contribute to fulfill the screening strategy as well as genetic counseling for families with retinoblastoma history.

**Keywords:** RB1 mutation, retinoblastoma, RT-PCR, sequencing.