

báo xuất huyết tiêu hóa ở bệnh nhân xơ gan (diện tích dưới đường cong ROC < 0,7), kết quả này tương tự của tác giả Rockey DC không xác định được giá trị cutoff tối ưu của chỉ số APRI trong dự đoán xuất huyết tiêu hóa do giãn vỡ tĩnh mạch thực quản[6]. Theo Forestier, APRI có liên quan tới xuất huyết tiêu hóa với ngưỡng cắt 2,82[7]. Theo Phạm Trung Dũng, Trần Ngọc Ánh thì APRI không có giá trị dự báo giãn TMTQ lớn, FORNS có giá trị dự báo giãn TMTQ lớn với AUROC 0,77[2]. Nghiên cứu ban đầu của chúng tôi với số lượng bệnh nhân chưa phải là nhiều. Các bệnh nhân được đưa vào nghiên cứu chọn lựa ngẫu nhiên không theo một tập hợp thuần nhất về biến đổi công thức máu hay mức độ suy gan để loại trừ các sai số do nhiễu. Các chỉ số này đều dựa vào tiêu chuẩn AST, ALT và có thể có các bệnh nhân có số lượng tiểu cầu thấp ngay từ đầu hay men gan tăng do dùng thuốc hạ sốt giảm đau nên rất khó xác định được chỉ số APRI, FORNS, FIB4 có phải do xuất huyết tiêu hóa hay là sau khi xuất huyết tiêu hóa mới biến đổi như vậy.

V KẾT LUẬN

Chỉ số APRI, FIB4 tăng dần với mức độ suy gan theo Child Pugh. APRI, FIB4 có giá trị chẩn đoán Child Pugh A (diện tích dưới đường cong ROC 0,74 và 0,72). Chỉ số FORNS không thay đổi theo Child Pugh. Chỉ số APRI, FORNS, FIB4

không khác biệt ở nhóm XHTH do giãn vỡ TMTQ hay tĩnh mạch phình vị. Chỉ số APRI, FORNS, FIB4 không có giá trị dự báo XHTH ở BN xơ gan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Khánh Trạch và Phạm Thị Thu Hồ (2004). *Xơ gan*, Bệnh học Nội tập II, Nhà xuất bản Y học.
2. Phạm Trung Dũng và Trần Ngọc Ánh (2014). "Các thăm dò không nội soi trong dự báo giãn, vỡ tĩnh mạch thực quản ở bệnh nhân xơ gan". *Y học Việt Nam*, tháng 1- số 1(414), 25-29.
3. Mai Hồng Bằng (2006). "Nghiên cứu mối liên quan giữa giãn tĩnh mạch thực quản với mức độ xơ gan và biến chứng xuất huyết tiêu hóa". *Y học thực hành*, 2, 29-31.
4. Paul C, Bernard Z và Catherine M (1990). "Gastroesophageal endoscopic features in cirrhosis: Observer variability, interassocraton and relationship to hepatic dysfunction". *Gastroenterology*, 98, 156-162.
5. Phạm Trung Dũng (2012). *Nghiên cứu ứng dụng của số lượng tiểu cầu, tỷ lệ AST/ALT, APRI, FORNS trong đánh giá tình trạng xơ hóa gan*, Luận văn thạc sỹ Y học.
6. Rockey DC, Elliott A và Lyles T (2016). Prediction of esophageal varices and variceal hemorrhage in patients with acute upper gastrointestinal bleeding. *J Investig Med*, 63(3), 45-51.
7. Forestier J, Dumortier, Guillaud O và cộng sự (2010). "Non invasive diagnostic and prognosis of liver cirrhosis: a comparison of biological scores, elastometry and metabolic liver function tests. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 22, 532-540.

XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ĐA HÌNH GEN CYP2C19 Ở BỆNH NHÂN HỘI CHỨNG ĐỘNG MẠCH VÀNH CẤP

Phạm Thị Hồng Nhung¹, Vũ Ngọc Trung²,
Nguyễn Thị Thủy Mậu¹, Đỗ Thị Lệ Hằng¹, Nguyễn Thanh Thủy³,
Vũ Thị Thơm¹, Đinh Đoàn Long¹, Trịnh Hoàng Hà²

TÓM TẮT

CYP2C19 là một trong những enzyme chủ yếu tham gia vào quá trình hoạt hóa thuốc chống ngưng tập tiểu cầu clopidogrel trong điều trị hội chứng động

mạch vành cấp. Allen đột biến CYP2C19 *2 (c.681G > A), *3 (c.636G > A) và *17 (c. - 806C > T) gây thay đổi hoạt tính của enzyme nên có thể dẫn đến khả năng đáp ứng thuốc khác nhau ở bệnh nhân. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình phân tích đa hình di truyền CYP2C19 trên bệnh nhân người Việt Nam mắc hội chứng động mạch vành cấp. Phương pháp nghiên cứu chính được sử dụng gồm tách DNA tổng số từ máu ngoại vi, khuếch đại gen bằng PCR, xác định kiểu gen bằng giải trình tự và/hoặc bằng enzym cắt giới hạn (RFLP). Kết quả phân tích gen trên 120 bệnh nhân cho thấy: tần số alen đột biến *2 là 28%; tần số của các alen đột biến *3 và *17 rất thấp, lần lượt là 6% và 2%. Kết quả nghiên cứu này sẽ

¹Khoa Y Dược Đại học Quốc gia Hà Nội

²Bệnh viện Đại học Quốc gia Hà Nội

³Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Phạm Thị Hồng Nhung

Email: nhungpham_smp@vnu.edu.vn

Ngày nhận bài: 23.9.2016

Ngày phản biện khoa học: 15.11.2016

Ngày duyệt bài: 28.11.2016

đang cấp những thông tin cơ bản định hướng cho các nghiên cứu sắp tới về sử dụng thuốc trong điều trị hội chứng động mạch vành cấp ở người Việt Nam.

Từ khóa: đa hình gen CYP2C19, clopidogrel, hội chứng động mạch vành cấp

SUMMARY

ESTABLISHING THE GENOTYPING METHOD OF CYP2C19 POLYMORPHISMS IN ACUTE CORONARY SYNDROME PATIENTS

CYP2C19 is one of the principal enzymes involved in the antiplatelet prodrug clopidogrel. Mutant alleles such as CYP2C19 *2 (c.681G > A), *3 (c.636G > A) and *17 (c. - 806C > T) have been associated with changing in enzyme activity, which may result in the ability of various drug responses in patients. Therefore, we have constructed the genotyping test of CYP2C19 polymorphism on Vietnamese acute coronary syndrome patients treated with Clopidogrel. Main methods included DNA extraction from peripheral blood samples, polymerase chain reaction (PCR) for amplification of target genes, identifying the genotype by Sanger sequencing and RFLP. Genetic analysis results of 120 patients have shown that mutation allele frequency of CYP2C19*2 was 28%, while mutation alleles of CYP2C19*3 and CYP2C19*17 with very low frequencies were 6% and 2%, respectively. Results of this test will provide basic information to orient future studies on Clopidogrel responses of Vietnamese patients with acute coronary syndrome.

Keywords: CYP2C19 polymorphisms, clopidogrel, acute coronary syndrome

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cytochrome P450 (CYP) là siêu họ enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa của phần lớn các thuốc được sử dụng trong lâm sàng hiện nay như thuốc chống ngưng tập tiểu cầu clopidogrel, thuốc chống động kinh như mephenytoin, omeprazole, diazepam và thuốc an thần....

Enzyme CYP bao gồm CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 và CYP2E1. Trong đó, enzym CYP2C19 là enzym chính tham gia vào quá trình chuyển hóa thuốc chống ngưng tập tiểu cầu Clopidogrel [1].

Gen CYP2C19 chứa 9 exon dài trung bình 90 kb ở nhiễm sắc thể 10q23.33 và mã hóa cho protein CYP2C19 dài 490 amino acids [2]. Hiện nay, khoảng 30 allen CYP2C19 đột biến đã được báo cáo bên cạnh dạng allen kiểu dại được ký hiệu là CYP2C19*1. Allen CYP2C19*2 là dạng allen phổ biến nhất liên quan đến kiểu hình chuyển hóa chậm do đột biến thay G bằng A ở vị trí 681 của exon 5. Tần số của CYP2C19*2 là khoảng 12% ở người da trắng, 15% ở người Mỹ gốc Phi và 29-35% ở người châu Á [3][4]. Allen

CYP2C19*3 là dạng allen đột biến phổ biến thứ hai liên quan đến kiểu hình chuyển hóa chậm, xuất hiện do đột biến thay G bằng A ở vị trí 636 của exon 4. Tần số của allen CYP2C19*3 trong phân lớn các quần là dưới 1%; tuy nhiên cao hơn ở quần thể người châu Á với 2-9% [3][4]. Một allen quan trọng khác liên quan đến tăng cường khả năng chuyển hóa của CYP2C19 là allen CYP2C19*17. Allen CYP2C19*17 là đa hình thay thế C bằng T ở vị trí - 806 trên promoter. Tần số allen CYP2C19*17 là khoảng 21% ở người da trắng, 16% ở người Mỹ gốc Phi và 3% ở người châu Á [4][5].

Năm 2013, tổ chức của Mỹ về dược lý lâm sàng và phương pháp điều trị (American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics) đã đưa ra khuyến cáo sử dụng thuốc chống ngưng tập tiểu cầu Clopidogrel cho bệnh nhân đặt stent động mạch vành qua da dựa trên kiểu gen CYP2C19. Cụ thể, những bệnh nhân mang kiểu gen CYP2C19 *1/*17, *17/*17 và *1/*1 được chỉ định sử dụng liều chuẩn của clopidogrel; những bệnh nhân mang kiểu gen *1/*2, *1/*3, *2/*17, *2/*2, *2/*3 và *3/*3 cần xem xét thay đổi liều/thuốc điều trị [6]. Như vậy, việc xác định đa hình di truyền CYP2C19*2, *3 và *17 giúp bác sỹ lâm sàng đưa ra liều điều trị thích hợp cho bệnh nhân trong việc chống huyết khối hiệu quả khi điều trị với clopidogrel trên bệnh nhân hội chứng động mạch vành cấp. Hiện nay ở Việt Nam chưa có công bố nào về tần số phân bố các allele CYP2C19*2, *3 và *17 cũng như quy trình phân tích gen áp dụng được cho các phòng phân tích, xét nghiệm. Từ nhu cầu lâm sàng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này để thiết lập quy trình xác định được đa hình di truyền CYP2C19*2, *3 và *17 và được đầu đánh giá tần số phân bố của ba allen này ở quần thể người Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu thập và bảo quản mẫu sinh phẩm:

120 mẫu máu toàn phần được lấy từ tĩnh mạch của bệnh nhân có hội chứng động mạch vành cấp tại Viện tim mạch Việt Nam và Trung tâm tim mạch của Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các mẫu máu được đựng trong ống chuyển dụng có sẵn chất chống đông EDTA và giữ lạnh ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Tách chiết DNA tổng số: Mẫu máu được rửa đông trên đá và hóa chất để về nhiệt độ phòng. Chúng tôi sử dụng E.Z.N.A blood DNA Mini kit (Omega-Biotek) để tách chiết DNA tổng số theo quy trình khuyến cáo của hãng.

Thiết kế mỗi đặc hiệu cho các allen CYP2C19*2, *3 và *17: Cặp mỗi được thiết kế và đánh giá các thông số với phần mềm

PerPrimer version 1.1.14. Cặp mỗi tự thiết kế được đặt tổng hợp tại hãng IDT (Mỹ) với trình tự mỗi xuôi và ngược được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mỗi nhân dòng các allen CYP2C19

Allen	Trình tự mỗi	Độ dài sản phẩm
CYP2C19*2	TGGAATTGAAGTATCTTTGAGCCC CAATGAATCACAAATACGCAAGCAG	719 bp
CYP2C19*3	GCAACCATTATTAAACGACTAGG CTGTCTCATCAGCTAGAAATCCCA	898 bp
CYP2C19*17	GCCCTTAGCACCAAATTCTC AGACCCCTGGGAGAACAGGAC	421 bp

Nhân dòng gen các allen CYP2C19*2, *3 và *17 bằng PCR: Để có quy trình nhân dòng đặc hiệu và ổn định, chúng tôi xác định nhiệt độ gắn mỗi, nồng độ hoạt động tối ưu của các thành phần trong phản ứng PCR sử dụng Q5® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gồm 3 giai đoạn: biến tính ban đầu 98°C trong 3 phút; 35 chu kì: 98°C trong 10 giây, gắn mỗi ở 58°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây; thời gian kéo dài cuối 72°C trong 2 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1.5%.

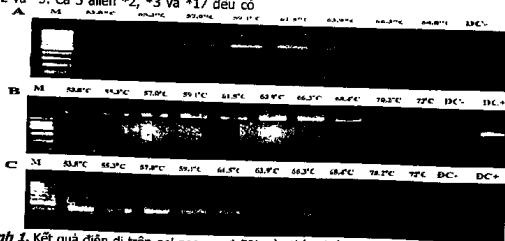
Xác định kiểu gen CYP2C19*2, *3 và *17 bằng RFLP và giải trình tự: 20 µl sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit (Omega-biotek). Để xác định kiểu gen *2 và *3, sản phẩm PCR tinh sạch được cắt lần lượt bằng enzyme của Thermo Scientific là *SmaI* và *FastDigest BamHI*. Để phản ứng cắt diễn ra hoàn toàn, chúng tôi tiến hành tối ưu xác định nồng độ DNA và enzyme tham gia phản ứng cũng như thời gian ủ. Sản phẩm cắt sau đó sẽ được điện di trên gel agarose 1,5% để xác định sự có mặt/ không có mặt của các allen đột biến *2 và *3. Cả 3 allen *2, *3 và *17 đều có

thể xác định thông qua giải trình tự sử dụng máy phân tích phân đoạn DNA tự động 3500 (Applied Biosystems) và kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems). Tần số các allen sẽ được tính toán và so sánh với tần số lý thuyết theo định luật Hardy-Weinberg sử dụng chi-square test.

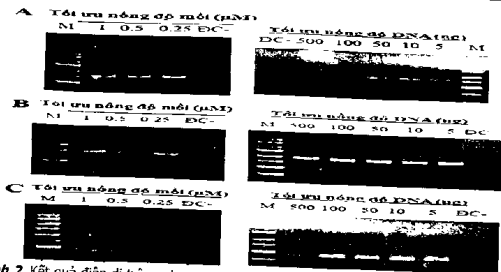
III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Tách chiết DNA tổng số và nhân dòng gen các allen CYP2C19*2, *3 và *17 bằng PCR: 120 mẫu máu được tách chiết DNA với nồng độ thu được từ 120 - 835 ng/µl và nhân dòng thành công 3 vùng gen chứa allen với quy trình PCR đã tối ưu.

Như kết quả điện di trình bày ở hình 1, vùng nhiệt độ gắn mỗi cho allen *2, *3 và *17 lần lượt là 53-64°C, 61-68°C và 59-70°C. Với allen *3 và *17, nhiệt độ gắn mỗi càng cao càng làm giảm sự xuất hiện của băng không đặc hiệu. Chúng tôi chọn nhiệt độ gắn mỗi cho *2 và *17 là 59°C, nhiệt độ gắn mỗi cho *3 là 68°C và tiếp tục khảo sát điều kiện tối ưu về thành phần phản ứng PCR.



Hình 1. Kết quả điện di trên gel agarose 1.5% của thí nghiệm PCR tối ưu nhiệt độ gắn mỗi nhân dòng allen CYP2C19*2 (hình A), *3 (hình B) và *17 (hình C). Làn M: 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific). Làn DC (-): đối chứng âm. Làn DC (+): đối chứng dương.



Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose 1.5% của thí nghiệm PCR tối ưu nồng độ môi và nồng độ DNA nhân dòng allen *CYP2C19*2* (hình A), **3* (hình B) và **17* (hình C). Làn M: O'GeneRuler Express DNA ladder (Thermo Scientific). Làn DC (-): đối chứng âm.

Như kết quả điện di trình bày ở hình 2, nồng độ tối ưu của các thành phần trong phản ứng PCR là: 0.2 mM dNTP mix, 0,02 u/µl Q5 High-Fidelity DNA polymerase, 0.25 µM mỗi. Nồng độ DNA sử dụng cho phản ứng PCR nhân dòng allen **2* có thể dao động từ 5-100 ng/µl, allen **3* và **17* là 5-500 ng/µl. Dựa vào kích thước của marker, chúng tôi nhận thấy đã nhân dòng được allen **2*, **3* và **17* với kích thước phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết ban đầu.

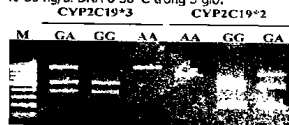
Xác định kiểu gen *CYP2C19*2*, **3* bằng RFLP và **17* bằng giải trình tự: Giải trình tự

vẫn là tiêu chuẩn vàng để xác định các đột biến điểm. Kết quả giải trình tự cho 3 SNP được trình bày trong hình 3. Tuy nhiên, phương pháp giải trình tự đòi hỏi chi phí cao, thời gian thực hiện lâu. Chính vì vậy, ngoài giải trình tự, chúng tôi xác định kiểu gen của allen **2* và **3* bằng kỹ thuật RFLP vì 2 allen đột biến này đều làm mất trình tự nhận biết của enzym cắt tương ứng là *SmaI* và *FastDigest BamHI* (hình 4); còn **17* không có vị trí cắt cho enzym giới hạn nên chúng tôi chỉ sử dụng phương pháp giải trình tự.

Kết quả giải trình tự allele *2		Kết quả giải trình tự allele *3		Kết quả giải trình tự allele *17	
Hình trình tự	Kiểu gen	Hình trình tự	Kiểu gen	Hình trình tự	Kiểu gen
	GG		GG		CC
	GA		GA		CT
	AA		AA	Chưa xuất hiện trong 120 mẫu phân tích	TT

Hình 3. Kết quả giải trình tự của allen *CYP2C19*2*, **3*, **17*. Các kiểu gen của allen **2* và **3* (Đồng hợp tử kiểu dại GG, Dị hợp tử GA, Đồng hợp tử đột biến AA); **17* (Đồng hợp tử kiểu dại CC, Dị hợp tử CT và Đồng hợp tử đột biến TT).

Bằng phương pháp RFLP, ở vị trí xảy ra đột biến hình thành allen *2, kiểu gen đồng hợp đột biến AA điện di cho 1 băng duy nhất kích thước 719 bp, kiểu gen GG điện di cho 2 băng có kích thước: 526 bp và 193 bp và kiểu gen GA điện di cho 3 băng có kích thước: 719, 526 và 193 bp. Điều kiện tối ưu cho phản ứng cắt sản phẩm PCR nhân dòng allen *2 bằng *SmaI* là: 1u enzym cắt 40-50 ng/ul DNA ở 30°C trong 3 giờ.



Bảng 2. Kiểu gen và tần số allen CYP2C19

Allen	Số lượng kiểu gen			Tần số allen		
	GG	GA	AA	G	A	p-value
<i>CYP2C19*2</i>	63	47	10	0.72	0.28	0.77
<i>CYP2C19*3</i>	106	13	1	0.94	0.06	0.41
	CC	CT	TT	C	T	p-value
<i>CYP2C19*17</i>	116	4	0	0.98	0.02	0.85

So sánh với kết quả giải trình tự, chúng tôi nhận thấy xác định kiểu gen bằng RFLP cho kết quả tương đương với kỹ thuật thao tác đơn giản, rẻ và nhanh hơn.

Kiểu gen và tần số allen *CYP2C19*2*, *3 và *17 được trình bày ở bảng 2. Kiểm định chi-square với nhóm mẫu nghiên cứu (N= 120) cho thấy tần số của các allen trên phân bố theo định luật Hardy-Weinberg, nhóm mẫu nghiên cứu có tính đại diện cho quần thể bệnh nhân hội chứng động mạch vành cấp người Việt Nam.

IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng được quy trình xác định các đa hình quan trọng của *CYP2C19* liên quan đến đáp ứng clopidogrel, áp dụng thành công quy trình này phân tích gen *CYP2C19*2*, *3, *17 trên nhóm bệnh nhân hội chứng động mạch vành cấp người Việt Nam.

Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Khoa Y Dược - Đại học Quốc gia Hà Nội cho đề tài mã số QG.15.32 để thực hiện nghiên cứu này.

Xin chân thành cảm ơn Viện tim mạch Việt Nam, Trung tâm tim mạch - Bệnh viện Đại học Y

Hình 4. Kết quả điện di trên gel agarose 1.5% sản phẩm cắt của allen *CYP2C19*2* và *3. Lane M: 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific).

Cùng phương pháp này, ở vị trí xảy ra đột biến hình thành allen *3, kiểu gen đồng hợp đột biến AA điện di cho 1 băng duy nhất kích thước 898 bp, kiểu gen GG điện di cho 2 băng có kích thước: 523 bp và 375 bp và kiểu gen GA điện di cho 3 băng có kích thước: 898, 523 và 375 bp. Điều kiện tối ưu cho phản ứng cắt sản phẩm PCR nhân dòng allen *3 bằng *FastDigest BamHI* là: 1u enzym cắt 40-50 ng/ul DNA ở 37°C trong 30 phút.

Hà Nội đã cung cấp các mẫu bệnh phẩm phục vụ cho nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wrighton SA, Stevens JC (1992). "The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism". *Crit Rev Toxicol*, 22:1-21.
2. Fahad I. A., Khalid M.A, Amal M. A., và cộng sự (2013), "CYP2C19 Genetic Polymorphism in Saudi Arabians", *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 112: 50-54
3. Mega J. L., Close S. L., Wiviott S. D., và các cộng sự. (2009), "Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel", *N Engl J Med*, 360(4): 354-62.
4. Price M. J., Murray S. S., Angiolillo D. J., và các cộng sự. (2012), "Influence of genetic polymorphisms on the effect of high- and standard-dose clopidogrel after percutaneous coronary intervention: the GIFT (Genotype Information and Functional Testing) study", *J Am Coll Cardiol*, 59(22): 1928-37.
5. Holmes M. V., Perel P., Shah T., và các cộng sự. (2011), "CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis", *Jama*, 305(24): 2704-14.
6. S. A., Sangkuhi K., Stein C. M. và cộng sự. (2013), "Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update", *Clin Pharmacol Ther*, 94(3): 317-23.