

PHÂN TÍCH LẶP THAY ĐỔI GEN AR Ở BỆNH NHÂN MẮC HỘI CHỨNG KHÔNG NHẠY CẢM VỚI ANDROGEN

Trần Đình Anh Tuấn¹, Vũ Chí Dũng², Lương Thị Lan Anh¹,
Nguyễn Thị Minh Ngọc¹, Hoàng Thu Lan¹,
Nguyễn Hữu Đức Anh¹, Trần Đức Phần¹

TÓM TẮT

Hội chứng không nhạy cảm với androgen là một trong những rối loạn phổ biến nhất trong các bệnh rối loạn phát triển giới tính. Xét nghiệm gen AR là phương pháp xác định chính xác nguyên nhân gây hội chứng không nhạy cảm với androgen. **Mục tiêu:** Trình bày về đặc điểm lâm sàng, công thức nhiễm sắc thể và số lần lặp CAG gen AR của bệnh nhân mắc hội chứng kháng androgen. **Phương pháp:** chúng tôi sử dụng phương pháp giải trình tự gen trực tiếp (Sanger sequencing) để xác định đột biến gen AR trên 01 bệnh nhân mắc hội chứng không nhạy cảm với androgen. **Kết quả:** Phát hiện lặp CAG 33 lần trên gene AR, bệnh nhân có kiểu hình nữ, karyotype 46,XY, có gen SRY, không có mất đoạn nhỏ trên nhiễm sắc thể Y. Kết quả này giúp gia đình định hướng giới tính cho bệnh nhân và là cơ sở cho chẩn đoán trước sinh ở lần sinh sau cho gia đình bệnh nhân.

Từ khoá: Hội chứng kháng androgen, Gen AR, lưỡng giới

SUMMARY

ANALYSIS THE REPEAT CHANGES OF AR GENE IN PATIENTS WITH ANDROGEN INSENSITIVITY SYNDROME

Androgen insensitivity syndrome is one of the most common disorders of sexual development. The AR gene test is an accurate method of determining the cause of androgen insensitivity syndrome.

Objectives: To present the clinical characteristics, chromosomal formula and sequencing AR gene of patients with antiandrogen syndrome. **Methods:** We used Sanger sequencing to identify AR gene mutations in 14 patient with androgen insensitivity syndrome.

Results: With the application of AR gene sequencing method in androgen insensitive patients, we detected more than times CAG repeats on the AR gene in 5/14 patients with female phenotype, karyotype 46,XY, having SRY gene. , 2 cases have karyotyp 46,XX but have testicular differentiation gene ZFY, 3/14 patients have point mutation in AR gene. This result helps the family to orient the patient's sex and is the basis for prenatal diagnosis in the next birth for the patient's family.

Keywords: Androgen Insensitivity Syndrome, AR gene, bisexual.

¹Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Nhi Trung ương

Chịu trách nhiệm chính: Trần Đức Phần

Email: tranducphan@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 2.01.2023

Ngày phản biện khoa học: 20.2.2023

Ngày duyệt bài: 3.3.2023

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng không nhạy cảm với androgen (AIS - Androgen Insensitivity Syndrome) hay còn gọi là hội chứng không nhạy cảm androgen, là một trong các rối loạn phát triển giới tính ở nam giới. Cơ thể có bộ nhiễm sắc thể là 46,XY của người nam nhưng kiểu hình bên ngoài là nữ, cơ quan sinh dục ngoài là nữ hoặc mơ hồ giới tính, nguyên nhân do cơ thể thiếu hụt về thụ thể tiếp nhận hormone androgen của người nam. Có hai thể: hội chứng kháng androgen hoàn toàn (CAIS - complete androgen insensitivity syndrome) và hội chứng kháng androgen không hoàn toàn (PAIS - partial androgen insensitivity syndrome).

AIS biểu hiện dưới 3 kiểu hình theo mức độ nữ hóa của cơ quan sinh dục ngoài: Kháng androgen hoàn toàn (complete androgen insensitivity syndrome - CAIS), kháng androgen một phần (partially androgen insensitivity syndrome - PAIS) và thể kháng nhẹ (mild androgen insensitivity syndrome - MAIS). AIS có liên quan đến các đột biến trên gen AR - gen mã hóa thụ thể androgen. Đột biến trên gen AR dẫn đến mất hoàn toàn hoặc một phần thụ thể androgen khiến androgen không được tiếp nhận hoặc không phát huy được tác dụng trên các cơ quan đích, khiến các cơ quan này biệt hóa theo hướng nữ dưới sự tác động của estrogen. Kết quả là dù vẫn có tinh hoàn, tinh hoàn vẫn sản xuất androgen bình thường nhưng kiểu hình của bệnh nhân vẫn biểu hiện theo hướng nữ giới [1]. Công thức nhiễm sắc thể (Karyotype) cần được xác định là 46,XY để phân biệt AIS với các loại rối loạn phát triển giới tính khác.

Gen AR nằm trên nhánh dài NST giới tính X (Xq11-12), có khoảng 800 đột biến trên gen AR được ghi nhận là nguyên nhân gây AIS. AIS di truyền theo quy luật lặn liên kết NST giới tính X [2].

Tùy theo chủng tộc, độ dài lặp CAG có khác nhau [5, 8], với số lần lặp lại trung bình ngắn hơn ở người châu Phi, lặp lại dài hơn ở người châu Á và độ dài trung bình ở người da trắng. Sự mở rộng bất thường của độ dài lặp lại CAG (>40CAG) dẫn đến bệnh thần kinh cơ Bệnh teo cơ tủy và hành tủy (SBMA) còn được gọi là bệnh Kennedy, đi kèm với các dấu hiệu của chứng

giảm nội tiết tố nam như chứng vú to ở nam giới, vô sinh và nồng độ LH, FSH và estradiol trong huyết tương cao [5]. Mức độ nghiêm trọng của các đặc điểm lâm sàng của bệnh có mối tương quan nghịch với việc tăng các lần lặp lại CAG [6]. Những phát hiện này, cùng với một số nghiên cứu in vitro [3, 5, 7], đã ủng hộ giả thuyết về mối tương quan nghịch giữa hoạt động phiên mã gen AR và độ dài lặp lại CAG [3, 5, 7, 8].

Nhìn chung, các tác giả nhận thấy việc tăng đoạn lặp CAG của gen AR có liên quan đến tính giảm nhạy cảm với androgen, có thể là nguyên nhân gây phát triển giới không bình thường, đặc biệt ở nam giới [3, 5]. Việc phát hiện bất thường trên gen AR ở những bệnh nhân có biểu hiện phát triển giới tính giúp chúng ta có hướng cho việc xử trí thích hợp cho bệnh nhân, nó còn là cơ sở cho việc tư vấn di truyền phòng tránh việc sinh ra các con có bất thường giới tính tiếp theo. Tuy nhiên ở Việt Nam còn rất ít nghiên cứu về đột biến gen AR ở người có bất thường phát triển giới. Với thực tế trên, mục tiêu báo cáo này của chúng tôi là: *Trình bày về đặc điểm lâm sàng, công thức nhiễm sắc thể và số lần lặp CAG gen AR của bệnh nhân mắc hội chứng kháng androgen.*

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. 14 bệnh nhân có biểu hiện suy sinh dục đến khám và xét nghiệm tại Trung tâm Di truyền lâm sàng và hệ gen Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu. Các bệnh nhân được chỉ định xét nghiệm lập công thức nhiễm sắc thể, xét nghiệm gen SRY (yếu tố biệt hóa tinh hoàn - TDF) và xét nghiệm giải trình tự gen AR cho bệnh nhân với các bước:

- Chiết tách DNA từ máu ngoại vi bằng kit tách DNA QiaAmp DNA blood mini kit (Qiagen - Đức).
- Phản ứng PCR khuếch đại 8 exon của gen AR gồm các thành phần và chu trình luân nhiệt như sau:

Thành phần	Khuếch đại exon 1	Khuếch đại exon 2 – 8
	Thể tích (µl)	Thể tích (µl)
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher - Mỹ)	10	10
Primer	1,5	1,5
Nuclease-Free Water (Hyclone - Mỹ)	7	7,5

DNA	1	1
DMSO	0,5	
Chu trình luân nhiệt	95°C: 2 phút, [95°C: 15 giây, 60°C: 30 giây, 68°C: 90 giây] x 40 chu kỳ, 68°C: 5 phút	95°C: 2 phút, [95°C: 15 giây, 58°C: 30 giây, 68°C: 30 giây] x 40 chu kỳ, 68°C: 2 phút

- Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng cột lọc MultiScreen (Merck Millipore - Ireland).

- Giải trình tự gen: Giải trình tự 8 exon trên máy Genetic Analyser 3500 (ABI). Trình tự gen được phân tích bằng phần mềm BioEdit.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khám lâm sàng và xét nghiệm

Bảng 3.1. Đặc điểm nhiễm sắc thể và gen TDF của các bệnh nhân có rối loạn phát triển giới (n=14)

Giới	Số lượng	Nhiễm sắc thể	Gen TDF
Nam	4	46,XY	+
Nữ	8	46,XY	+
	2	46,XX	+

Kết quả ở bảng 3.1 cho thấy:

- Với các bệnh nhân được xác định là nam nhưng có biểu hiện nữ tính như ngực phát triển, cơ quan sinh dục ngoài ít nhiều có xu hướng nữ công thức nhiễm sắc thể đều là 46,XY và có gen biệt hóa tinh hoàn TDF (ZFY).

- Với các bệnh nhân được xác định là nữ nhưng có biểu hiện rối loạn phát triển giới như, cơ quan sinh dục ngoài ít nhiều có xu hướng nam, vô kinh nguyên phát, ngực không phát triển, công thức nhiễm sắc thể chủ yếu là 46,XY (8/10), có 2 bệnh nhân có karyotyp là 46,XX những có biểu hiện đảo ngược giới, xét nghiệm gen vẫn thấy có gen biệt hóa tinh hoàn TDF (ZFY).

Bảng 3.2. Các dạng biến đổi gen AR ở bệnh nhân có rối loạn phát triển giới (n=14)

TT	Loại biến đổi	n	Tỷ lệ
1	Bán hợp tử đột biến c.2246C>T trên exon 5	1	1/14
2	c.2197G>A (p.Asp733Asn) trên exon 5. NST 46,XX	1	1/14
3	Đồng hợp tử c.2599 G>A (p.V867M) trên exon 7, các exon còn lại không ĐB; NST: 46,XX, TDF: (-)	1	1/14
	Lặp CAG 30 -39 lần	4	4/14
	Không thấy biến đổi		7/14

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy, trong 14 bệnh nhân có rối loạn phát triển giới, 3 bệnh nhân

phát hiện thấy có đột biến điểm, 4 bệnh nhân phát hiện thấy có tăng lặp CAG trên exon 1 ở mức từ 30 - 39 lần. Đặc biệt đột biến c.2246C>T trên exon 5 (tại vị trí 2246, nucleotide C bị thay bằng T) là đột biến chưa được công bố.

Bảng 3.3. Đặc điểm nhiễm sắc thể và gen của các bệnh nhân có rối loạn phát triển giới (n=14)

Nhiễm sắc thể	Gen TDF	Số lượng	Gen AR	
Giới nam	+	4	Không thấy thay đổi	
Giới nữ				
46,XY	+	8	1	24 lặp trên exon1, trên exon 5: bản hợp tử ĐB c.2246C>T
			1	21 lặp CAG trên exon 1 gen AR, đồng hợp tử c.2599 G>A
			4	Lặp CAG > 30 lần
			2	Không thấy biến đổi trên gen AR
46,XX	+	2	1	31 lặp trên exon 1, đột biến c.2197G>A (p.Asp733Asn) trên exon 5
			1	26 lặp CAG trên exon 1

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy, với 4 bệnh nhân được đặt tên là nam giới chưa phát hiện thấy thay đổi ở gen AR. Với các bệnh nhân được đặt tên là nữ, có 8 bệnh nhân karyotyp 46,XY, trong 8 bệnh nhân này 2/8 phát hiện thấy đột biến điểm, 4/8 phát hiện thấy độ lặp CAG ở exon 1 của gen AR nhiều hơn 30 lần. 2/8 bệnh nhân được gọi tên là nữ có karyotyp 46,XX nhưng vẫn có gen biệt hóa tinh hoàn SRY; một trong 2 bệnh nhân này phát hiện thấy có đột biến ở exon 5 và có độ lặp CAG trên exon 1 là 31 lần.

IV. BÀN LUẬN

Rối loạn phát triển giới tính (DSD) ở người có karyotypy 46,XY có thể được chia thành 3 nhóm chính: (1) rối loạn phát triển tuyến sinh dục, (2) rối loạn tổng hợp testosterone và (3) rối loạn chuyển hóa hoặc hoạt động của testosterone. Trong phân loại này, AIS là một rối loạn di truyền hiếm gặp, do sự kháng hoạt động của nội tiết tố androgen dẫn đến kiểu hình nữ [2]. Có sự tương tự về mặt biểu hiện lâm sàng giữa AIS và một số bệnh rối loạn phát triển giới tính khác như: thiếu hụt enzyme 5 - α reductase hay thiếu hụt hormon AMH... dẫn đến khó khăn trong chẩn đoán lâm sàng. Chính vì vậy, cần có sự kết hợp giữa các phương pháp phân tích lâm sàng, chẩn đoán hình ảnh và di truyền để chẩn đoán bệnh.

Trong 14 bệnh nhân có rối loạn phát triển

giới tính, hầu hết các bệnh nhân có biểu hiện nữ hóa ở mức độ nhiều hay ít mặc dù được gọi tên là nữ giới (10/14 bệnh nhân được đặt tên là nữ giới), tuy nhiên hầu hết các bệnh nhân này đều có karyotyp là 46,XY, có gen biệt hóa tinh hoàn ZFY. 2 bệnh nhân có nhiễm sắc thể là 46,XX nhưng vẫn có gen biệt hóa tinh hoàn, chúng tôi nghĩ có thể đã có chuyển đoạn nhiễm sắc thể Y sang một nhiễm sắc thể nào đó.

Trong các loại đột biến trên gen AR, chúng tôi thấy phần lớn là tăng lặp CAG trên exon 1, có 3 đột biến điểm. Tỷ lệ phát hiện biến đổi gen AR là 7/14. 8/7 bệnh nhân có rối loạn phát triển giới tính còn lại không phát hiện thấy bất thường trên gen AR chúng tôi nghĩ là do bất thường phát triển giới tính còn do nhiều gen khác chi phối.

Gen AR nằm trên nhánh dài NST X (Xq11-12), bao gồm 8 exon và 7 intron, chứa khoảng 919 axit amin. AR là một yếu tố phiên mã phụ thuộc phổi tử, gồm 4 miền chức năng: miền N-terminal (NTD) được mã hóa bởi exon 1 - là vùng không được bảo tồn tham gia vào quá trình phiên mã kích hoạt các gen mục tiêu [3]; miền liên kết DNA trung tâm (DBD) được mã hóa bởi exon 2 và 3, có chứa cấu trúc ngón tay kẽm; miền bản lề - exon 4 và miền liên kết phổi tử C-terminal (LBD) được mã hóa bởi exon 5 - exon 8. Các đột biến trên gen AR là nguyên nhân của hội chứng AIS, các đột biến này có thể phân bố khác nhau trong suốt trình tự gen [3, 4]. Cho đến nay, hơn 800 đột biến gen AR khác nhau đã được báo cáo và hầu hết các đột biến sẽ làm cho cấu trúc tinh thể thay đổi và khiến protein AR mất chức năng hoàn toàn [3]. Việc xác định được đột biến gen AR giúp chẩn đoán và tiên lượng cho các bệnh nhân AIS, góp phần vào quyết định lựa chọn giới tính cho bệnh nhân và tư vấn di truyền cho các phụ nữ mang gen bệnh.

Một số nghiên cứu cho thấy mối liên quan của biến thể AR-CAG với nguy cơ vô sinh nam. Một trong những vùng nguy hiểm trên exon 1 của gen AR của người mã hóa dự lượng glutamine giống hệt nhau với sự biến đổi chiều dài đa hình (Grigороva và cộng sự, 2017) [6]. Những thay đổi trong cấu trúc của thụ thể androgen với nhiều dư lượng glutamine, như trong hội chứng Kennedy, dẫn đến sự kết tụ của protein không hòa tan. Mặc dù tính đa hình lặp lại của CAG trong phạm vi bình thường không thể ảnh hưởng đến ái lực của androgen với AR, có mối liên hệ nghịch giữa độ dài của đoạn lặp và khả năng truyền tải AR (Buchanan và cộng sự, 2004) [7]. Lặp CAG ở exon 1 gen AR thường là 10 - 30 lần, lặp trên 30 lần là có thể gây bệnh

[5]. Tuy nhiên một số tác giả cho lặp trên 40 lần là chắc chắn mắc bệnh [3].

Ngoài ra, vai trò của AR-CAG lặp lại trong một số bệnh đã được đánh giá trong một nghiên cứu, đề xuất ba cơ chế bệnh sinh, như sau: 1- mất chức năng của protein; 2- tăng chức năng của protein, và 3- tăng chức năng của RNA chứa CUG lặp lại (La Spada và Taylor, 2010) [8].

5/14 bệnh nhân của chúng tôi có độ lặp CAG trên exon 1 của gen AR là > 30 lần. Các biểu hiện về thần kinh như chuột rút, co giật, run rẩy, tê, mất cảm giác là không rõ, tuy nhiên các triệu chứng liên quan đến bất thường phát triển giới lại khá rõ ràng với biểu hiện nữ hóa ở các mức độ khác nhau kèm theo tinh hoàn ẩn, teo tinh hoàn.

V. KẾT LUẬN

Với việc áp dụng phương pháp giải trình tự gen AR ở bệnh nhân không nhạy cảm androgen, chúng tôi đã phát hiện lặp CAG hơn lần trên gene AR ở 5/14 bệnh nhân có kiểu hình nữ, karyotype 46,XY, có gen SRY, 2 trường hợp có karyotyp 46,XX nhưng có gen biệt hóa tinh hoàn ZFY, 3/14 bệnh nhân có đột biến điểm ở gen AR. Kết quả này giúp gia đình định hướng giới tính cho bệnh nhân và là cơ sở cho chẩn đoán trước sinh ở lần sinh sau cho gia đình bệnh nhân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gulía C, Baldassarra S., Zangari A et al

- (2018). Androgen insensitivity syndrome. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 22: 3873-3887.
2. **Nurin Aisyiyah Listyasari et al** (2019). Genetic Analysis Reveals Complete Androgen Insensitivity Syndrome in Female Children Surgically Treated for Inguinal Hernia. Journal of Investigative Surgery, 23:1-7.
 3. **Gottlieb B, Beitel LK, Wu JH, Trifiro M** (2004). The androgen receptor gene mutations database (ARDB): update. Human Mutation, 23:527-533.
 4. **Skjærpe PA, Lundberg Giwercman Y, Giwercman A, Svartberg J.** Androgen receptor gene polymorphism and the metabolic syndrome in 60-80 years old Norwegian men. International Journal of Andrology (2010) 33:500-506.
 5. **Nenonen H, Björk C, Skjærpe PA, Giwercman A, Rylander L, Svartberg J, Lundberg Giwercman Y.** CAG repeat number is not inversely associated with androgen receptor activity in vitro. Molecular Human Reproduction (2010) 16:153-157.
 6. **Grigorova M, Punab M, Kahre T, et al.** The number of CAG and GGN triplet repeats in the Androgen Receptor gene exert combinatorial effect on hormonal and sperm parameters in young men. Andrology. 2017;5(3):495-504.
 7. **Buchanan G, Yang M, Cheong A, et al.** Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. Human Molecular Genetics. 2004; 13(16):1677-1692. doi:10.1093/hmg/ddh181
 8. **La Spada AR, Taylor JP.** Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. Nat Rev Genet. 2010;11(4):247-258.

KHẢO SÁT THỰC TRẠNG SỬ DỤNG ĐÊ CAO SU TRÊN LÂM SÀNG CỦA BÁC SĨ RĂNG HÀM MẶT TỐT NGHIỆP ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

Nguyễn Hà Oanh¹, Nguyễn Cảnh Đức¹, Hà Minh Phương¹,
Nguyễn Đức Thăng¹, Nguyễn Hà Thu¹, Trần Thị Mỹ Hạnh¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu mô tả cắt ngang thực hiện trực tuyến nhằm mô tả thực trạng sử dụng đê cao su trong thực hành lâm sàng của các bác sĩ Răng Hàm Mặt tốt nghiệp từ năm 2017 đến năm 2020 của trường Đại học Y Hà Nội và giải thích các yếu tố ảnh hưởng đến tần suất sử dụng đê cao su. Đồng thời nhận xét mối tương quan giữa năm tốt nghiệp - sự đổi mới chương trình giáo dục và kiến thức, thái độ, hành vi đối với đê cao su của các bác sĩ. Kết quả nghiên cứu cho thấy: 75.7% bác sĩ đã từng sử dụng đê cao su, nhưng chỉ

có 13% các bác sĩ luôn luôn sử dụng trong điều trị. Tỷ lệ sử dụng đê tăng theo năm tốt nghiệp, cao nhất là năm 2020 với 79.5%. Đa số người được hỏi (89,9%) xác nhận rằng nguồn thông tin về đê cao su là từ chương trình giảng dạy đại học, tỷ lệ này tăng theo năm tốt nghiệp (p <0,05). Tuy nhiên chỉ có 39,9% các bác sĩ cảm thấy hài lòng với những gì được dạy.

Từ khóa: đê cao su, đổi mới giáo dục, bác sĩ Răng Hàm Mặt, tốt nghiệp, lâm sàng

SUMMARY

SITUATION OF RUBBER DAM USAGE AMONG DENTAL PRACTITIONERS GRADUATED FROM HANOI MEDICAL UNIVERSITY - AN ONLINE SURVEY

The cross-sectional survey aims to investigate the frequency of rubber dam (RD) usage as well as the factors that influence it in clinical practice among

¹Viện Đào tạo Răng Hàm Mặt, Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hà Oanh

Email: nguyenhaoanh22.dsc@gmail.com

Ngày nhận bài: 3.01.2023

Ngày phản biện khoa học: 21.2.2023

Ngày duyệt bài: 7.3.2023