

Xây dựng kỹ thuật xác định tính đa hình của gen *MTHFR* ứng dụng trong tiên lượng tình trạng sảy thai liên tiếp

Developing and applying novel assay for detecting *MTHFR* polymorphisms for women with recurrent pregnancy loss

Phan Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Tĩnh,
Trần Thị Huyền Trang, Phan Quốc Hoàn

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phát triển phương pháp xét nghiệm nhanh và chính xác các đa hình tại 2 điểm 677 và 1298 của gen *MTHFR* bằng phương pháp realtime PCR và bước đầu đánh giá giá trị của xét nghiệm đa hình kiểu gen trong chẩn đoán và định hướng điều trị sảy thai liên tiếp. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu mô tả theo dõi dọc. Phương pháp xét nghiệm realtime PCR được xây dựng và tối ưu, sau đó được đánh giá so sánh với phương pháp sử dụng bộ kit thương mại CVD StripAssay® T (ViennaLab). 200 mẫu người bình thường được thu thập để xác định tỷ lệ kiểu gen của quần thể và 48 mẫu bệnh nhân có tiền sử sảy thai liên tục được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của đa hình tại 2 điểm 677 và 1298 của gen *MTHFR*. **Kết quả và kết luận:** Nghiên cứu cho thấy phương pháp realtime PCR được phát triển có khả năng xác định chính xác các đa hình của gen *MTHFR* với nồng độ DNA mẫu thấp (2-5ng/μL) với ưu điểm nhanh và hạn chế tín hiệu nhiễu. Nghiên cứu cũng đưa ra mô hình kiểu gen *MTHFR* với 2 điểm đột biến 677 và 1298 ở quần thể người Việt Nam. Đồng thời cho thấy có một mối tương quan giữa tỷ lệ kiểu gen dị hợp tử cao với tình trạng bệnh lý sảy thai liên tục ở nữ giới. Từ đó cho thấy việc xác định kiểu gen *MTHFR* là một marker tiềm năng để xác định nguyên nhân vô sinh ở nữ giới, dự đoán tình trạng sảy thai cũng như đưa ra phương pháp điều trị thích hợp.

Từ khóa: Sảy thai tái diễn, đa hình *MTHFR*, tỷ lệ kiểu gen.

Summary

Objective: To develop a fast and accurate testing method for polymorphisms at 2 points of *MTHFR* gene (677 and 1298) by realtime PCR method and initially evaluate the value of the genotype polymorphism test in diagnosis, predict and guide treatment for recurrent pregnancy loss. **Subject and method:** Descriptive study of vertical track. The realtime PCR assay method is formulated and optimized, then evaluated against using the commercial kit CVD StripAssay® T (ViennaLab). 200 samples were collected from normal people to determine the genotype rate of the population and 48 samples from patients with a history of recurrent pregnancy loss were used to evaluate the effect of polymorphism of *MTHFR* gene at 2 points 677 and 1298. **Result and conclusion:** Realtime PCR method was developed capable of accurately identifying polymorphisms of the *MTHFR* gene with low sample DNA concentration (2 - 5ng/μL) with the advantage of a fast and limited interference signal. The study also showed the *MTHFR* genotype model with 2 mutation points 677 and 1298 in the Vietnamese population. It also shows a significant correlation between the high

Ngày nhận bài: 25/11/2020, ngày chấp nhận đăng: 18/4/2021

Người phản hồi: Trần Thị Huyền Trang, Email: huyentrang110@yahoo.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

rate of heterozygous genotypes with women have recurrent pregnancy loss (RPL). This proposes that MTHFR genotype identification is a potential marker to identify the cause of female infertility, predict the state of miscarriage as well as propose appropriate treatment.

Keywords: Recurrent pregnancy loss, MTHFR polymorphisms, genotype rate.

1. Đặt vấn đề

Sảy thai là tình trạng mất thai diễn ra trước tuần thứ 20. Sảy thai tự nhiên là một hiện tượng rất phổ biến với khoảng 15% các trường hợp mang thai được ghi nhận lâm sàng có kết quả là sảy thai. Sảy thai liên tiếp (RPL) được định nghĩa là 3 lần sảy thai liên tiếp trước tuần thứ 20 kể từ kỳ kinh nguyệt cuối cùng với 1 người chồng hoặc 1 đối tác. Sảy liên tiếp là một bệnh lý sản khoa thường gặp, và ước tính khoảng 2 - 5% phụ nữ trong độ tuổi sinh sản mắc bệnh. Nguyên nhân chính xác của sảy thai liên tiếp vẫn chưa được xác định rõ ràng. Đây là một rối loạn bệnh lý đa yếu tố như: Các rối loạn về di truyền, rối loạn về chức năng nội tiết, các bệnh lý tử cung, bệnh tự miễn, cũng như các yếu tố môi trường... Tuy nhiên, các yếu tố di truyền liên quan đến huyết khối tĩnh mạch, và sự gia tăng tổng mức homocysteine (hyperhomocysteinemia) đã được mô tả là đóng một vai trò trong bệnh sinh của sảy thai liên tiếp.

Cùng với sự phát triển của lĩnh vực sinh học phân tử trong những năm gần đây, các nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu các cơ chế dẫn đến tình trạng RPL thông qua sự biểu hiện (đột biến/đa hình) của các gen liên quan. Một trong những giả thuyết được nhiều người quan tâm là sự tăng hình thành huyết khối trong hệ thống mạch máu tử cung - nhau thai dẫn đến gián đoạn cung cấp máu cho thai làm sảy thai hoặc thai chết lưu mà nguyên nhân là do sự giảm hoạt tính enzyme MTHFR [6].

MTHFR là viết tắt của cụm từ Methylene - tetrahydrofolate reductase là một loại enzyme đóng vai trò trung tâm trong quá trình chuyển hóa folate và homocysteine thông qua việc xúc tác cho phản ứng biến 5, 10 - methylenetetrahydrofolate thành 5 - methylenetetrahydrofolate. Kết quả của phản ứng này tạo thành dạng tuần hoàn chính của folate và được sử dụng trong quá trình tái methyl hóa homocysteine thành methionine [7, 8].

Gen *MTHFR* là gen mã hóa cho enzyme MTHFR nằm ở vị trí 36.22 trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể 1 (bp 11,785,723 đến 11,806,103 trên nhiễm sắc thể 1) [7]. Tương tự như tất cả các gen trong cơ thể, gen MTHFR có thể khác nhau giữa các cá thể ở một số vị trí, sự khác nhau đó được gọi là tính đa hình của gen. Đa phần những khác biệt này không gây ra hậu quả gì, tuy nhiên một số biến đổi có thể gây ra hậu quả nghiêm trọng đối với sức khỏe của người mang gen đa hình đó. Đối với gen *MTHFR* hiện có đến hơn 40 đột biến điểm (đột biến làm thay đổi 1 nucleic acid này bằng 1 nucleic acid khác) làm thay đổi cấu trúc chức năng của protein MTHFR. Phần lớn những đột biến đó làm thay đổi 1 amino acid của methylenetetrahydrofolate reductase làm ảnh hưởng đến chức năng của enzyme, một số thậm chí còn khiến enzyme này bị bất hoạt. Một số đột biến khác dẫn đến việc hình thành các enzyme nhỏ và không có chức năng. Sự mất chức năng của protein MTHFR dẫn đến tình trạng homocystein niệu, một loại bệnh mà người bệnh không có khả năng chuyển hóa homocystein thành methionine. Những người bị bệnh này thường phát triển các bệnh về mắt, đông máu bất thường, các bất thường về xương và khó khăn trong học tập. Trong đó, phổ biến và được nghiên cứu nhiều nhất là 2 đa hình: C677T và A1298C. Các nghiên cứu đã cho thấy những người mang đa hình C677T có thể bị giảm đến 50% hoạt tính enzyme so với nhóm không mang đa hình. Những người mang đa hình A1298C chịu ảnh hưởng ít hơn khi đa hình này chỉ làm giảm khoảng 20 - 30% hoạt tính enzyme [7-9].

Đối với những phụ nữ mang thai, việc mang các đa hình làm giảm hoạt tính enzyme MTHFR có thể dẫn đến nhiều hậu quả nghiêm trọng. Đầu tiên, việc giảm hoạt tính enzyme dẫn đến sự gia tăng homocysteine huyết tương và homocystein niệu có thể dẫn đến tổn thương nội mô trong mạch máu. Điều này làm tăng nguy cơ hình thành huyết khối dẫn

đến tắc nghẽn mạch máu nhau thai dẫn đến sảy thai liên tiếp [10]. Ngoài ra, 5-methylenetetrahydrofolate - sản phẩm được tạo thành bởi enzyme MTHFR đóng vai trò vô cùng quan trọng trong quá trình phát triển ban đầu của phôi thai, do đó việc giảm hoạt tính enzyme dẫn đến nhiều hậu quả như: Sảy thai liên tiếp, ảnh hưởng đến quá trình hình thành hệ thần kinh của phôi thai [7, 10]. Do đó, ở nhiều nước trên thế giới, việc sàng lọc đa hình gen MTHFR được khuyến cáo thực hiện thường quy cho những phụ nữ có thai.

Hiện nay, ở Việt Nam một số bệnh viện đã áp dụng việc chẩn đoán đa hình gen *MTHFR* cho các thai phụ có tiền sử sảy thai tái diễn như Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, Bệnh viện Sản Trung ương, Bệnh viện Chợ Rẫy. Tuy nhiên các phương pháp hiện đang được áp dụng là phương pháp giải trình tự gen hoặc sử dụng bộ kit chẩn đoán CVD StripAssay® T (ViennaLab) là những phương pháp mất nhiều thời gian (> 8 giờ) và có chi phí tương đối cao.

Vì lý do trên, chúng tôi thực hiện đề tài "Xây dựng quy trình đánh giá tính đa hình của gen *MTHFR* ứng dụng trong tiên lượng tình trạng sảy thai liên tiếp" với mục tiêu: *Xây dựng quy trình xác định tính đa hình tại 2 điểm phổ biến nhất (677 và 1298) của gen MTHFR, Bước đầu xác định tần số*

allen của 2 đa hình gen MTHFR trong nhóm bệnh nhân STTP và người khỏe mạnh.

2. Đối tượng và phương pháp

Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp tiến cứu.

Bệnh phẩm được thu thập trên hai nhóm: (1) 200 người bình thường (100 nam, 100 nữ) trong độ tuổi sinh sản, (2) 49 bệnh nhân được ghi nhận bị sảy thai liên tục từ 2 lần trở lên và có kết quả xét nghiệm APS (Anti phospholipid syndrome) âm tính. Tất cả các mẫu máu tĩnh mạch ngoại vi được bảo quản đúng quy trình và được thực hiện xét nghiệm tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

Mẫu sau khi được chuyển về phòng xét nghiệm được tiến hành rửa hồng cầu bằng dung dịch RBC (Red Blood Cell Lysis) và lưu trữ ở 4°C đến khi tiến hành tách chiết DNA.

DNA được tách chiết bằng phương pháp Phenol/Chloroform.

Thiết kế mẫu và tối ưu quy trình realtime PCR

Các cặp mồi được thiết kế để bắt cặp đặc hiệu vào vùng gen *MTHFR* tại vị trí để xác định đa hình C677T và đa hình A1298C.

Trình tự mồi:

Tên mồi	Đặc điểm	Trình tự (5'- 3')
MTHFR 677	R	5' GGA AGA ATG TGT CAG CCT CAA AGA 3'
	F	5' TGA CCT GAA GCA CTT GAA GGA GAA 3'
	C Probe	5' /56- FAM/ ATG AAA TGG GCT CCC G/ 36- TAMsp/ 3'
	T Probe	5' / Cy5/ ATG AAA TCG ACT CCC G 3BHQ_2/ 3'
MTHFR 1298	R	5' TCT CCC GAG AGG TAA AGA ACA AA 3'
	F	5' GGA GGA GCT GCT GAA GAT GTG 3'
	A Probe	5' -/56- FAM/ AAA GAC ACT TTC TTC ACT G 36- TAMsp/ 3'
	C Probe	5' / 5Cy5/ AGA CAC TTG CTT CAC TG/ 3BHQ_2/ 3'

Thành phần phản ứng realtime PCR:

Thành phần	Nồng độ	677 cho 1 phản ứng	1298 cho 1 phản ứng
Mastermix Qiagen	2x	10µl	10µl
Primer R	10pM	1µl	1µl
Primer F	10pM	1µl	1µl
Probe FAM	0,5pM	C Probe 0,5µl	A Probe 0,5µl
Probe Cy5	0,5pM	T Probe 0,5µl	C Probe 0,5µl
H2O		2µl	2µl

DNA		5 μ l	5 μ l
Tổng phản ứng		20 μ l	20 μ l

Phản ứng realtime PCR được giữ nguyên nồng độ các thành phần phản ứng và được tối ưu nhiệt độ diễn ra phản ứng dựa trên nhiệt độ bắt cặp (T_m) của cặp mỗi căn cứ vào nhiệt độ nóng chảy của mỗi trên lý thuyết.

Sau khi xác định được chu trình nhiệt độ tối ưu, phương pháp xác định 2 đa hình C677T và A1298C bằng phản ứng realtime PCR được kiểm tra độ nhạy và độ chính xác bằng cách thực hiện song song trên cùng 1 mẫu với bộ kit thương mại CVD StripAssay® T (ViennaLab).

Xác định tần số allen của 2 đa hình gen MTHFR trong quần thể Việt Nam

Tần số allen của 2 đa hình C677T và A1298C được xác định bằng cách thực hiện phản ứng realtime PCR trên 200 mẫu thu nhận từ người bình

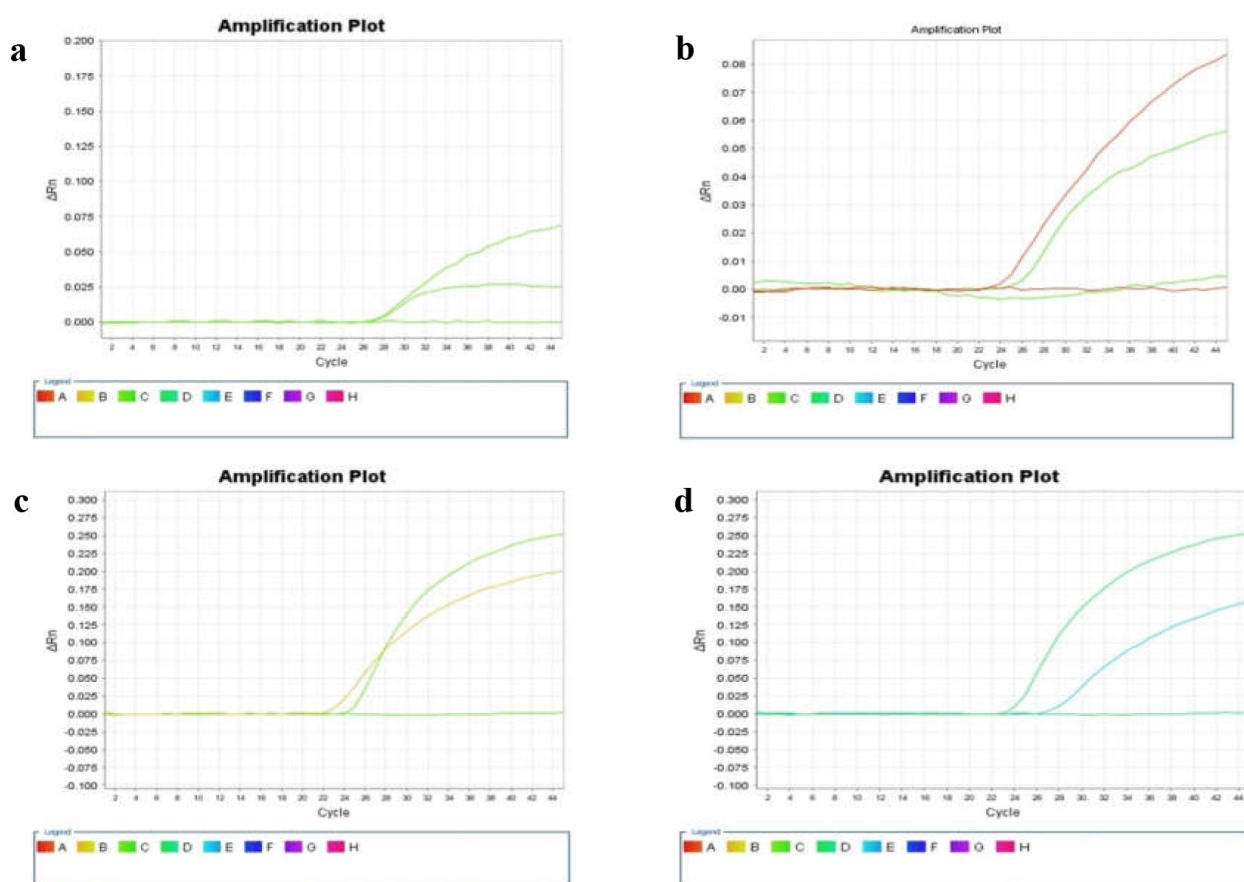
thường trong độ tuổi sinh sản (18 – 50). Số liệu sau đó được thu nhận và xử lý theo công thức để xác định tần số các allen trong quần thể.

So sánh sự khác biệt về tần suất xuất hiện của các đa hình gen MTHFR ở phụ nữ bình thường và người có tiền sử sảy thai liên tục.

Tần suất xuất hiện của các đa hình gen *MTHFR* được xác định trên nhóm 41 bệnh nhân nữ có tiền sử sảy thai liên tiếp từ 2 lần trở lên và được so sánh với nhóm 100 phụ nữ bình thường.

3. Kết quả

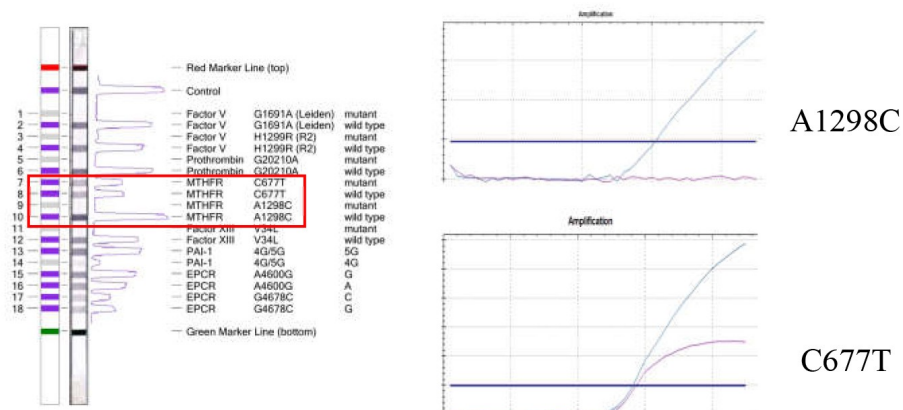
3.1. Tối ưu phản ứng realtime PCR xác định tính đa hình của gen MTHFR



Hình 1: Tín hiệu thu được khi thực hiện phản ứng realtime PCR xác định đa hình gen *MTHFR* ở các nhiệt độ (a): 56°C, (b): 58°C, (c): 60°C, (d): 62°C.

Nhận xét: Tín hiệu khuếch đại tối đa thu được ở khi sử dụng nhiệt độ bắt cặp là 60°C.

Phương pháp realtime PCR xác định 2 đa hình C677T và A1298C đã được tối ưu sau đó được thực hiện song song với bộ kit thương mại CVD StripAssay® T để kiểm tra độ chính xác và độ nhạy (Hình 2).



Hình 2. Kết quả thực hiện song song phương pháp realtime PCR (Phải) và bộ kit CVD StripAssay®T (Trái)

Nhận xét: Phương pháp realtime PCR cho kết quả tương tự với phương pháp sử dụng bộ kit thương mại với cùng chất lượng DNA đầu vào (nồng độ 2 - 5ng/μL).

3.2. Xác định tần số allele của 2 đa hình gen *MTHFR* trong quần thể Việt Nam

Bằng phương pháp realtime PCR thực hiện trên 200 mẫu (100 nam, 100 nữ) người khỏe mạnh, chúng tôi bước đầu xác định được tần suất xuất hiện của các đa hình gen *MTHFR* trên quần thể người Việt Nam.

Bảng 1. Tỷ lệ kiểu gen *MTHFR* của quần thể Việt Nam

Vị trí	Kiểu gen	Nam		Nữ		Chung	
		Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %
677	CC	59	59	62	62	121	60,5
	CT	36	36	33	33	69	34,5
	TT	5	5	5	5	10	5
1298	AA	54	54	47	47	101	50,5
	AC	35	35	45	45	80	40
	CC	11	11	8	8	19	9,5

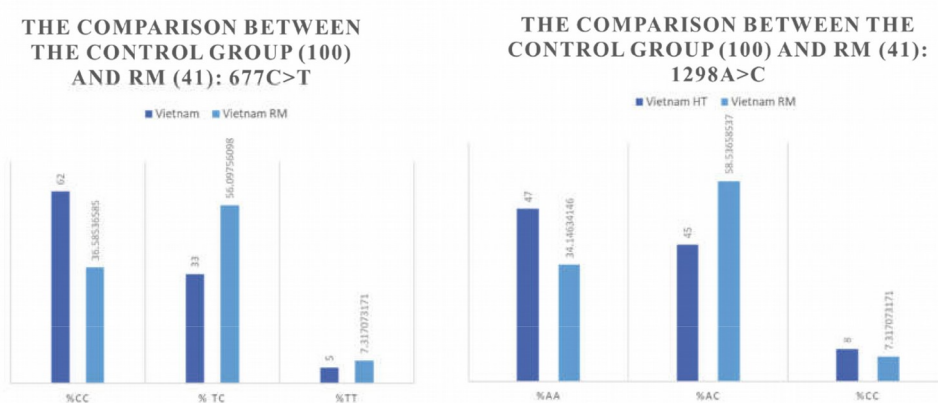


Hình 3. Tỷ lệ kiểu gen *MTHFR* ở một số địa phương trên thế giới và Việt Nam: (a) Vị trí 1298, (b) Vị trí 677 cho thấy có sự tương đồng về tỷ lệ kiểu gen giữa quần thể người Việt Nam và quần thể người ở phía Nam Trung Quốc

Nhận xét: Dữ liệu thu được cho thấy tỷ lệ kiểu gen đồng hợp tử đột biến (TT ở vị trí 677 và CC ở vị trí 1298) của gen *MTHFR* trong quần thể người Việt là tương đối thấp (lần lượt là 5% và 9,5%) đồng thời không có sự khác biệt đáng kể về sự phân bố kiểu gen giữa nam và nữ ($p > 0,05$) (Bảng 1). Dữ liệu thu được cũng cho thấy có sự tương đồng về tỷ lệ kiểu gen giữa quần thể người Việt Nam và quần thể người ở phía Nam Trung Quốc (Hình 3, 4).

3.3. So sánh sự khác biệt về tần suất xuất hiện của các đa hình gen *MTHFR* ở phụ nữ bình thường và người có tiền sử sảy thai liên tục.

Thực hiện phản ứng realtime PCR xác định sự đa hình của gen *MTHFR* ở nhóm gồm 41 bệnh nhân nữ có tiền sử sảy thai liên tục tối thiểu 2 lần và thực hiện so sánh với nhóm phụ nữ bình thường được khảo sát k^bên.



Hình 4. So sánh tỷ lệ kiểu gen *MTHFR* giữa nhóm bệnh nhân và nhóm đối chứng

Nhận xét: Có sự gia tăng rõ rệt về tỷ lệ kiểu gen dị hợp đối với cả 2 vị trí 677 và 1298 ở nhóm bệnh nhân so với nhóm đối chứng (lần lượt là 56,09% so với 33% và 58,54% so với 45%, $p < 0,05$) (Hình 4). Điều này cho thấy việc xác định tính đa hình của gen

MTHFR ở những phụ nữ có tiền sử sảy thai liên tục và kết quả APS âm tính là một xét nghiệm tiềm năng, cần được nghiên cứu kỹ lưỡng hơn.

4. Bàn luận

Sảy thai tái diễn (RPL) là tình trạng sảy thai từ 2 lần trở lên xảy ra trong vòng 20 tuần đầu tiên của thai kỳ và ảnh hưởng tới 1 - 3% các cặp vợ chồng. Các bất thường của nhiễm sắc thể, dị tật tử cung, bệnh huyết khối, các yếu tố miễn dịch học, nội tiết và chuyển hóa là những yếu tố nguy cơ đã được biết đến liên quan đến khoảng 50% các trường hợp sảy thai tái diễn [11]. Trong đó, yếu tố đa hình của gen *MTHFR* tại 2 điểm 677 và 1298 đã được nhiều nghiên cứu xác nhận là một yếu tố nguy cơ [12, 13]. Tuy nhiên các phương pháp xét nghiệm xác định đa hình gen *MTHFR* hiện được sử dụng ở Việt Nam (giải trình tự và sử dụng kit thương mại) có điểm yếu là tốn thời gian và có chi phí tương đối cao, làm giảm khả năng tiếp cận với xét nghiệm này của những bệnh nhân không có điều kiện về kinh tế. Phương pháp realtime PCR do chúng tôi phát triển đã giải quyết được 2 vấn đề này khi có thể cho kết quả trong thời gian 4 tiếng kể từ thời điểm nhận bệnh phẩm với nồng độ DNA đầu vào thấp (2 - 5ng/μL) và chi phí chỉ bằng ¼ so với các phương pháp hiện hành với độ chính xác cao (hoàn toàn trùng khớp với kết quả thực hiện xét nghiệm trên bộ kit thương mại và phương pháp giải trình tự). Đồng thời nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ kiểu gen ở nhóm phụ nữ có tiền sử sảy thai tái diễn so với nhóm đối chứng cho thấy tiềm năng sử dụng xét nghiệm tính đa hình gen *MTHFR* như một marker tiềm năng trong tiên lượng, chẩn đoán và điều trị cho các trường hợp sảy thai tái diễn.

5. Kết luận

Đã thiết lập được quy trình realtime PCR để thực hiện xét nghiệm phát hiện tính đa hình tại 2 điểm phổ biến nhất (677 và 1298) của gen *MTHFR*.

Bước đầu thực hiện khảo sát tần suất xuất hiện của các đa hình gen *MTHFR* tại 2 điểm 677 và 1298 ở nhóm phụ nữ từng có bệnh sử sảy thai liên tiếp với nhóm phụ nữ bình thường thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa tỷ lệ kiểu gen dị hợp giữa hai nhóm nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

1. World Health Organization (2018) *International classification of diseases*. 11th Revision (ICD - 11), Geneva: WHO 2018.
2. Boivin J, Bunting L, Collins JA, et al (2007) *International estimates of infertility prevalence and treatment - seeking: Potential need and demand for infertility medical care*. Human reproduction (Oxford, England) 22(6): 1506-1512.
3. Willem Ombelet, Ian Cooke, Silke Dyer, Gamal Serour, Paul Devroey (2008) *Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries*. Human Reproduction Update 14(6): 605-621.
4. Holly B Ford and Danny J Schust (2009) *Recurrent pregnancy loss: Etiology, diagnosis, and therapy*. Reviews in Obstetrics & Gynecology 2(2): 76-83.
5. Raj Rai, Lesley Regan (2006) *Recurrent miscarriage*. The Lancet 368(9535): 601-611.
6. Lora Shahine, Ruth Lathi (2015) *Recurrent pregnancy loss: evaluation and treatment*. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America 42(1): 117-134.
7. Genetics Home Reference, *MTHFR* gene. U.S. National Library of Medicine.
8. Daniel Leclerc, Sahar Sibani, and Rima Rozen, *Molecular biology of Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms*. Madame Curie Bioscience Database. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.
9. U.S Department of Health & Human Services, *MTHFR gene variant*. Genetic and Rare Diseases Information Center; National Center for Advancing Translational Sciences.
10. Domenico Dell'Edera, Antonella L'Episcopia, Francesca Simone, Maria Giovanna Lupo, Annunziata Anna Epifania, and Arianna Allegretti (2018) *Methylenetetrahydrofolate reductase gene C667T and A1298C polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss*. Biomedical Reports 8(2): 172-175.
11. Shehnaz Sultana, Pratibha Nallari, Venkateshwari Ananthapur (2020) *Recurrent Pregnancy Loss (RPL): An overview*. J Women's Health 3(3): 302-315.

12. Yi Yang, Yunyao Luo, Jing Yuan, Yidan Tang, Lang Xiong, MangMang Xu, XuDong Rao & Hao Liu (2016) *Association between maternal, fetal and paternal MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a comprehensive evaluation*. Maternal - Fetal Medicine 293: 1197-1211.
13. Walid Al-Achkar, Abdulsamad Wafa BS, Samer Ammar BS, Faten Moassass BS & Rami A Jarjour (2017) *Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Syrian Women*. Reproductive Sciences 24: 1275-1279.