

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----o0o-----



## LUẬN VĂN THẠC SĨ

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘT BIẾN  
TRÊN GEN *CYP11B1*  
Ở NGƯỜI BỆNH TĂNG SẢN THƯỢNG THẬN BẨM SINH

Chuyên ngành: Sinh học Thực nghiệm

Mã số: 60420114

Học viên: Nguyễn Thu Hiền

Lớp: K15-Sinh học

GVHD: TS. Nguyễn Huy Hoàng

Hà Nội, tháng 10 năm 2013

## MỤC LỤC

	<b>Trang</b>
<b>DANH MỤC VIẾT TẮT.....</b>	<b>i</b>
<b>DANH MỤC HÌNH.....</b>	<b>ii</b>
<b>DANH MỤC BẢNG.....</b>	<b>iv</b>
<b><i>MỞ ĐẦU</i>-----</b>	<b>1</b>
<b><i>I. TỔNG QUAN</i> -----</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Hormone tuyến thượng thận-----</b>	<b>3</b>
1.1.1. Tuyến thượng thận-----	3
1.1.2. Quá trình tổng hợp các steroid hormone ở tuyến thượng thận -----	4
1.1.3. Điều hòa hoạt động steroid hydroxylase -----	7
<b>1.2. Cytochrome P450-----</b>	<b>8</b>
1.2.1. Vai trò và chức năng -----	8
1.2.2. Cấu trúc không gian cytochrome P450 -----	10
<b>1.3. Gen <i>CYP11B1</i> -----</b>	<b>11</b>
1.3.1. Cấu trúc và chức năng -----	11
1.3.2. Cấu trúc không gian của <i>CYP11B1</i> -----	12
<b>1.4. Bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS)-----</b>	<b>14</b>
1.4.1. Khái niệm-----	14
1.4.2. Tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu hụt 11 $\beta$ -hydroxylase -----	14
1.4.2.1. Cơ chế gây bệnh-----	14
1.4.2.2. Biểu hiện lâm sàng -----	15
1.4.2.3. Cơ sở di truyền-----	16

1.4.3. Tăng sản thượng thận bẩm sinh do nguyên nhân khác -----	16
<b>1.5. Chẩn đoán và điều trị bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh-----</b>	<b>18</b>
1.5.1. Chẩn đoán tăng sản thượng thận bẩm sinh -----	18
1.5.2. Điều trị bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh -----	19
<b>1.6. Tình hình nghiên cứu-----</b>	<b>20</b>
<b><i>PHẦN II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU -----</i></b>	<b><i>26</i></b>
<b>2.1. Vật liệu nghiên cứu -----</b>	<b>26</b>
2.1.1. Bệnh nhân -----	26
2.1.2. Hóa chất-----	26
2.1.3 Thiết bị-----	28
<b>2.2. Phương pháp nghiên cứu -----</b>	<b>28</b>
2.2.1. Tách chiết DNA tổng số -----	28
2.2.2. Điện di DNA trên gel agarose -----	28
2.2.3. Đo quang phổ DNA -----	29
2.2.4. Nhân gen bằng kỹ thuật PCR-----	29
2.2.5. Tinh sạch sản phẩm PCR -----	30
2.2.6. Giải trình tự gen tự động trên máy -----	30
2.2.7. Tạo đột biến điểm trực tiếp (Site-directed mutagenesis) -----	31
2.2.8. Biểu hiện trong tế bào COS-1 và phân tích hoạt tính enzyme-----	31
2.2.9. Phân tích trình tự gen trên phần mềm tin học-----	32
<b><i>PHẦN III: KẾT QUẢ -----</i></b>	<b><i>33</i></b>
<b>3.1. Tách DNA tổng số-----</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Xác định hàm lượng và độ tinh sạch của DNA bằng quang phổ kế -----</b>	<b>34</b>
<b>3.3. Khuếch đại đoạn gen <i>CYP11B1</i> -----</b>	<b>35</b>

<b>3.4. Phân tích ảnh hưởng của đột biến trên gen <i>CYP11B1</i> ở bệnh nhân</b>	<b>38</b>
3.4.1. Bệnh nhân 01	38
3.4.1.1. Xét nghiệm lâm sàng, hóa sinh	38
3.4.1.2. Phân tích trình tự phát hiện đột biến	39
3.4.1.3. Biểu hiện của đột biến trong tế bào động vật	40
3.4.2. Bệnh nhân 02	42
3.4.2.1. Xét nghiệm lâm sàng, hóa sinh	42
3.4.2.2. Phân tích trình tự phát hiện đột biến	43
3.4.2.3. Biểu hiện của đột biến trong tế bào động vật	44
3.4.3. Bệnh nhân 03	46
3.4.3.1. Xét nghiệm lâm sàng, hóa sinh	46
3.4.3.2. Phân tích trình tự phát hiện đột biến	47
<b>3.5. Phân tích cấu trúc</b>	<b>48</b>
3.5.1. So sánh trình tự amino acid của <i>CYP11B1</i>	48
3.5.2. Mô hình cấu trúc 3D của các đột biến điểm trên <i>CYP11B1</i>	53
3.5.2.1. Mô hình cấu trúc không gian của <i>CYP11B1</i>	53
3.5.2.2. Đột biến R51K	54
3.5.2.3. Đột biến E147D	55
3.5.2.4. Đột biến N152K	56
<b>IV. THẢO LUẬN</b>	<b>58</b>
<b>V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b>	<b>66</b>
<b>4.1. Kết luận</b>	<b>66</b>
<b>4.2. Kiến nghị</b>	<b>66</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	<b>67</b>

## MỞ ĐẦU

Tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS) (Congenital Adrenal Hyperplasia – CAH) là một nhóm các bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường đặc trưng bởi sự thiếu hụt một trong số các enzyme cần thiết cho quá trình tổng hợp hormone của vỏ thượng thận. Trong đó, thiếu hụt 21-hydroxylase chiếm 90-95%, 11 $\beta$ -hydroxylase chiếm từ 5-8% các trường hợp trẻ đẻ sống và rất hiếm gặp trường hợp thiếu hụt 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Bệnh TSTTBS là bệnh di truyền với các dấu hiệu suy thượng thận cấp có thể dẫn đến tử vong ở thể mất muối hay trẻ có các biểu hiện nam tính hoá ở trẻ gái, giả dậy thì sớm ở trẻ trai... gây ảnh hưởng nặng nề đến sự phát triển chiều cao, chức năng sinh dục, sinh sản và tâm lý.

Hiện nay, sự phát triển của khoa học kỹ thuật nói chung và kỹ thuật sinh học phân tử nói riêng đã góp phần quan trọng đưa đến nhiều thành công trong lĩnh vực nghiên cứu các bệnh di truyền người. Phân tích đột biến gen *CYP21A2* mã hóa cho 21-hydroxylase và đột biến gen *CYP11B1* mã hóa 11 $\beta$ -hydroxylase có vai trò quan trọng trong việc khẳng định chẩn đoán nguyên nhân gây bệnh TSTTBS. Sự kết hợp giữa chẩn đoán phân tử, lâm sàng và hóa sinh sẽ giúp cho bác sĩ hoặc những người tư vấn di truyền có một cái nhìn toàn diện, tổng quát về tình trạng của bệnh nhân, giúp định hướng cho việc chỉ định điều trị bằng liệu pháp hormone thay thế suốt đời.

Trong những năm gần đây, tại các bệnh viện ở Việt Nam, số lượng các bệnh nhân, đặc biệt các bệnh nhi, có hiện tượng TSTTBS ngày càng xuất hiện nhiều hơn. Hiện nay, tại một số bệnh viện và cơ sở nghiên cứu trong nước đã bắt đầu sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử để phát hiện các đột biến gen gây bệnh TSTTBS. Tuy nhiên, các nghiên cứu chỉ chủ yếu phát hiện đột biến trên gen *CYP21A2* bằng cách lọc các đột biến thường gặp bằng kỹ thuật MLPA.

Xuất phát từ các lý do trên đây, luận văn “**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘT BIẾN TRÊN GEN *CYP11B1* Ở NGƯỜI BỆNH TĂNG SẢN THƯỢNG THẬN BẨM SINH**” được tiến hành với những nội dung:

- Xác định đột biến trên gen *CYP11B1* ở bệnh nhân và gia đình bệnh nhân có hiện tượng tăng sản thượng thận bẩm sinh.
- Xác định mức độ ảnh hưởng của đột biến lên hoạt tính của enzyme 11 $\beta$  hydroxylase

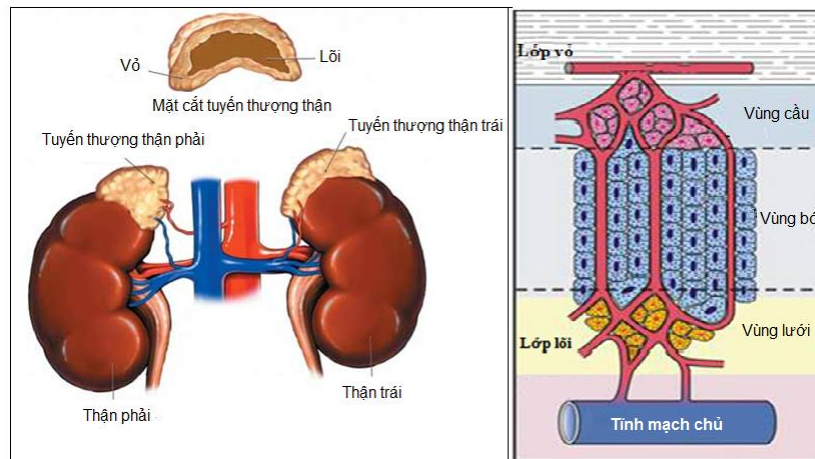
Từ đó, đánh giá mối tương quan giữa kiểu hình và kiểu gen của đột biến trên gen *CYP11B1*.

## I. TỔNG QUAN

### 1.1. Hormone tuyến thượng thận

#### 1.1.1. Tuyến thượng thận

Tuyến thượng thận gồm hai tuyến nhỏ hình tam giác nằm ở cực trên hai thận. Ở trẻ em, cân nặng trung bình mỗi tuyến là 4 gram, gồm hai phần: phần vỏ và phần tủy, khác nhau về bào thai học, sinh hoá học và chức năng. Phần vỏ có ba vùng: vùng cầu (vùng glomerulosa), vùng bó (vùng fasciculata) và vùng lưới (vùng reticularis) (Hình 1.1).



**Hình 1.1: Vị trí và cấu tạo tuyến thượng thận [9]**

Vỏ tuyến thượng thận sản xuất ra một phức hệ nhiều steroid hormone bao gồm glucocorticoid, mineralocorticoid, androgen (hormone sinh dục nam giới) và estrogen (hormone sinh dục nữ giới). Tuyến này bao bọc xung quanh lõi thượng thận và bao gồm nhiều vùng sản xuất ra các steroid khác nhau (Hình 11). Do được tổng hợp từ cholesterol, các hormone vỏ thượng thận đều có bản chất là steroid và được gọi là corticosteroid hay corticoid (xuất phát từ chữ cortex nghĩa là vỏ). Mặc dù có cùng nguồn gốc và bản chất, những thay đổi về cấu trúc hoá học gồm thay đổi các gốc hoá học và các vị trí liên kết carbon đã tạo nên các nhóm corticoid có tác dụng sinh học

khác nhau. Người ta đã chiết xuất được trên 50 dẫn xuất corticoid và chia làm ba nhóm:

Hormon chuyển hoá muối (mineralocorticoid), tổng hợp ở vùng cầu.

Hormon chuyển hoá đường (glucocorticoid), tổng hợp ở vùng bó.

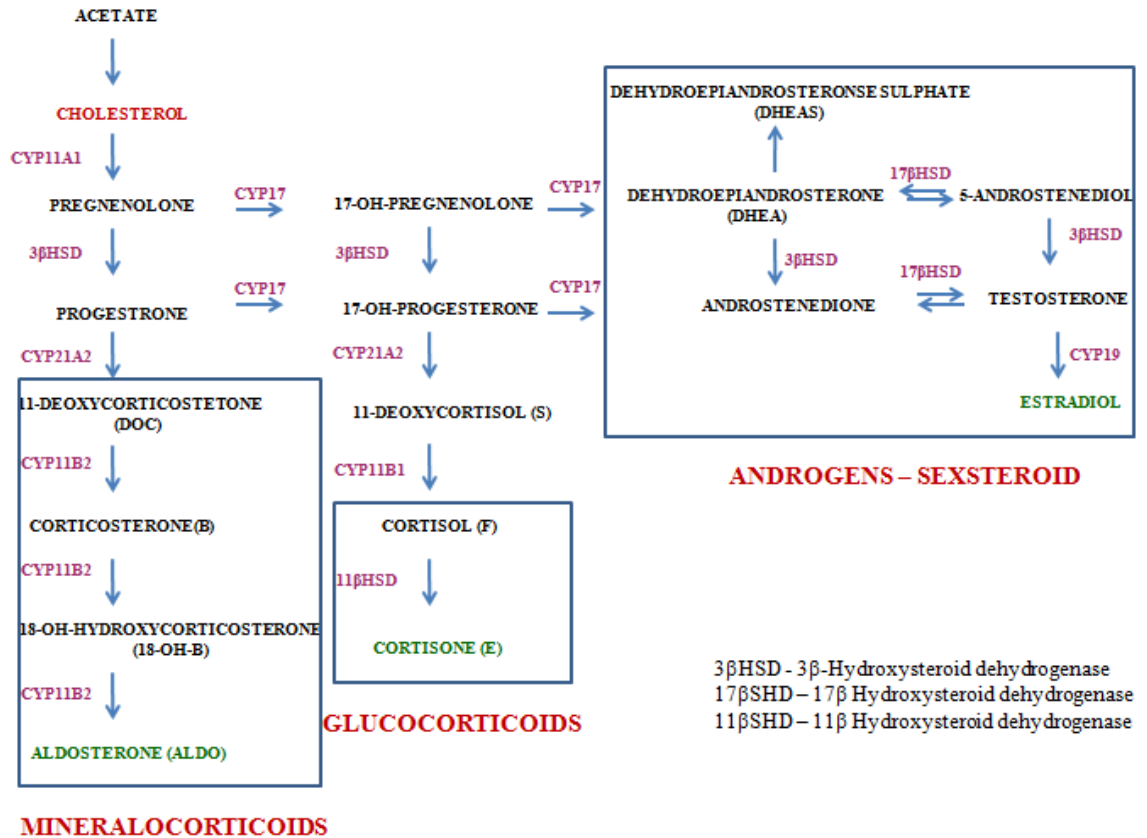
Hormon sinh dục nam (androgen), tổng hợp ở vùng lưới.

Cortisol là thành phần chính của glucocorticoids, tham gia vào quá trình chuyển hóa năng lượng và đáp ứng các stress của cơ thể.

### **1.1.2. Quá trình tổng hợp các steroid hormone ở tuyến thượng thận**

Steroid hormone, trong đó có hormone vỏ thượng thận, được tổng hợp nhờ sự tham gia trực tiếp của một chuỗi các enzyme. Phản ứng hydroxyl hoá giữ vai trò quan trọng trong sự tổng hợp cholesterol từ acetate cũng như quá trình chuyển hoá cholesterol thành steroid hormone và muối mật. Vì vậy, các enzyme tham gia tổng hợp hormone vỏ thượng thận là những enzyme xúc tác quá trình hydroxyl hoá, gọi chung là các hydroxylase. Trừ enzyme  $3\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase ( $3\beta$ - HSD), các enzyme tổng hợp corticoid đều thuộc họ protein cytochrom P-450, viết tắt là CYP bao gồm: CYP11A1 (chuỗi cholesterol bị phân cắt ra làm nhiều mảnh nhỏ, còn gọi là cytochrome P450 hoặc P450<sub>scc</sub>), CYP17 ( $17\alpha$ -hydroxylase/  $17,20$ -lyase or P450<sub>c17</sub>), CYP21A2 ( $21$ -hydroxylase cytochrome P450 hoặc P450<sub>c21</sub>), CYP11B1 ( $11\beta$ -hydroxylase hoặc P450<sub>11\beta</sub>), CYP11B2 (aldosterone synthase hoặc P450<sub>aldo</sub>), và CYP19 (aromatase hoặc P450<sub>aom</sub>) [36] (Hình 1.2).





**Hình1.2: Quá trình tổng hợp steroid hormone vỏ thượng thận [10, 13]**

Dạng tiền chất của steroid hormone tuyến thượng thận là cholesterol, được gọi là steroid 27-carbon. Các mô tế bào steroidogenic có thể tổng hợp cholesterol bằng phương pháp *de novo* từ muối acetate, muối axetat này có thể làm biến đổi những este nội bào của cholesterol, hoặc nhận lipoprotein từ huyết thanh. Trong quá trình tổng hợp steroid hormone tuyến thượng thận, cholesterol được chuyển đổi thành steroid hormone hoàn chỉnh nhờ sự xúc tác trung gian của các enzyme cytochrome P450 trong ty thể và lưới nội chất. Quá trình tổng hợp bắt đầu xảy ra trong ty thể, tiếp tục trong lưới nội chất, và hoàn tất trong ty thể. Do đó, dạng tiền chất của steroid hormone nằm ở giữa ty thể và các ngăn của tế bào chất là rất quan trọng trong quá trình tổng hợp các hormone tuyến thượng thận.

Quá trình tổng hợp steroid hormone bị giới hạn bởi sự vận chuyển cholesterol từ ngoài vào trong màng ti thể và vùng hoạt động của CYP11A1 (chuỗi 20, 22-hydroxylase cholesterol). Trong quá trình tổng hợp steroid hormone, cholesterol được tập trung lại và đưa đến trung tâm hoạt động của CYP11A1, nơi trực tiếp liên kết với vùng bên trong màng ty thể. Các protein sẽ có nhiệm vụ thực hiện sự vận chuyển này có tên là protein điều hòa steroidogenic [66]. Các pregnenolone sau đó đi từ ty thể đến lưới nội chất để tiếp tục các quá trình chuyển hóa tiếp theo. Mặt khác, pregnenolone còn có thể được chuyển đổi trực tiếp thành progesterone nhờ 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ HSD). Ở một trường hợp khác, pregnenolone còn có thể được hydroxyl hóa tại vị trí 17 $\alpha$ -hydroypregnenolone nhờ 17 $\alpha$ -hydroxylase (CYP17) để sản xuất ra 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone. Sau đó, 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone sẽ được 3 $\beta$ HSD biến đổi thành 17 $\alpha$ -hydroxypregesterone hoặc steroid C19, dehydroepiandrosterone nhờ xúc tác 17,20 lyase từ CYP17. Bên cạnh đó, dehydroepiandrosterone (DHEA) được 3 $\beta$ HSD biến đổi thành androstenedione tham gia vào cấu tạo các tiền chất của hormone giới tính. Progesterone hoặc 17 $\alpha$ -OH-progesterone có thể được 21-hydroxylase (CYP21A2) hydroxyl hóa tại vị trí 21 để sản xuất ra lần lượt 11-deoxycorticosterone và 11-deoxycortisol. Những sản phẩm này của CYP21A2 sau đó được đưa trở lại vào ty thể, nơi bước cuối cùng của quá trình tổng hợp steroid hormone trong lớp vỏ tuyến thận diễn ra. Hai đồng phân CYP11B là 11 $\beta$ -hydroxylase/aldosterone synthase (CYP11B2) và 11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1), làm xúc tác cho quá trình chuyển hóa deoxycorticosterone và 11-deoxycortisol lần lượt thành corticosterone và cortisol. Mặt khác, vùng bên ngoài của lớp vỏ tuyến thượng thận, vùng cầu, sản xuất ra mineralocorticoid aldosterone bền vững từ deoxycorticosterone nhờ sự xúc tác của CYP11B2. Một sự khác biệt về enzyme ở giữa vùng cầu và vùng bó là sự vắng mặt của CYP17 tại vùng cầu. Phần lớn các tế bào trong vùng cầu có xu hướng biểu hiện ra CYP11B2. Tại vùng lưới, androstenedione được chuyển đổi thành testosterone và estrone/estradiol nhờ 17 $\beta$ -ketosteroid reductase (17 $\beta$ HSD) và 19-hydroxylase