

XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN *SRD5A2* GÂY BỆNH THIẾU ENZYM 5 α -REDUCTASE 2

Lê Hoàng Bích Nga¹, Trần Thị Ngọc Anh², Trần Thị Chi Mai¹

¹ Trường Đại học Y Hà Nội

² Bệnh viện Hữu Nghị Việt Đức

Thiếu enzym 5 α -reductase 2 là một trong hai nguyên nhân hay gặp gây rối loạn phát triển giới tính ở nam giới (46,XY). Các dấu hiệu lâm sàng điển hình ở bệnh nhân thiếu enzym 5 α -reductase-2 như dương vật nhỏ, lỗ đái thấp thể nặng, bìu chẻ đôi. *SRD5A2* là gen mã hoá cho protein 5 α -reductase-2, tham gia chuyển hoá hormon steroid. Đột biến gen *SRD5A2* gây sự thiếu hụt enzym và do đó dẫn đến tình trạng bệnh lý. Mẫu máu của 5 bệnh nhân được chẩn đoán thiếu hụt enzym 5 α -reductase-2 dựa trên đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả phân tích steroid niệu được xác định đột biến gen *SRD5A2*. 5/5 bệnh nhân đều có đột biến trên gen *SRD5A2*. Có 5 biến đổi di truyền được tìm thấy, trong đó có 2 đột biến gây bệnh (*p.Arg227Gln* và *p.Gln6**), 1 đột biến mới (*p.Glu197Gly*), 1 SNP và 1 biến đổi di truyền tại vùng không mã hoá trên exon 1. Kết quả giải trình tự gen *SRD5A2* giúp khẳng định chẩn đoán, tư vấn di truyền cho gia đình bệnh nhân.

Từ khóa: Rối loạn phát triển giới tính, 5 α -reductase 2, *SRD5A2*, đột biến gen

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thiếu enzym 5 α -reductase-2 là bệnh lý di truyền do đột biến gen *SRD5A2* trên nhiễm sắc thể số 2 (2p23), gây giảm một phần hoặc hoàn toàn hoạt tính của enzym 5 α -reductase-2. Enzym này xúc tác phản ứng khử liên kết đôi trong chu trình chuyển hoá hormon steroid, cụ thể giúp chuyển testosterone (T) thành dihydrotestosterone (DHT), tetrahydrocortisol (THF) thành 5 α -THF, etiocholanolone (Et) thành androsterone (An). Thiếu enzym 5 α -reductase-2 và hội chứng không nhạy cảm androgen (Androgen insensitivity syndrome:

AIS) là hai nguyên nhân hay gặp nhất gây rối loạn phát triển giới tính (disorders of sex development: DSDs) ở nam giới. Thiếu enzym 5 α -reductase-2 có tần suất mắc khoảng 1: 500000 người, một số nước có tần suất mắc cao hơn như Dominica, Thổ Nhĩ Kỳ và Lebanon [1]. Hiện nay, để chẩn đoán bệnh 5 α -reductase 2 có thể dựa vào các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng. Một số ca lâm sàng thiếu enzym 5 α -reductase-2 được công bố với các triệu chứng như dương vật nhỏ, lỗ đái thấp, bìu chẻ đôi, ẩn tinh hoàn, nữ hóa [2 - 4]. Các đặc điểm cận lâm sàng gồm có: tỷ lệ T/DHT trước và sau làm test kích thích bằng hCG, hoặc sự giảm của tỉ lệ An/Et, 5 α -THF/THF khi định lượng steroid niệu bằng kỹ thuật GC-MS. Phân tích đột biến gen *SRD5A2* được coi là tiêu chuẩn để khẳng định kết quả chẩn đoán bệnh thiếu hụt 5 α -reductase-2 ở nhiều nước trên thế giới [5]. Việt Nam, phân tích đột biến gen *SRD5A2* cho

Tác giả liên hệ: Lê Hoàng Bích Nga,

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: bichnga.xnyh@gmail.com

Ngày nhận: 02/08/2019

Ngày được chấp nhận: 20/08/2019

các bệnh nhân thiếu 5 α -reductase 2 vẫn phải gửi mẫu ra nước ngoài. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu xác định đột biến gen *SRD5A2* ở các bệnh nhân được chẩn đoán thiếu hụt enzym 5 α -reductase 2 dựa trên lâm sàng, cận lâm sàng và phân tích steroid niệu.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Nhóm bệnh

5 bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh thiếu enzym 5 α -reductase 2 với các đặc điểm sau:

- Bộ phận sinh dục không rõ ràng khi sinh, hoặc bất thường về giải phẫu cơ quan sinh dục trong và ngoài

- Bộ nhiễm sắc thể 46, XY

- Kết quả định lượng steroid niệu bất thường (tỉ lệ An/Et, 5 α -THF/THF thấp)

Thời gian thu thập mẫu từ tháng 7/2018 đến 7/2019. Bệnh nhân và gia đình đồng ý tham gia nghiên cứu. Các kết quả lâm sàng, cận lâm sàng, kết quả xét nghiệm hormon, xét nghiệm steroid niệu được thu thập từ hồ sơ bệnh án.

Nhóm chứng

Mẫu máu của 3 trẻ nam, bình thường, tiền sử gia đình không có người mắc bệnh di truyền, không có các bất thường trên lâm sàng cũng như đặc điểm steroid niệu.

2. Phương pháp

Mẫu bệnh phẩm

Mẫu nước tiểu ngẫu nhiên được thu thập để định lượng steroid. Mẫu máu được lấy vào ống chống đông EDTA, thể tích 2ml để phân tích đột biến gen.

Quy trình định lượng steroid niệu bằng GC/MS

Thủy phân steroid niệu liên hợp bằng enzym glucuronidase và arylsulphatase. Tách chiết steroid tự do bằng cột Bond-Elut C18. Làm khô dung dịch sau tách chiết bằng khí ni tơ. Tạo dẫn xuất oxim methylsilyl bằng methoxyamine/pyridine 3%. Tạo dẫn xuất bằng trimethylsilyl imidazol (TMSI). Tách chiết mẫu steroid bằng Iso-octan, mẫu cho vào glass insert để phân tích trên máy GC/MS 7890A của hãng Agilent. Kết quả định lượng steroid niệu được tính ra đơn vị $\mu\text{mol/L}$.

Tách DNA từ máu ngoại vi và khuếch đại gen (PCR)

DNA tổng số được tách chiết từ máu toàn phần theo kit QIAGEN DNA blood kit. Mẫu máu sau khi tách chiết được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di trên gel agarose và phương pháp quang phổ (OD 260/280nm).

Toàn bộ 5 exon của gen *SRD5A2* bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

Tên	Trình tự mồi (5'→3')	Tên	Trình tự mồi (5'→3')
1F	CTTCGTTCTCCTCCGGCCAC	1R	CTGCCTCCTTGCGTTCCCT
2F	GAGCCTGGTTTTGTACCTTCTG	2R	GGCCATGGCGATGTAGATTGT
3F	CCCACCTTCTGCCACGTCTTAG	3R	TGTATCATTTCGTGCCCTCACTGT
4F	GGAACAACACAGATGGGTTTAATG	4R	AATACAAGCCCAGCAAGTCAGA
5F	GTCAGCCACTGCTCCATTATATT	5R	TACTTGGATTGCCCGGTGAA

Giải trình tự gen và phân tích đột biến

Sản phẩm PCR được giải trình tự trên máy giải trình tự tự động ABI 3730xl DNA Analyser với BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit.

Kết quả giải trình tự gen được so sánh với trình tự gen chuẩn NM_000348.3 trên NCBI và

so sánh với ngân hàng đột biến gen *SRD5A2* được công bố trên LOVD.

Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Kỹ thuật Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ các quy định về đạo

đức trong nghiên cứu Y học. Các đối tượng hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu và có quyền rút lui khỏi nghiên cứu khi không đồng ý tiếp tục tham gia. Các tình nguyện viên sẽ được thông báo về kết quả xét nghiệm máu. Mọi thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo bí mật.

III. KẾT QUẢ

Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của 5 bệnh nhân thiếu 5 α -reductase 2

Mã số	Họ và tên	Lâm sàng	Thời điểm chẩn đoán	Testosterone (nmol/L)		FSH (IU/L)		LH (IU/L)	
				Bệnh nhân	Tham chiếu	Bệnh nhân	Tham chiếu	Bệnh nhân	Tham chiếu
BN1	Nguyễn Gia B	Ngoại hình nam, dương vật rất nhỏ <1cm, lỗ đái thấp, bìu chẻ đôi giống bộ phận sinh dục nữ.	2 tuổi	< 0,087	< 0,7	0,403	< 4,0	< 0,1	< 0,02 - 5,0
BN2	Trần Nguyên H	Dương vật nhỏ, lỗ đái thấp thể nặng ở góc dương vật	6 tuổi	< 0,087	< 0,7	0,71	< 4,0	0,02	< 0,02 - 5,0
BN3	Đỗ Tiến Thg	Ngoại hình nam, dương vật nhỏ, bìu chẻ đôi, lỗ đái thấp.	5 tuổi	< 0,087	< 0,7	1,04	< 4,0	0,223	< 0,02 - 5,0
BN4	Đỗ Tiến Th	Ngoại hình nam, dương vật nhỏ, bìu chẻ đôi, lỗ đái thấp.	9 tuổi	< 0,087	< 0,7	1,49	0,3 - 10,0	0,358	< 0,02 - 3,6
BN5	Trần Anh V	Dương vật nhỏ, lỗ đái thấp thể nặng ở góc dương vật	11 tuổi	< 0,087	< 0,07 - 4,51	2,02	0,3 - 10,0	0,09	0,1 - 5,7

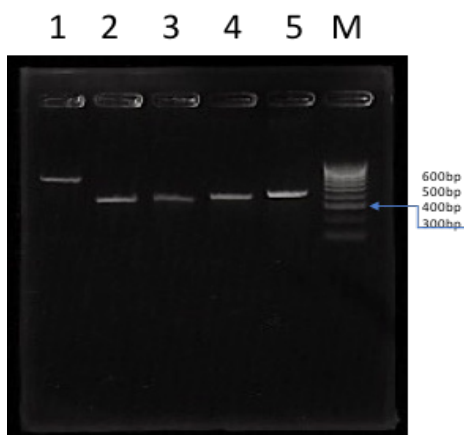
5/5 bệnh nhân là nam có bộ nhiễm sắc thể 46, XY, không phát hiện bất thường về mặt nhiễm sắc thể. Nồng độ testosterone, LH thấp ở 5/5 bệnh nhân trong đó 4 bệnh nhân chưa đến tuổi dậy thì (BN1-BN4). 16 sản phẩm chuyển hóa steroid niệu được định lượng, trong đó một số sản phẩm như tetrahydrocortisol (THF), 5 α -THF, androsterone (An), etiocholanolone (Et) giúp chẩn đoán thiếu enzym 5 α -reductase 2 được mô tả trong bảng 2.

Bảng 2. Sản phẩm chuyển hóa steroid niệu của 5 bệnh nhân thiếu 5-reductase 2

Bệnh nhân	Tuổi	Tỷ lệ 5 α -THF/THF				Tỷ lệ A/E			
		THF	5 α -THF	5 α -THF/THF	Tham chiếu	A	E	A/E	Tham chiếu
BN 1	2	0,39	0,05	0,13	0,42 - 4,1	KXĐ	KXĐ	-	
BN 2	6	3,0	1,0	0,03	0,42 - 4,1	0,1	0,25	0,4	> 1,0
BN 3	5	5,33	0,13	0,02	0,42 - 4,1	0,1	0,28	0,36	> 1,0
BN 4	9	2,73	0,1	0,04	0,2 - 2,6	0,1	0,34	0,29	1,0 - 2,8
BN 5	11	1,94	0,1	0,05	0,2 - 2,6	0,24	1,21	0,2	1,0 - 2,8

Tỷ lệ 5 α -THF/THF rất thấp so với giá trị tham chiếu ở 5/5 bệnh nhân. Tỷ lệ An/Et thấp ở 4 bệnh nhân có độ tuổi ≥ 5 tuổi. Không xác định ở bệnh nhân 1 do nồng độ An và Et dưới giới hạn định lượng.

5 exon của gen *SRD5A2* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR bằng các cặp mồi đặc hiệu. Kích thước của các sản phẩm PCR trong khoảng 300-600bp. Hình 1 minh họa sản phẩm PCR của gen *SRD5A2*.

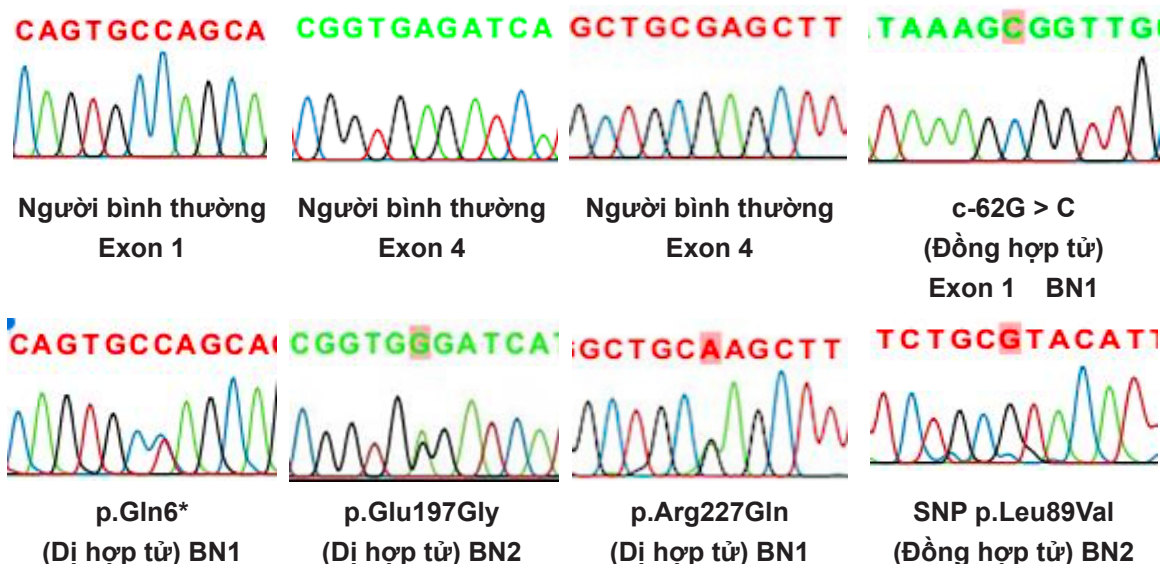


Hình 1. Kết quả PCR khuếch đại 5 exon của gen *SRD5A2*. Giếng 1-5: Sản phẩm PCR khuếch đại exon 1-5 tương ứng. M: Thang chuẩn DNA 100bp

Sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu, rõ nét, đảm bảo cho phản ứng giải trình tự gen tiếp theo để phát hiện đột biến điểm. Kết quả cho thấy có 5 biến đổi di truyền, trong đó có 2 đột biến gây bệnh, 1 đột biến mới, 1 SNP, và 1 biến dị ở vùng không mã hoá acid amin trên exon 1 (Bảng 3 và Hình 2)

Bảng 3. Kết quả phân tích đột biến gen SRD5A2 trên bệnh nhân thiếu hụt enzym 5 α -reductase 2

Bệnh nhân	Exon	Đột biến	Thể đồng hợp/ Dị hợp tử	Ý nghĩa
BN 1	1	c.-62 G > C	Đồng hợp tử	Chưa có thông tin
	1	c.265C > G, p.Leu89Val	Đồng hợp tử	SNP
	1	c.97C > T, p.Gln6*	Dị hợp tử	Đột biến vô nghĩa
	4	c.680G > A, p.Arg227Gln	Dị hợp tử	Giảm hoạt tính
BN 2	1	c.265C > G, p.Leu89Val	Đồng hợp tử	SNP
	4	c.590A > G, p.Glu197Gly	Dị hợp tử	Chưa có công bố
	4	c.680G > A, p.Arg227Gln	Dị hợp tử	Giảm hoạt tính
BN 3	1	c.-62 G > C	Đồng hợp tử	Chưa có thông tin
	1	c.265C > G, p.Leu89Val	Đồng hợp tử	SNP
	4	c.680G > A, p.Arg227Gln	Đồng hợp tử	Giảm hoạt tính
BN 4	1	c.-62 G > C	Đồng hợp tử	Chưa có thông tin
	1	c.265C > G, p.Leu89Val	Đồng hợp tử	SNP
	4	c.680G > A, p.Arg227Gln	Đồng hợp tử	Giảm hoạt tính
BN 5	1	c.265C > G, p.Leu89Val	Đồng hợp tử	SNP
	4	c.590A > G, p.Glu197Gly	Dị hợp tử	Chưa có công bố
	4	c.680G > A, p.Arg227Gln	Dị hợp tử	Giảm hoạt tính



Hình 2. Hình ảnh đột biến gen SRD5A2 của bệnh nhân mắc bệnh thiếu hụt enzym 5 α -reductase 2. BN1: Bệnh nhân 1, BN2: Bệnh nhân 2

IV. BÀN LUẬN

Trên 5 bệnh nhân được chẩn đoán thiếu hụt enzym 5 α reductase-2, dựa trên đặc điểm lâm sàng và các chỉ số sinh hoá, nhóm nghiên cứu đã tiến hành giải trình tự gen trên cả 5 exon của gen *SRD5A2*. 5/5 bệnh nhân đều phát hiện đột biến gen gây bệnh. Nhóm nghiên cứu cũng phát hiện một đột biến mới chưa từng được công bố trước đây.

Tính đến thời điểm hiện tại, đã có hơn 60 đột biến gen *SRD5A2* được tìm thấy và công bố trên thế giới. Trong số đó, có rất nhiều đột biến được tìm thấy trên nhóm người châu Á như đột biến p.Arg227Gln. Một số đột biến đã được nghiên cứu kỹ về sự biến đổi và ảnh hưởng lên hoạt tính của enzym *SRD5A2*. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã tìm thấy 5 biến đổi, trên 5 bệnh nhân, trong đó có 2 đột biến gây bệnh, 1 đột biến mới, 1 SNP, 1 biến đổi di truyền mới chưa được nghiên cứu. Toàn bộ 5 bệnh nhân đều tìm thấy đột biến gây bệnh, bên cạnh các đột biến mới, hoặc chưa có thông tin.

Đột biến p.Gln06* là đột biến vô nghĩa (nonsense mutation), làm thay đổi làm thay đổi bộ ba mã hoá cho acid amin Glutamine thành bộ ba kết thúc, chấm dứt quá trình dịch mã, và tạo protein mất đoạn, ngắn, giảm hoặc không có chức năng. Đột biến xảy ra trên vùng đầu gen, gây mất gần như hoàn toàn protein *SRD5A2*; do đó, kiểu hình của những bệnh nhân mang đột biến này khá nặng. Bệnh nhân trong nghiên cứu này là người mang đột biến dị hợp tử kép có kiểu hình nam, bất thường, với dương vật nhỏ. Đây là một bệnh nhân thuộc thể dị hợp tử kép, với một đột biến vô nghĩa và một đột biến sai nghĩa gây bệnh (p.Arg227Gln).

Đột biến c.680G>A, p.Arg227Gln làm thay đổi acid amin thứ 227 từ Arginine thành Glutamine. Đây là đột biến gây bệnh, được nghiên cứu và công bố nhiều trước đó, đặc biệt ở quần thể châu Á [6 - 9]. Đột biến đã được

chứng minh làm giảm hoạt tính của enzym 5 α -reductase. Nghiên cứu invitro đã thấy đột biến làm giảm hoạt tính enzym còn 3,2% tốc độ phản ứng tối đa (Vmax) của enzym. Một vài nghiên cứu khác đã chứng minh rằng các đột biến thay thế làm giảm còn 3 - 15% hoạt tính của enzym, có thể dẫn đến sự bất thường về kiểu hình, trẻ có bộ phận sinh dục không rõ ràng hoặc biểu hiện nam hoá cơ quan sinh dục nữ.

Đột biến c.590A>G, p.Glu197Gly là một đột biến mới, chưa từng được công bố trước đây. Tuy nhiên tại vị trí acid amin 197, người ta đã tìm thấy 1 đột biến khác, p.Glu197Asp, được chứng minh gây bệnh [10]. Đột biến được tìm thấy dạng dị hợp tử trên bệnh nhân BN05, cùng với đột biến p.Arg227Gln. Bệnh nhân có biểu hiện bất thường cơ quan sinh dục với dương vật nhỏ, lỗ đái thấp thể nặng.

Biến đổi V89L là biến dị di truyền chuyển Nucleotide thứ 265 từ C thành G, chuyển acid amin Valine thành Leucine, được tìm thấy trên khá nhiều bệnh nhân và công bố là biến đổi không gây bệnh [6]. Nhóm nghiên cứu tìm thấy biến đổi này trên hầu hết các bệnh nhân, chiếm tỉ lệ cao trong quần thể, và tìm thấy ở cả người lành, gia đình không có tiền sử mắc bệnh. Trên thế giới, nghiên cứu trên 128 người bệnh và 100 người bình thường, người ta tìm thấy biến đổi này xuất hiện ở cả người lành và người bệnh, với tỉ lệ tương đương nhau.

Biến đổi c-62G>C là biến đổi chưa được nghiên cứu trước đó. Biến đổi xảy ra trên vùng không mã hoá của exon 1, nằm ở vùng đầu 5' (5'UTR) của mRNA *SRD5A2*. Chưa có một nghiên cứu nào thống kê và nghiên cứu biến đổi trên vùng này. Trong nghiên cứu này, biến dị xuất hiện ở 3/5 bệnh nhân tham gia nghiên cứu.

Bệnh thiếu enzym 5 α -reductase 2 là bệnh hiếm gặp với tần suất mắc khá thấp [1]. Ở châu

Á, một vài nhóm nghiên cứu tại Hongkong, Nhật Bản và Trung Quốc đã tiến hành phân tích gen chẩn đoán bệnh. Tại Việt Nam, đây là nghiên cứu đầu tiên phát hiện đột biến gen *SRD5A2* gây bệnh trên 5 bệnh nhân được chẩn đoán dựa vào các đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm. Kết quả tương đồng giữa xét nghiệm đột biến gen và các đặc điểm lâm sàng giúp khẳng định chẩn đoán và tư vấn di truyền.

V. KẾT LUẬN

Phát hiện 5 đột biến gen trên 5 bệnh nhân mắc bệnh thiếu enzym 5 α -reductase 2, trong đó có 2 đột biến gây bệnh, 1 đột biến mới, 1 SNP và 1 biến đổi trên vùng không mã hoá thuộc exon 1. Kết quả phân tích gen của bệnh nhân là tương đồng với các kết quả chẩn đoán lâm sàng.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin bày tỏ lời cảm ơn tới các bệnh nhân và gia đình đã tình nguyện tham gia nghiên cứu, cảm ơn Quý hợp tác TRAC – Thụy Điển đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Imperato McGinley J, Gautier T, Peterson RE, et al (1986). The prevalence of 5 α -reductase deficiency in children with ambiguous genitalia in the Dominican Republic. *J Urol* 136:867.
2. Diana Mettadewi Jong, Aman B Pulungan, Bambang Tridjaja, et al (2003). 5-alpha-reductase deficiency: a case report.

Paediatrica Indonesiana, **43**: 234-240.

3. Ivana Capin, Mary Ryan (2016). 5 α -Reductase deficiency in two siblings: a case report. *J Med Cases* 7 (7): 263-265.

4. Odame I, Donaldson MDC, Wallace AM et al (1992). Early diagnosis and management of 5 α -reductase deficiency. *Archives of Disease Childhood: 67*: 720-723.

5. Chan AO, But BW, Lee CY, et al (2013). Diagnosis of 5 α -reductase 2 deficiency: is measurement of dihydrotestosterone essential? *Clinical Chemistry* **59**: 798-806.

6. Sasaki G., Ogata T., Ishii T. et al (2003). Micropenis and the 5-alpha-reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. *J. Clin Endocrinol Metab.* **88**, 3431-3436

7. Meng-Che Tsai A., Yen-Yin Chou, Shio-Jean Lin et al. (2012). A novel SRD5A2 mutation in a Taiwanese newborn with ambiguous genitalia. *Journal of Medical Sciences* **28**, 231- 235.

8. Sahakitrungruang T1, Wacharasindhu S, Yeetong P et al (2008). Identification of mutations in the SRD5A2 gene in Thai patients with male pseudohermaphroditism. *Fertil Steril Nov*; **90**(5): 2015.e11-5

9. Chan AO1, But BW, Lau GT et al (2009) Diagnosis of 5alpha-reductase 2 deficiency: a local experience. *Hong Kong Med J.* Apr; **15**(2): 130-5.

10. Chávez B1, Valdez E, Vilchis F. J (2000). Uniparental disomy in steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. *Clin Endocrinol Metab.* Sep; **85**(9): 3147-50.

Summary

MUTATION ANALYSIS OF *SRD5A2* GENE CAUSING 5 α -REDUCTASE 2 DEFICIENCY

Enzyme 5 α -reductase 2 deficiency is one of the two most common causes of 46, XY disorders of sex development (DSDs). Patients have the following clinical symptoms, bifid scrotum and severe hypospadias micropenis. Gene *SRD5A2* codes for protein 5 α -reductase 2, which participates in steroid hormone metabolism. Thus mutations in *SRD5A2* could cause loss of enzyme function which lead to the abnormal sex development. Blood from 5 patients with clinical suspicion of 5 α -reductase 2 deficiency were collected to identify mutations in *SRD5A2* gene. 5/5 patients have been found to carry mutations. There are 5 gene modifications found: 2 pathogenic mutations (p.Arg227Gln and p.Gln6*), 1 new mutation (p.Glu197Gly), 1 SNP, 1 modification in the noncoding region of exon 1. These results are relevant to the clinical symptoms and diagnosis. The molecular results confirm the clinical diagnosis and provide data for further diagnosis in the patients' family.

Keywords: Disorders sex development (DSDs), 5 α -reductase-2 deficiency, *SRD5A2*, gene mutation.