

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THANH HUYỀN

NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA GEN *A20* VÀ *CYLD* TRONG
ĐIỀU HÒA CHỨC NĂNG TẾ BÀO Ở BỆNH NHÂN BẠCH CẦU
DÒNG TỬY

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9.42.02.01

Hà Nội - Năm 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn khoa học 1: PGS.TS. Nguyễn Xuân Cảnh
2. Người hướng dẫn khoa học 2: PGS.TS. Nguyễn Thị Xuân

Phản biện 1: GS.TS. Trần Huy Thịnh

Phản biện 2: GS.TS. Nguyễn Duy Bắc

Phản biện 3: PGS.TS. Đồng Văn Quyền

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi 9 giờ 00', ngày 10 tháng 10 năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Bệnh bạch cầu dòng tủy là một trong các loại bệnh bạch cầu khá phổ biến và xảy ra ở mọi lứa tuổi nhưng thường gặp nhất là ở người trưởng thành. Bệnh bạch cầu dòng tủy có hai loại: Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML – Acute myeloid leukemia) và bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (CML – Chronic myeloid leukemia). Hơn một nửa bệnh nhân bạch cầu dòng tủy được phát hiện trên 60 tuổi, với tuổi mắc bệnh trung bình của các bệnh nhân là 64. Hiện nay, việc điều trị cho các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy chủ yếu thường được thực hiện bằng biện pháp hóa trị và ghép tế bào đồng loài. Tuy nhiên tỷ lệ lui bệnh sau hóa trị liệu cũng như thời gian ổn định bệnh đều giảm, đồng thời các tác dụng phụ của việc điều trị này lại tăng đáng kể ở người bệnh lớn tuổi. Do đó, hiện nay nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước đều quan tâm nghiên cứu về nguyên nhân gây bệnh bạch cầu dòng tủy.

Các gen *A20*, *CYLD* mã hóa cho các protein thuộc nhóm DUB (Deubiquitinase) đóng vai trò quan trọng trong điều hòa quá trình tăng sinh và quá trình chết tế bào theo chương trình (apoptosis). Các protein DUB này phân cắt các liên kết peptide hoặc isopeptide giữa protein đích và ubiquitin để làm đảo ngược quá trình sinh học bên trong tế bào. Protein *A20*, *CYLD* tham gia điều hòa âm tính phản ứng miễn dịch và giải phóng các cytokine viêm qua con đường tín hiệu STAT. Khi *A20*, *CYLD* biểu hiện bất thường có thể liên quan đến sự hình thành và phát triển của bệnh bạch cầu và bệnh ung thư hạch.

Gần đây, tỷ lệ người mắc bệnh bạch cầu dòng tủy ngày càng tăng, trong khi đó việc điều trị bệnh lý này còn gặp nhiều khó khăn, đồng thời *A20*, *CYLD* đã được xác định là có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh CLL và ALL. Đây là lý do mà nhiều nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam đang tập trung nghiên cứu đa hình/đột biến và biểu hiện gen *A20*, *CYLD*, biểu hiện viêm và gen tín hiệu liên quan ở bệnh bạch cầu dòng tủy.

Vincristine là thuốc chống ung thư có bản chất alkaloid, được tách chiết từ cây Dừa cạn (*Catharantus roseus*). Vincristine thúc đẩy quá trình apoptosis của một số tế bào ung thư. Chính vì vậy, cùng với việc xác định được các đa hình gen *CYLD*, *A20* ở bệnh bạch cầu dòng tủy thì tiếp tục

đánh giá vai trò của các gen này đối với quá trình tăng sinh và apoptosis của tế bào ung thư máu - K562 khi được xử lý bởi vincristine có thể là một bước tiến mới trong việc tìm ra biện pháp ức chế sự phát triển của các dòng tế bào bệnh bạch cầu dòng tủy. Bên cạnh đó, đại thực bào cũng có vai trò quan trọng trong các phản ứng chống viêm, sửa chữa mô, cân bằng nội môi và đặc biệt là có khả năng ức chế sự phát triển khối u và quá trình apoptosis của tế bào ung thư. Do vậy, tìm ra vai trò của gen *CYLD* hoặc *A20* với chức năng của đại thực bào cũng là nhiệm vụ quan trọng hướng tới xây dựng biện pháp hỗ trợ điều trị bệnh ung thư hiệu quả. Từ những lý do trên, luận án “*Nghiên cứu vai trò của gen A20 và CYLD trong điều hòa chức năng tế bào ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy*” được thực hiện.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

- Xác định đa hình, biểu hiện gen *A20*, *CYLD*, biểu hiện viêm và một số gen tín hiệu liên quan ở bệnh bạch cầu dòng tủy.
- Xác định vai trò của gen *A20*, *CYLD* điều hòa chức năng của tế bào ung thư máu và đại thực bào trên bệnh nhân bạch cầu dòng tủy.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án:

- Xác định một số điểm đa hình/đột biến, biểu hiện gen *A20*, *CYLD*; biểu hiện gen tín hiệu *STAT1*, *STAT3* và nồng độ IL-6, TNF- α ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy.
- Xác định vai trò của gen *A20/CYLD* đối với quá trình tăng sinh và apoptosis của tế bào K562 và chức năng của đại thực bào biệt hóa từ PBMC của người bệnh AML khi được xử lý với fludarabine

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính

Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML) là một bệnh bạch cầu phổ biến ở người trưởng thành. Bệnh AML được đặc trưng bởi sự tăng sinh của các tế bào blast, chủ yếu tồn tại trong tủy xương, dẫn đến quá trình tạo máu bình thường bị ức chế và hiện tượng suy tủy xương. Gần đây, việc điều trị bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính ở người trẻ tuổi đã có những bước tiến đáng kể nhưng việc điều trị cho người bệnh lớn tuổi vẫn còn gặp nhiều trở ngại. Mặc dù đã có những cải thiện trong việc điều trị bệnh nhưng việc tiên lượng tình trạng của bệnh vẫn gặp rất nhiều khó khăn.

1.2. Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính

Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (CML) là một loại ung thư bắt nguồn từ một số tế bào tạo máu có trong tủy xương. Bệnh CML được đặc trưng bởi sự gia tăng của các tế bào bạch cầu hạt đã được biệt hóa. Ban đầu, tế bào bạch cầu hạt tăng lên trong máu ngoại vi nhưng chúng hoạt động tương đối bình thường. Tuy nhiên, khi bệnh tiến triển, các tế bào bạch cầu chưa trưởng thành (nguyên bào tủy) bắt đầu tích tụ trong máu và tủy xương. Sự phát triển quá mức của các nguyên bào tủy làm giảm sự phát triển của các tế bào máu khác, dẫn đến sự thiếu hụt các tế bào hồng cầu và tiểu cầu. Sự thay đổi này tạo ra sự dung hợp gen *BCR-ABL*, từ đó sản xuất quá mức tyrosine kinase gây nên bệnh CML. Các tế bào bạch cầu phát triển trong tủy xương rồi đi vào trong máu và di chuyển tới các bộ phận khác của cơ thể. Bệnh CML phát triển khá chậm và có thể chuyển thành bệnh bạch cầu cấp tính rất nhanh và khó điều trị.

1.3. Giới thiệu chung về enzyme deubiquitinase A20 và CYLD

1.3.1. Protein A20

A20 là protein kích thích yếu tố hoại tử khối u 3, được mã hóa bởi gen *TNFAIP3*. A20 nằm trên nhiễm sắc thể số 6q23.3, trình tự cDNA dài 4.440 bp với khung đọc mở gồm 2.370 Nu mã hóa cho protein chứa 790 axit amin. A20 hoạt động điều hòa âm tính NF- κ B để đáp ứng với nhiều kích thích và được coi là một chất ức chế khối u. Rối loạn chức năng A20 có thể liên quan đến bệnh ác tính tế bào lympho. Hơn thế nữa, các protein liên kết A20 và A20 có thể được sử dụng làm dấu ấn sinh học và là mục tiêu điều trị mới trong các khối u ác tính tế bào lympho.

1.3.2. Protein CYLD

Protein CYLD là enzyme deubiquitinase được mã hóa bởi gen cylindromatosis (*CYLD*). *CYLD* nằm trên nhiễm sắc thể 16q12.1 ở người, có kích thước 60 kb và mã hóa cho enzyme thioesterase chứa 956 amino acid với ba vùng bảo thủ protein-glycine (Cap-Gly) để tương tác với các protein mục tiêu trong con đường tín hiệu NF- κ B. Protein CYLD hoạt động như một chất ức chế khối u nên khi *CYLD* bị đột biến hoặc giảm mức độ biểu hiện sẽ thúc đẩy sự phát triển của các loại khối u. CYLD có vai trò ức chế sự hình thành khối u thông qua sự điều hòa quá trình apoptosis, và hoại tử của tế bào. Những phát hiện này cho thấy CYLD có thể coi là một

dấu ấn sinh học, cũng như là nhân tố để thúc đẩy cho quá trình điều trị bệnh bạch cầu hiệu quả hơn.

1.4. Tín hiệu STAT1 và STAT3

STAT1 tham gia truyền tín hiệu bởi cả IFN loại I và II trong các phản ứng viêm sau khi cơ thể bị nhiễm virus và bảo vệ vật chủ khỏi sự tấn công của vi khuẩn và ký sinh trùng; STAT3 được kích hoạt sẽ thúc đẩy quá trình hình thành bệnh ung thư đầu cổ, các tế bào đa u tủy, một số khối u rắn, bệnh bạch cầu và u lympho.

1.5. Vai trò của Vincristine

Vincristine là một chất được chiết xuất từ cây dừa cạn (*Cantharanthus roseus*) có tác dụng ức chế hiệu quả đối với một số bệnh ung thư. Cơ chế hoạt động của Vincristine được xác định là tương tự với các chất chống ung thư đặc hiệu dựa theo chu kỳ của tế bào. Trong quá trình điều trị, vincristine thường gây độc ở hệ thống thần kinh, rồi giải phóng các chất trung gian cho quá trình tiền viêm như IL-6 và TNF- α . Bằng cách kích hoạt con đường tín hiệu NF- κ B/STAT, vincristine là tác nhân điều hòa một phần hoạt động chống ung thư.

1.6. Tế bào PBMC

Tế bào PBMC là loại tế bào chính trong hệ miễn dịch của cơ thể con người. Tế bào PBMC được sử dụng để nghiên cứu về các bệnh truyền nhiễm, phát triển vaccine, miễn dịch học, khối u ác tính huyết học và liệu pháp cấy ghép. Về cơ bản, các nghiên cứu PBMC trong điều kiện *in vitro* cung cấp những thông tin liên quan đến chức năng tế bào, nhận dạng dấu ấn sinh học và mô hình bệnh. Việc sử dụng PBMC của người để thúc đẩy sự phục hồi của những con chuột bị suy giảm miễn dịch được coi là cơ sở để nghiên cứu hệ thống miễn dịch của người và phản ứng của các tế bào này đối với mầm bệnh, chất độc hoặc ung thư trong mô hình *in vivo*.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

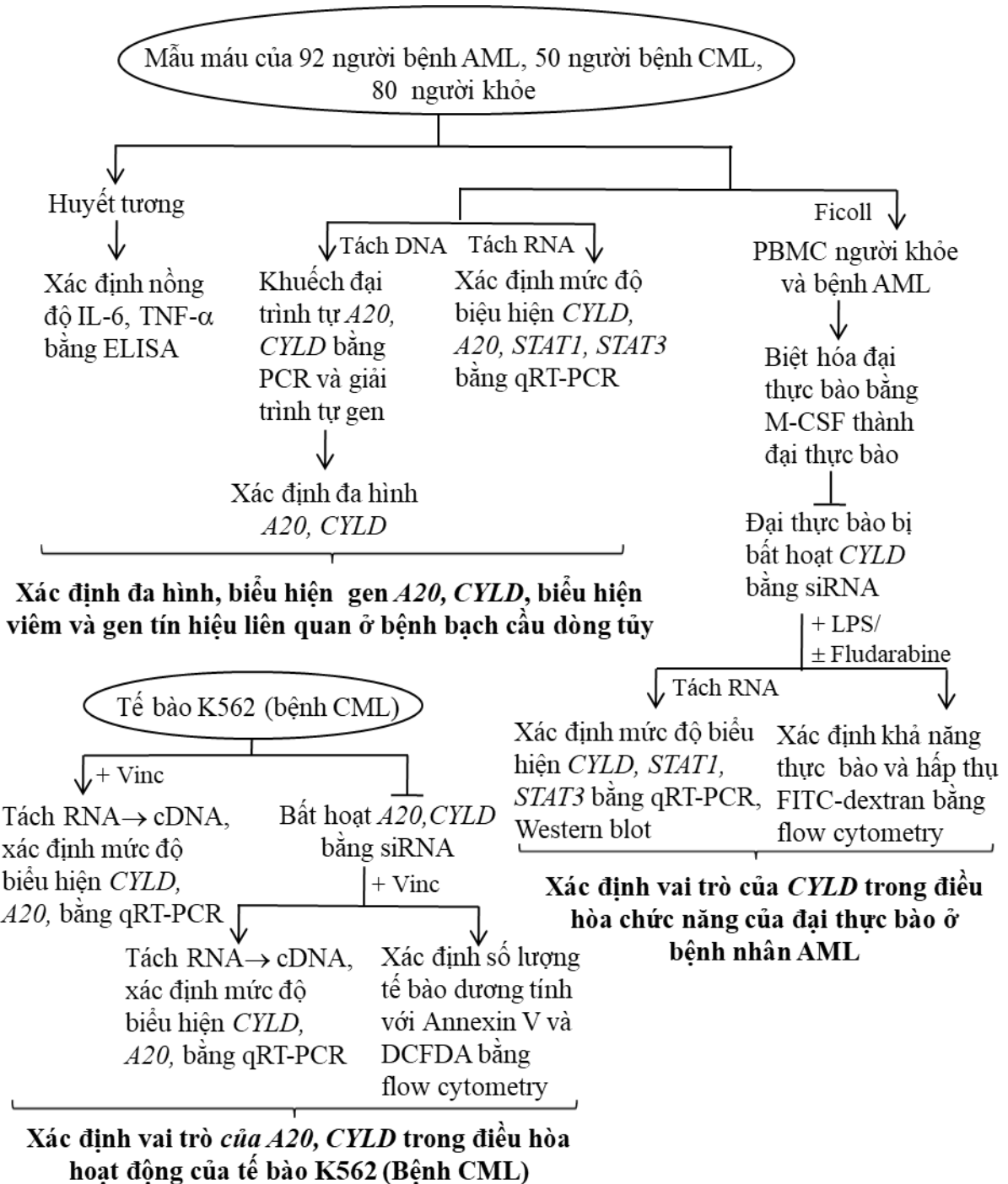
2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 92 bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh AML và 50 bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh CML (nhưng chưa được điều trị). Nhóm đối chứng là 80 người tình nguyện khỏe mạnh.

Các tế bào bạch cầu dòng tủy mạn K562 được mua từ một tổ chức ATCC (American type culture collection – Bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ)

Đại thực bào được biệt hóa từ tế bào PBMC của người khỏe và bệnh nhân mắc bệnh nhân AML.

2.2. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- ✓ Thu thập mẫu
- ✓ Tách chiết DNA và khuếch đại gen *A20/CYLD*
- ✓ Giải trình tự bằng phương pháp Sanger
- ✓ Tách chiết RNA, tổng hợp cDNA và kỹ thuật qRT-PCR
- ✓ Nuôi cấy, xử lý dòng tế bào K562 bởi in-cristine
- ✓ Phân lập và biệt hóa tế bào PBMC sử dụng M-CSF
- ✓ Bất hoạt gen
- ✓ ELISA
- ✓ Western blot
- ✓ Đếm tế bào theo dòng chảy (Flow cytometry)
- ✓ Phân tích số liệu

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.2. Đánh giá đa hình trên gen *CYLD*, *A20*

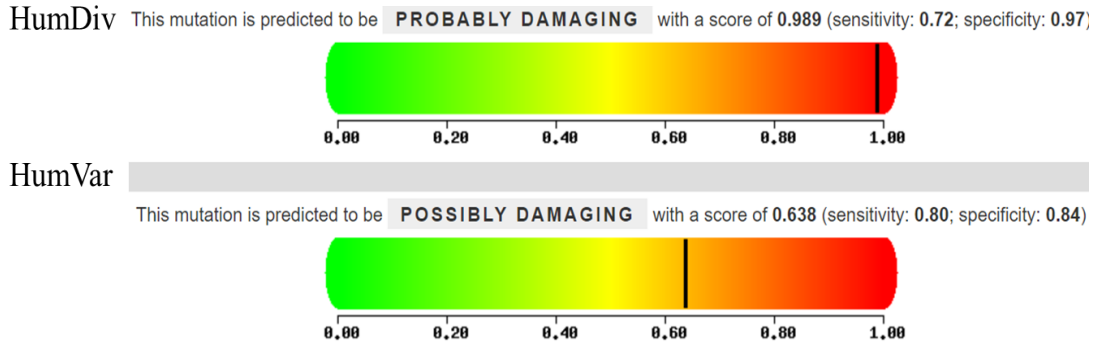
3.2.1. Đa hình gen *CYLD* ở bệnh bạch cầu dòng tủy

3.2.1.1. Đa hình gen *CYLD* ở bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính

Xác định được 4 nucleotide trên exon 16 bị thay đổi, trong đó có 3 SNP (p.Q723H/c.2435 G>C; p.E735K/c.2445 G>A; p.E747K/c.2481 G>A) là SNP không đồng nghĩa khiến cho amino acid cũ bị thay thế bởi amino acid mới (Hình 3.1) và SNP (p.E723E/c.2411 G>A) là SNP đồng nghĩa. Trong số các đa hình này, sự phân bố kiểu gen tại vị trí p.E723E, p.Q731H và p.E735K tuân theo định luật cân bằng HWE trên cả nhóm bệnh, nhóm chứng và trên toàn bộ quần thể nghiên cứu ($p > 0,05$);

Đối với điểm đa hình tại vị trí p.Q731H sự khác biệt đáng kể về kiểu gen GC giữa bệnh nhân AML và nhóm chứng khỏe mạnh được phát hiện khi so sánh với kiểu gen GG ($p = 0,0024$). Bên cạnh đó, tần số allele C cũng cho thấy khả năng liên quan đến giảm nguy cơ mắc bệnh AML cao ($p = 0,0032$).

Để xác định được liệu tác động của SNP không đồng nghĩa trên gen *CYLD* làm thay đổi axit amin đến cấu trúc và chức năng của protein hay không thì nghiên cứu này đã sử dụng công cụ Polyphen-2. Dựa trên kết quả dự đoán có thể nhận thấy, SNP tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* được dự đoán có thể là nguyên nhân gây bệnh (Hình 3.2).



Hình 3.2. Dự đoán khả năng gây bệnh của SNP không đồng nghĩa p.Q731H trên gen *CYLD* bằng Polyphen-2

3.2.1.2. Đa hình gen *CYLD* ở bệnh CML

Xác định được 2 nucleotide trên exon 16 bị thay đổi, trong đó SNP p.Q731H (c.2435 G>C) là SNP không đồng nghĩa khiến cho amino acid cũ bị thay thế bởi amino acid mới và SNP p.V725V (c.2417 T>G) là SNP đồng nghĩa (Hình 3.3). Trong số các đa hình này, sự phân bố kiểu gen tại vị trí p.V725V, p.Q731H tuân theo định luật cân bằng HWE trên toàn bộ quần thể nghiên cứu ($p > 0,05$) (Bảng 3.3).

Đối với điểm đa hình tại p.V725V, kiểu gen TG giữa bệnh nhân CML và nhóm chứng khỏe mạnh được phát hiện là không có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với kiểu gen TT ($p > 0,05$) và tần số allele G không liên quan đến khả năng giảm nguy cơ mắc bệnh CML. Trong khi đó, tại vị trí p.Q731H kiểu gen GC giữa bệnh nhân CML và nhóm chứng khỏe mạnh được phát hiện là có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với kiểu gen GG ($p = 0,0275$). Bên cạnh đó, tần số allele C cũng cho thấy khả năng liên quan đến khả năng tăng nguy cơ mắc bệnh CML cao ($p = 0,0336$).

Dựa trên kết quả dự đoán có thể nhận thấy, SNP tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* cũng được dự đoán là có thể gây bệnh.

3.2.2. Đa hình gen *A20* ở bệnh bạch cầu dòng tủy

3.2.2.1. Đa hình trên gen *A20* ở bệnh AML

Xác định được 4 nucleotide ở exon 7 (p.L335S/c.1303 T>C; p.K337Q/c.1308 A>C; p.K354N/c.1361 G>T; p.S376T/c.1425 T>A) bị thay đổi và đều là SNP không đồng nghĩa khiến cho amino acid cũ bị thay thế bởi amino acid mới (Hình 3.4). Sự phân bố kiểu gen tại vị trí p.L335S, p.K337Q, p.K354N và p.S376T đều tuân theo định luật cân bằng HWE trên nhóm bệnh và trên toàn bộ quần thể nghiên cứu ($p > 0,05$) (Bảng 3.5).

Bên cạnh đó, điểm đa hình tại 4 vị trí p.L335S, p.K337Q, p.K354N và p.S376T, kiểu gen TC, AC, GT và TA không có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với kiểu gen TT, AA, GG và TT tương ứng ($p < 0,05$), đồng thời tần số allele C (p.L335S), C (p.K337Q), T (p.K354N) và A (p.S376T) cũng không liên quan đến khả năng mắc bệnh AML.

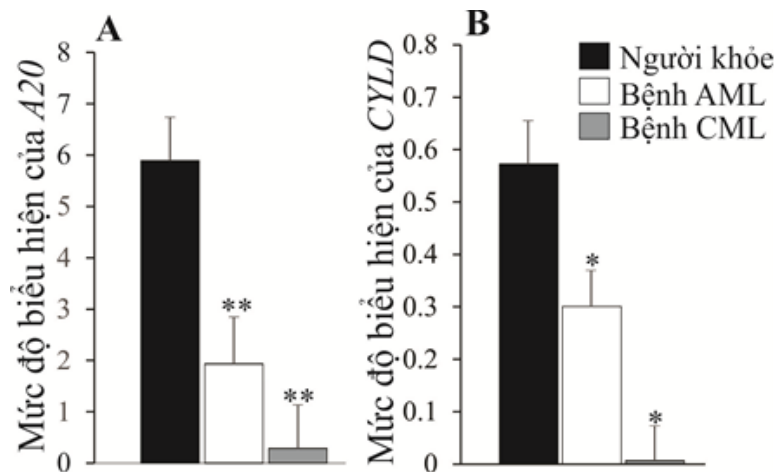
3.2.2.2. Đa hình trên gen A20 ở bệnh CML

Xác định được 2 nucleotide trên exon 7 (rs374721883/p.G456V; rs200878487/p.S466G) bị thay đổi và đều là SNP không đồng nghĩa khiến cho amino acid cũ bị thay thế bởi amino acid mới (Hình 3.5). Bên cạnh đó, sự phân bố kiểu gen tại vị trí rs374721883 và rs200878487 đều tuân theo định luật cân bằng HWE trên nhóm bệnh và toàn bộ đối tượng nghiên cứu ($p > 0,05$) (Bảng 3.7).

Đối với điểm đa hình tại rs374721883 và rs200878487, sự đánh giá mối liên quan giữa kiểu gen với bệnh CML chỉ được kiểm tra ở kiểu hình gen trội vì kiểu gen TT và GG tương ứng không có trong quần thể nghiên cứu. Kiểu gen GT (rs374721883), CG (rs200878487) giữa bệnh nhân CML và nhóm chứng khỏe mạnh được phát hiện là không có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với kiểu gen GG (rs374721883), CC (rs200878487) ($p > 0,05$) và tần số allele cũng không liên quan đến khả năng mắc bệnh CML (Bảng 3.9).

3.3. Mức độ biểu hiện gen ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

3.3.1. Biểu hiện gen *CYLD*, *A20* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy



Hình 3.6 Biểu hiện của *A20*, *CYLD* trên bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

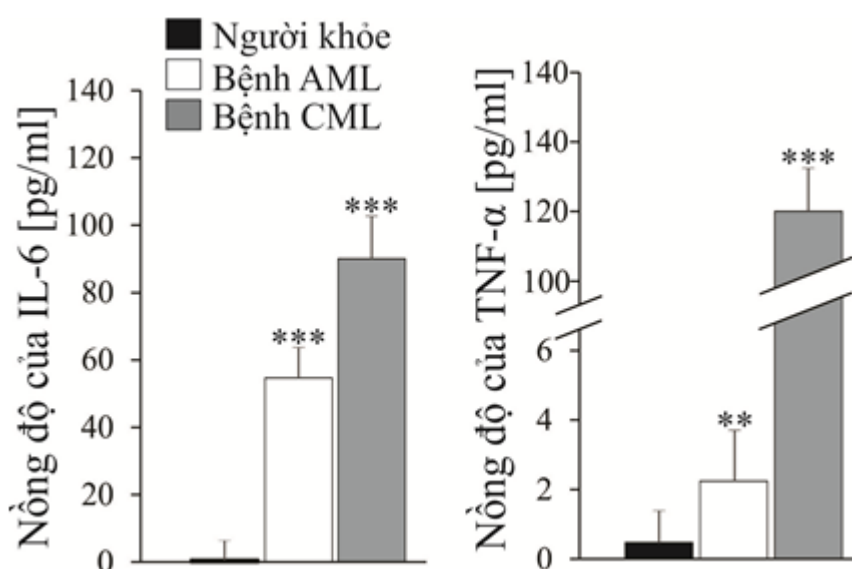
* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm người khỏe và nhóm bệnh nhân

Mức độ biểu hiện mRNA của gen *A20* giảm khoảng 3 lần ở các bệnh nhân bạch cầu tủy cấp và 39 lần ở các bệnh nhân bạch cầu tủy mạn so với người khỏe (Hình 3.6A). Tương tự như vậy, biểu hiện mRNA của gen *CYLD* ở người khỏe cao hơn ở các bệnh nhân bạch cầu tủy cấp và bệnh nhân bạch cầu tủy mạn lần lượt khoảng 2 lần và 89 lần (Hình 3.6B). Như vậy, ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy, biểu hiện của các gen *A20* và *CYLD* đều thấp hơn so với ở người khỏe và sự khác biệt này là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$ và $p < 0,05$)

3.3.2. Biểu hiện gen *STAT1*, *STAT3* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

Mức độ biểu hiện của gen *STAT1*, *STAT3* đều tăng ở bệnh nhân AML so với nhóm người khỏe. Tuy nhiên, sự thay đổi này là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tương tự như vậy, mặc dù các dữ liệu cho thấy, biểu hiện của *STAT1* tăng, còn biểu hiện của *STAT3* giảm ở các bệnh nhân CML so với nhóm người khỏe, nhưng sự khác biệt này cũng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.3.3. Nồng độ cytokine *IL-6*, *TNF- α* được tiết ra ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy



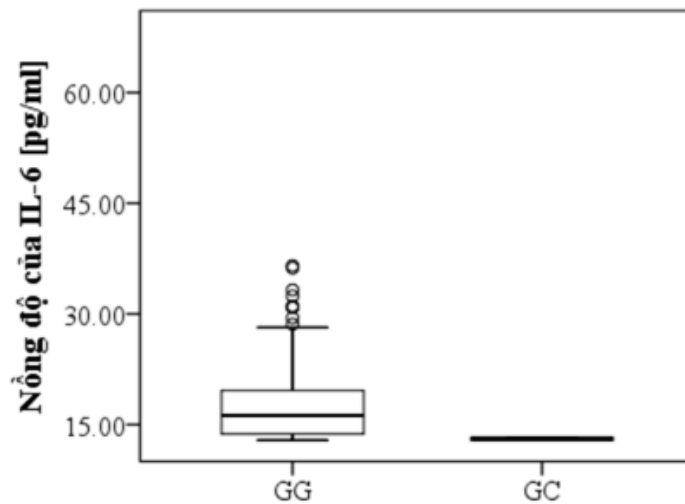
Hình 3.8. Mức độ biểu hiện IL-6, TNF- α ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy
 ** ($p < 0,01$) và *** ($p < 0,001$): chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm người khỏe và nhóm bệnh nhân

Nồng độ IL-6 tăng ở cả bệnh nhân AML và CML lần lượt khoảng 84 và 138 lần so với nhóm người khỏe. Sự thay đổi này được ghi nhận là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tương tự như vậy, nồng độ TNF- α được tiết ra ở

các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy (AML và CML) tăng cao lần lượt khoảng 5 và 269 lần so với nhóm người khỏe. Sự thay đổi này cũng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.4. Mối liên quan giữa đa hình nucleotide đơn, biểu hiện của gen và nồng độ cytokine ở bệnh bạch cầu dòng tủy

Dựa trên kiểm định Mann-Whitney U, chúng tôi xác định được mối liên quan giữa đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* với nồng độ IL-6 ở các bệnh nhân AML ($p < 0,05$) (Bảng 3.11, Hình 3.9), nhưng không tìm được mối liên quan giữa sự phân bố kiểu gen của đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* và biểu hiện gen *CYLD* (Bảng 3.9); biểu hiện gen tín hiệu *STAT1* (Bảng 3.10) và nồng độ TNF- α ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy.



Hình 3.9. Mối liên hệ giữa đa hình tại vị trí p.G731H trên gen *CYLD* và nồng độ IL-6 ở bệnh nhân AML

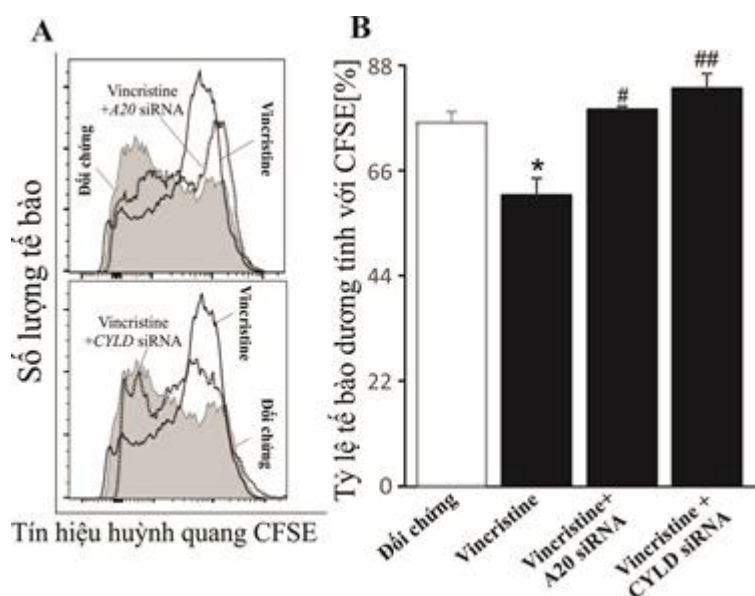
Bên cạnh đó, dựa trên kiểm định Spearman cũng cho thấy, không tìm thấy mối liên hệ nào giữa biểu hiện gen *A20*, *CYLD* và gen tín hiệu *STAT1* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy (AML và CML) (Bảng 3.12).

3.5. Xác định vai trò của *A20*, *CYLD* đối với quá trình tăng sinh và apoptosis của tế bào K562

3.5.1. Xác định vai trò của gen *A20*, *CYLD* đối với sự tăng sinh của tế bào K562

Trong nghiên cứu này, khi tế bào K562 được xử lý bởi vincristine ở các nồng độ khác nhau (60-300 nM) thì mức độ biểu hiện mRNA của gen *A20*, *CYLD* đều cao hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng, đặc biệt khi tế bào này được xử lý bởi vincristine ở nồng độ 300 nM (Hình 3.10). Dựa vào

biểu đồ huỳnh quang CFSE thu được từ các tế bào K562 có thể nhận thấy, sự tăng sinh của K562 giảm đáng kể khi được xử lý bởi vincristine 300nM. Tuy nhiên, trong trường hợp tế bào bị làm bất hoạt A20, *CYLD* thì tác dụng ức chế của vincristine đối với sự tăng sinh của tế bào không còn nữa (Hình 3.11). Như vậy, vincristine ức chế sự tăng sinh tế bào thông qua sự biểu hiện của gen A20, *CYLD*.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của A20, *CYLD* đến sự tăng sinh của tế bào K562

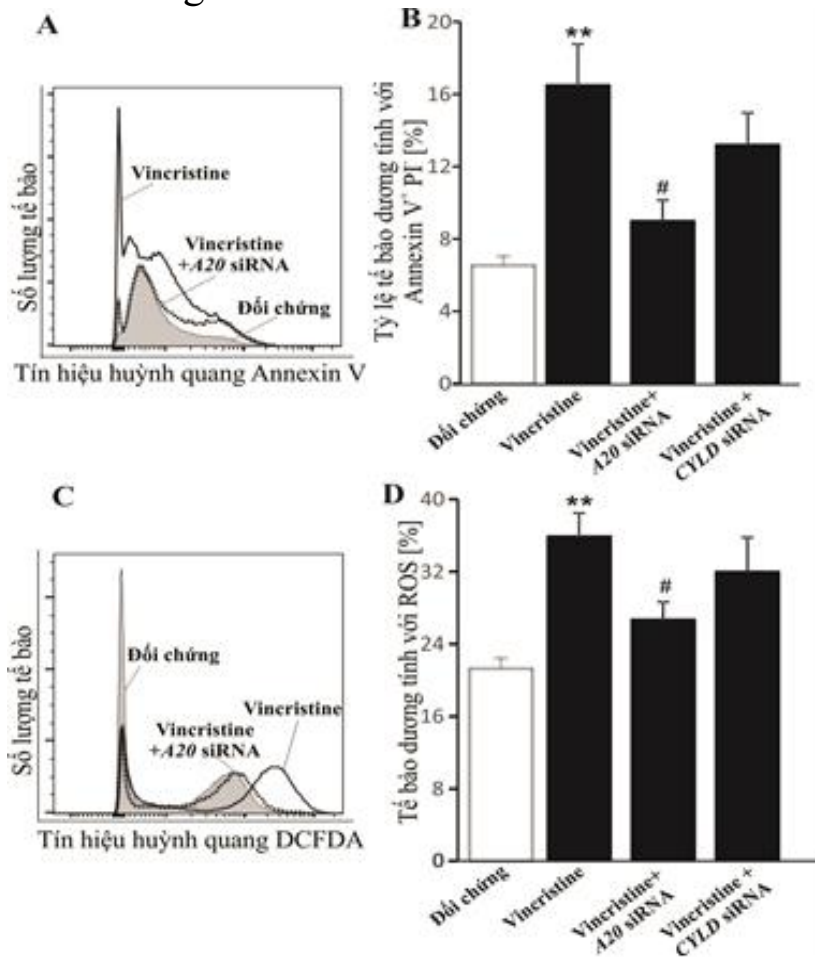
* ($p < 0.05$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tế bào K562 được và không được xử lý bởi vincristine; # ($p < 0.05$) và ## ($p < 0.01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tế bào K562 xử lý với vincristine trong trường hợp bất hoạt và không bất hoạt A20, *CYLD*

3.5.2. Xác định vai trò của A20, *CYLD* với quá trình apoptosis của tế bào K562

Dựa vào biểu đồ huỳnh quang cho thấy, việc xử lý bằng vincristine (300 nM) đã làm tăng cường đáng kể số lượng tế bào K562 dương tính với Annexin V⁺/PI⁻ và sự tích tụ ROS. Tuy nhiên, khi tế bào K562 bị làm bất hoạt gen A20 thì số lượng tế bào này dương tính với kháng thể Annexin V⁺/PI⁻ và sự tích tụ ROS giảm đáng kể so với tế bào không bị bất hoạt gen và sự thay đổi được ghi nhận là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), còn khi gen *CYLD* bị bất hoạt thì hiệu quả làm giảm số lượng tế bào dương tính với Annexin V⁺/PI⁻ và sự tích tụ ROS không còn rõ ràng nữa.

Như vậy, biểu hiện của gen A20 có mối liên hệ với quá trình tăng sinh, apoptosis của tế bào K562, còn biểu hiện của gen *CYLD* cũng có thể

có mối liên hệ với các quá trình này nhưng mối liên hệ này cần được tiếp tục nghiên cứu và đánh giá rõ hơn.



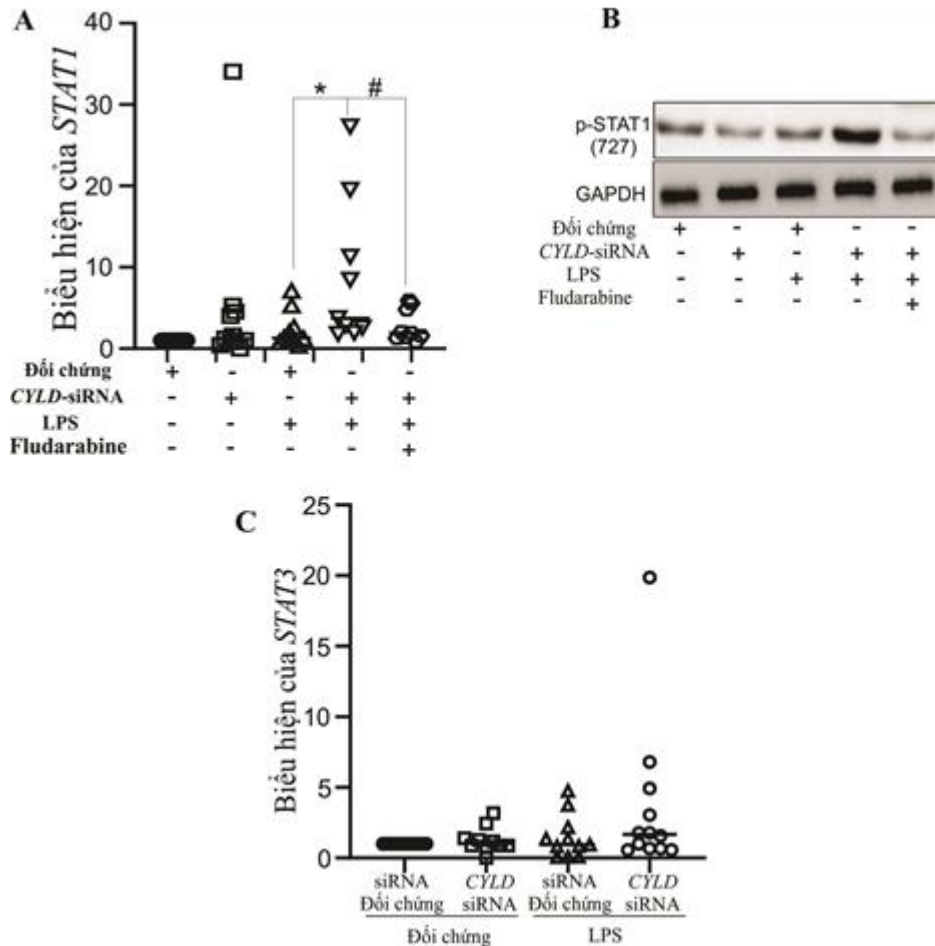
Hình 3.12. Ảnh hưởng của A20, CYLD đến khả năng sống sót của tế bào K562

** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tế bào K562 được và không được xử lý bởi vincristine; # ($p < 0,05$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tế bào K562 được xử lý với vincristine trong trường hợp bất hoạt và không bất hoạt A20, CYLD

3.6. Xác định vai trò của gen *CYLD* đối với đại thực bào được biệt hóa bởi M-CSF thông qua tín hiệu STAT1

3.6.1. Vai trò của *CYLD* đối với đại thực bào được biệt hóa bởi M-CSF

Các tế bào sau khi được biệt hóa từ tế bào PBMC sẽ được làm bất hoạt gen *CYLD* bằng phương pháp can thiệp siRNA nhằm ngăn chặn sự biểu hiện của gen *CYLD* với tính đặc hiệu và hiệu quả cao, từ đó đánh giá ảnh hưởng của gen *CYLD* đến sự biểu hiện của các gen tín hiệu khác.



Hình 3.13. Ảnh hưởng của CYLD đến tín hiệu STAT1 trên đại thực bào (M-HP)

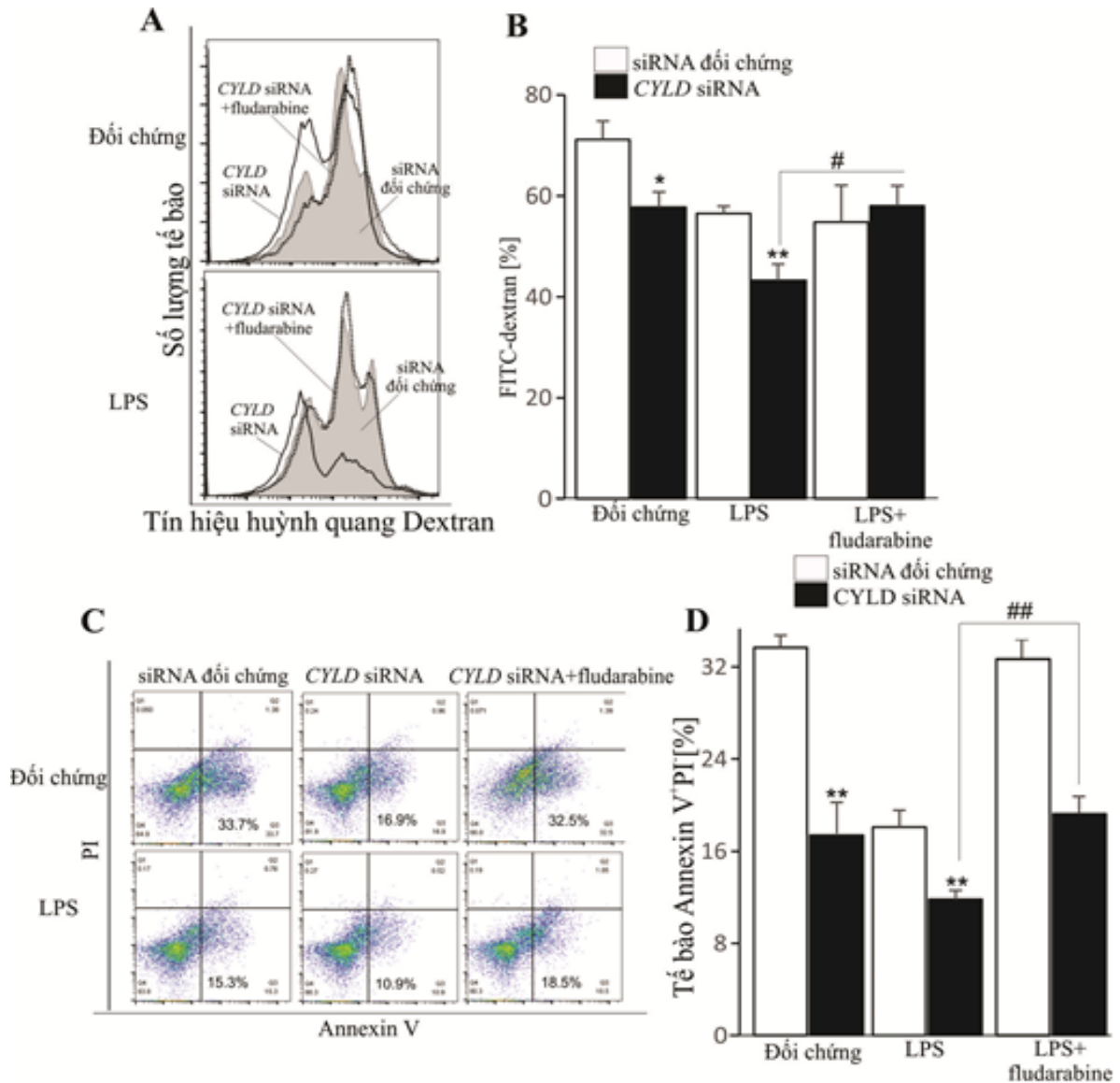
* ($p < 0,05$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa M-HP bị bất hoạt và không bất hoạt CYLD; # ($p < 0,05$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa M-HP bị bất hoạt hoặc không bất hoạt CYLD so với các tế bào này khi được kích hoạt bởi LPS

Kết quả ghi nhận ở hình 3.13A-B cũng cho thấy, việc các đại thực bào được xử lý bởi CYLD siRNA làm tăng đáng kể mức độ biểu hiện mRNA của STAT1 và quá trình phosphoryl hóa STAT1 khi được kích hoạt bởi LPS, nhưng không làm ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của STAT3 (Hình 3.13C). Tuy nhiên khi đại thực bào được xử lý với với fludarabine thì hiệu quả làm tăng mức độ biểu hiện mRNA của STAT1 giảm xuống. Do đó, biểu hiện của CYLD đã góp phần đáng kể trong việc ức chế kích hoạt tín hiệu STAT1 trong đại thực bào.

3.6.2. Vai trò của CYLD đối với các chức năng của đại thực bào thông qua tín hiệu STAT1

Kết quả nghiên cứu thể hiện ở hình 3.14A-B cho thấy, bình thường tỷ lệ phần trăm đại thực bào biểu hiện CD40⁺ và CD86⁺ lần lượt là 3,9%

và 4,22%, nhưng khi được kích hoạt bởi LPS thì tỷ lệ phần trăm tế bào biểu hiện các dấu ấn sinh học này tăng cao. Đặc biệt hơn, khi không có sự biểu hiện của *CYLD* thì tỷ lệ này còn tăng cao hơn và đạt lần lượt khoảng 22,1% ($CD40^+$), 26% ($CD86^+$). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện $CD40^+$ và $CD86^+$ của đại thực bào trưởng thành bị bất hoạt gen *CYLD* lại giảm đáng kể khi được xử lý với fludarabine.



Hình 3.16. Ảnh hưởng của CYLD đến chức năng hoạt động của M-HP qua tín hiệu STAT1

*($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ đại thực bào M-HP bị bất hoạt và không bất hoạt CYLD dương tính với FITC-dextran và Annexin V⁺/PI⁺; #($p < 0,05$) và ##($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa M-HP được kích hoạt bởi LPS và bất hoạt CYLD trong trường hợp xử lý hay không xử lý với fludarabine dương tính với FITC-dextran và Annexin V⁺/PI⁺

Tương tự như vậy, khi được kích hoạt bởi LPS, các đại thực bào đều tăng khả năng giải phóng IL-6 và nồng độ cytokine này còn cao hơn khi đại thực bào bị làm bất hoạt gen *CYLD* so với các tế bào không được xử lý với *CYLD* siRNA. Trong khi đó nồng độ IL-6 không có sự khác biệt giữa đại thực bào bị bất hoạt gen và không bị bất hoạt *CYLD* khi fludarabine có mặt trong môi trường nuôi cấy tế bào (Hình 3.15).

Trong nghiên cứu này, việc chuyển nạp *CYLD* siRNA vào đại thực bào làm giảm đáng kể sự hấp thu FITC-dextran (Hình 3.16) và ngăn chặn một phần quá trình thực bào của tế bào AML (Hình 3.17) cũng khẳng định rõ hơn về khả năng thực bào của đại thực bào trưởng thành. Tuy nhiên, với sự hiện diện của fludarabine, vai trò của *CYLD* đối với sự hấp thu FITC-dextran của các đại thực bào cũng loại bỏ (Hình 3.16).

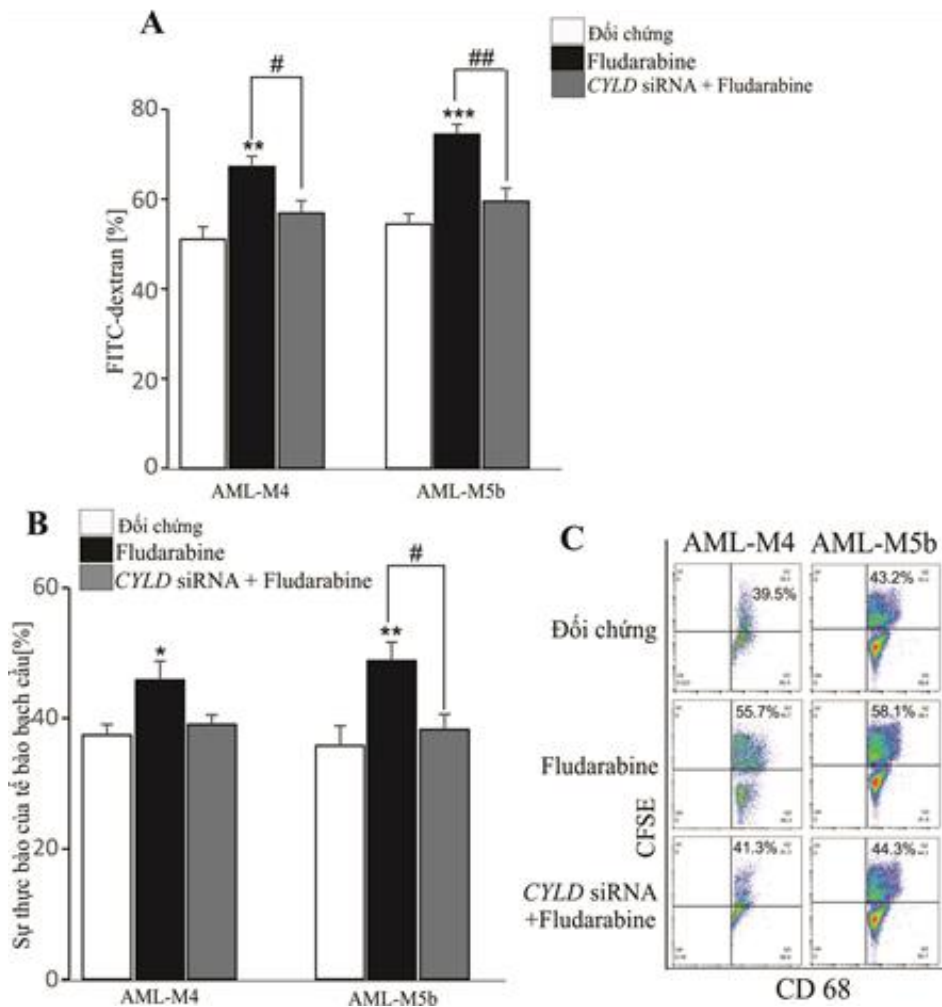
Bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy có thể xác định được tỷ lệ tế bào dương tính với Annexin V⁺/PI⁻ và qua đó có thể biết được khả năng sống sót của các tế bào này. Cụ thể, khi đại thực bào được chuyển nạp *CYLD* siRNA làm giảm đáng kể số lượng tế bào dương tính với Annexin V⁺/PI⁻, tuy nhiên hiệu quả này bị loại bỏ khi có sự hiện diện của fludarabine (Hình 3.16C-D). Như vậy, *CYLD* thúc đẩy sự hấp thu FITC-dextran và quá trình apoptosis của đại thực bào khi có sự biểu hiện của tín hiệu *STAT1*.

3.6.3. Xác định vai trò của *CYLD* đối với quá trình thực bào của đại thực bào ở bệnh AML

Khi đại thực bào M-AML được xử lý bởi fludarabine cho thấy, mức độ biểu hiện của *CYLD* tăng đáng kể (Hình 3.17A) và trong trường hợp gen *STAT1* bị bất hoạt, số lượng đại thực bào được biệt hóa từ các thể của bệnh AML biểu hiện CD11b⁺CD68⁺CD86⁺ và CD11b⁺CD68⁺CD40⁺ là không thay đổi. Tương tự như vậy, nồng độ IL-6 và TNF- α do M-AML tiết ra bởi các thể là không thay đổi trong trường hợp tế bào được xử lý với fludarabine. Các thông tin này đã khẳng định giữa biểu hiện *CYLD* và các phản ứng viêm ở bệnh nhân AML không có mối liên quan. Hơn thế nữa, trong khi sự hấp thu FITC-dextran của M-AML tương đương với sự hấp thu của của M-HP (Hình 3.17B) thì quá trình thực bào do M-AML lại thấp hơn đáng kể so với M-HP (Hình 3.17C-D). Các dữ liệu này cho thấy hoạt động thực bào của M-AML đã bị ảnh hưởng do sự hình thành của bệnh. Do vậy, với những thông tin về chức năng hoạt động của *STAT1*, cũng

như mối liên hệ với CYLD thì khi làm bất hoạt *STAT1* có cải thiện hoạt động của M-AML trong trường hợp được xử lý bởi fludarabine hay không?

Kết quả ghi nhận được ở hình 3.18A đã cho thấy, sự hấp thụ FITC-dextran của M-AML (thể M4/M5b) đã tăng đáng kể so với M-HP khi được xử lý với fludarabine, tuy nhiên hiệu ứng này sẽ bị loại bỏ khi đại thực bào được chuyển nạp *CYLD* siRNA (Hình 3.18A). Ngoài ra, khi xử lý bằng fludarabine cũng đã kích thích việc M-AML loại bỏ các tế bào bạch cầu rất nhiều đối với thể M5b và chỉ một phần đối với thể M4 (hình 3.18B-C). Như vậy, *CYLD* đóng vai trò quan trọng đối với quá trình thực bào của M-AML (M4/M5b).



Hình 3.18. Ảnh hưởng của *CYLD* đối với sự thực bào của M-AML

*($p < 0,05$), **($p < 0,01$) và *** ($p < 0,001$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa đại thực bào M-AML trong việc hấp thụ FITC-dextran và sự thực bào tế bào bạch cầu khi được xử lý và không được xử lý bởi fludarabine. #($p < 0,05$) và ## ($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa M-AML bị làm bất hoạt và không bất hoạt *CYLD* trong việc hấp thụ FITC-dextran và sự thực bào tế bào bạch cầu khi được xử lý bởi fludarabine

CHƯƠNG IV. BÀN LUẬN

4.1. Đánh giá đa hình, biểu hiện gen *A20*, *CYLD* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy

4.1.1. Đánh giá đa hình trên gen *A20*/*CYLD*

Protein *A20*, *CYLD* được biết đến là hai enzyme DUB đóng vai trò quan trọng trong việc phân cắt chuỗi polyubiquitin ở các protein mục tiêu nhằm ức chế sự hoạt động của các con đường tín hiệu NF- κ B để đáp ứng lại được các tín hiệu kích thích, từ đó thúc đẩy sự phát triển, tăng sinh và quá trình apoptosis của tế bào. Do đó, nghiên cứu xác định các bất thường trên gen *A20* và *CYLD* ở các bệnh, đặc biệt là bệnh ung thư được thực hiện nhằm tìm ra cơ chế bệnh sinh của bệnh, đồng thời xây dựng biện pháp điều trị bệnh hiệu quả.

Một số nghiên cứu về *A20* ở bệnh viêm đa khớp dạng thấp đã chứng minh mối liên quan giữa một số SNP với nguy cơ bệnh tật. Nghiên cứu toàn bộ hệ gen người đã chỉ ra rằng, các SNP của gen *A20* có mối tương quan với khả năng nhạy cảm của các bệnh lý gây viêm và bệnh tự miễn ở người. Do chức năng chống viêm mạnh của *A20* nên các SNP của gen này đều liên quan đến bệnh và làm giảm khả năng biểu hiện hoặc làm giảm chức năng của *A20*. Đa hình đơn nucleotide (SNP) trên gen *A20* làm giảm khả năng liên kết của *A20* với các tiểu đơn vị NF- κ B, từ đó dẫn đến giảm biểu hiện chức năng *A20*, đồng thời dẫn đến cơ chế bệnh sinh của bệnh tự miễn và ung thư.

Năm 2002, Gutierrez sau khi phân tích đột biến dựa trên DNA của bạch cầu, cũng như DNA và RNA của khối u của một gia đình bốn thế hệ người Đức đều cho thấy đột biến lệch khung trên gen *CYLD* (2253delG). Các nghiên cứu về gen *CYLD* đều cho rằng *CYLD* được biểu hiện nhiều trong quá trình nguyên phân và nó có tham gia vào các chu kỳ tế bào. Những phát hiện này là tiền đề để Yunfan Yang và cộng sự (2015) khám phá ra vai trò tiềm năng của *CYLD* trong việc điều chỉnh độ nhạy của tế bào bạch cầu với các loại thuốc nhắm mục tiêu vi ống. Sự rối loạn của *CYLD* đã được chứng minh là một trong những yếu tố thúc đẩy sự tiến triển của bệnh bạch cầu lympho cấp tính và mạn tính. Chức năng của *CYLD* trong việc ngăn tế bào lympho khỏi sự hình thành khối u thông qua sự điều hòa quá trình apoptosis, và hoại tử của tế bào.

Trong nghiên cứu này đã tìm ra một số điểm đa hình trên gen *A20*, *CYLD* ở bệnh bạch cầu dòng tủy. Cụ thể là 4 điểm đa hình trên gen *CYLD* ở bệnh AML (p.E723E/c.G2411A; p.E731H/c.G2435C; p.E735H/c.G2445A và p.E747K/c.G2481A) và 2 điểm đa hình trên gen này ở bệnh CML (p.V725V/c.T2417G; p.Q731H/c.G2435C); 4 điểm đa hình trên gen *A20* ở bệnh AML (p.L335S/c.T1303C; p.K337Q/c.A1308C; p.K354N/c.G1361T; p.S376T/c.T1425A) và 2 điểm hình trên gen này ở bệnh CML (rs37471883/p.G456V; rs200878487/p.S466R). Trong đó, SNP rs200878487/p.S466R đã được Yuli (2016) xác định nằm ở exon 7 trên gen *A20* và có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy miệng; SNP rs374721883/p.G456V cũng đã được tìm thấy và ghi nhận là một đột biến trên gen *A20* ở bệnh nhân u lympho tế bào vỏ (Bảng sáng chế quốc tế, số WO 2016/071770); Các SNP p.E723E/c/G2411A; p.E731H/c.G2435C và p.E735K/c.G2445A cũng đã được Đỗ Thị Trang và cộng sự (2022) khẳng định là những đột biến trên gen *CYLD* ở các bệnh nhân tăng hồng cầu vô căn; Còn các SNP còn lại (p.V725V/c.T2417G; p.L335S/c.T1303C; p.K337Q/c.A1308C; p.K354N/c.G1361T; p.S376T/c.T1425A) đều là những SNP mới. Trong số các đa hình này, chỉ có đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* là có sự khác biệt đáng kể về kiểu gen GC giữa bệnh nhân bạch cầu dòng tủy và nhóm người khỏe mạnh khi so sánh với kiểu gen GG. Đồng thời tần số allele C cũng có liên quan đến khả năng giảm nguy cơ mắc bệnh bạch cầu dòng tủy. Bên cạnh đó, dựa trên kết quả phân tích bằng phần mềm PolyPhen-2 nhằm dự đoán khả năng ảnh hưởng của điểm đa hình/đột biến tới cấu trúc và chức năng protein đã cho thấy, tại điểm đa hình c.G2435C đã làm thay đổi amino acid Glutamine (Q) ở vị trí 731 thành Histidine (H) trong chuỗi protein, đồng thời vị trí này có mức ảnh hưởng tương đối cao đến cấu trúc và chức năng protein với điểm số tin cậy HumDiv và HumVar đạt giá trị lần lượt là 0,989 và 0,638. Kết quả này bước đầu đã cung cấp những thông tin hữu ích nhằm thúc đẩy quá trình phát hiện bệnh và thậm chí góp phần tìm ra liệu pháp điều trị bệnh hiệu quả hơn trong tương lai.

4.1.2. Mức độ biểu hiện gen ở bệnh bạch cầu dòng tủy

Trong tế bào B, *A20* hạn chế sự kích hoạt của các con đường tín hiệu bởi những chất cảm ứng sinh lý liên quan đến sự xâm nhập của các mầm bệnh vào cơ thể. Ở chuột già, khi *A20* bị bất hoạt trong tế bào B có thể gây

ra hội chứng viêm với các biểu hiện tự miễn dịch như viêm mạn tính kéo dài, nồng độ IL-6 tăng cao, tế bào huyết tương tăng đáng kể và sự xuất hiện của các thể tự kháng đặc hiệu. Do vậy, khi tế bào B phản ứng nhanh hơn với các kích thích từ môi trường do chức năng A20 bị giảm đi đã cho thấy, mối tương quan giữa các đột biến gen di truyền hoặc đa hình trong A20 và các bệnh tự miễn dịch khác ở người.

CYLD là enzyme DUB được tìm thấy đầu tiên trong các khối u hình trụ lành tính, nhưng gần đây CYLD được ghi nhận là có vai trò điều chỉnh con đường truyền tín hiệu, tham gia vào nhiều quá trình sinh lý và bệnh lý. Từ đó gây ra quá trình apoptosis và ức chế sự hình thành khối u. Ngoài ra, sự biểu hiện *CYLD* được điều chỉnh giảm trong các bệnh ung thư phổi, ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư biểu mô tế bào gan và các khối u rắn khác. Hiện nay, các nghiên cứu về CYLD trong các khối u ác tính về huyết học vẫn còn rất hạn chế. Sự vắng mặt của CYLD có thể là dấu hiệu tiên lượng về tình trạng của một số khối u ác tính về huyết học. Cho đến nay, cơ chế điều hòa của CYLD đối với chức năng hoạt động của tế bào vẫn chưa rõ ràng mà cần được tiếp tục nghiên cứu thêm. Làm sáng tỏ được cơ chế điều chỉnh con đường truyền tín hiệu của chúng có thể giúp xây dựng liệu pháp nhắm mục tiêu phân tử đối với các khối u ác tính về huyết học.

Như vậy, các nghiên cứu trên các bệnh nhân, đặc biệt là bệnh nhân ung thư, mức độ biểu hiện gen A20, *CYLD* thường giảm. Trong nghiên cứu này, biểu hiện gen A20, *CYLD* cũng giảm đáng kể ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy.

Các gen thuộc họ *STAT* được nghiên cứu rộng rãi trong nhiều loại bệnh và sự biểu hiện của chúng thường tăng lên ở nhiều bệnh nhân ung thư. Gen *STAT1* có mức độ biểu hiện phụ thuộc vào quá trình phosphoryl hóa tyrosine và khi được biểu hiện thì chúng có vai trò ức chế sự phát triển của khối u và thúc đẩy quá trình chết của tế bào. Ở chuột thiếu STAT1 cho thấy, khối u phát triển mạnh hơn so với nhóm chứng là những con chuột khỏe mạnh, đồng thời khi đó chuột cũng sẽ nhạy cảm hơn với các bệnh do virus gây ra và không phản ứng lại được với các tác động của virus, thậm chí là tử vong trong khi lượng virus này không ảnh hưởng đến cơ thể bình thường. Trong khi đó STAT3 và STAT5 là hai protein quan trọng liên quan đến sự phát triển của bệnh ung thư. Kích hoạt STAT3/5 liên tục sẽ thúc đẩy quá trình viêm mạn tính, làm tăng tính nhạy cảm của các tế bào

khỏe mạnh với các chất sinh ung thư. Bên cạnh đó, theo Giang và cộng sự (2021), gen *STAT1* có mức độ biểu hiện đều cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng và sự khác biệt này đối có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, biểu hiện của gen *STAT1*, *STAT3* ở bệnh nhân bạch cầu dòng tủy lại không có sự thay đổi đáng kể so với nhóm người khỏe mạnh.

Viêm là quá trình thúc đẩy sự phát triển của khối u thông qua tác động trực tiếp hoặc gián tiếp của cytokine, chemokine, và các yếu tố tăng trưởng trên tế bào khối u. Trong các tế bào máu bình thường, sự kích hoạt các thụ thể bề mặt tế bào bởi cytokine, chemokine và các yếu tố tăng trưởng có thể điều chỉnh hoạt động của con đường dẫn truyền tín hiệu. Tuy nhiên, một số báo cáo đã khẳng định rằng, sự bất thường trong con đường tín hiệu có thể gây ra bệnh bạch cầu và cytokine được coi nhân tố có tác động sâu sắc đến sự tiến triển của các khối u ác tính như bệnh bạch cầu dòng tủy. Trong khi các chất trung gian gây viêm như $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ và $IL-6$ có xu hướng tăng ở bệnh nhân AML, còn các chất trung gian chống viêm như $TGF-\beta$ và $IL-10$ dường như cản trở sự tiến triển của bệnh AML.

Theo Beatriz và cộng sự, nồng độ các cytokine tiền viêm như $IL-6$ và $TNF-\alpha$ hay cytokine kháng viêm $IL-10$ tăng cao ở các bệnh nhân AML thuộc cả 2 nhóm bệnh nhân trên 65 tuổi và dưới 65 tuổi. Nồng độ $IL-6$ thấp và $IL-10$ cao được coi là yếu tố tiên lượng thuận lợi cho khả năng sống sót ở bệnh nhân AML. Tuy nhiên, sự tương tác giữa các cytokine tiền viêm và kháng viêm ở AML cũng có thể kích thích đến sự tăng sinh, tồn tại và kháng thuốc của các tế bào bạch cầu. Bên cạnh đó, Nievergall và cộng sự cũng đã cho biết, nồng độ $TNF-\alpha$ và $IL-6$ trong huyết thanh cao được coi là dấu ấn sinh học trong việc chẩn đoán tình trạng bệnh CML. $IL-2$ và $IL-6$ trong huyết thanh của CML tăng đáng kể so với nhóm đối chứng. Tương tự như vậy, trong nghiên cứu này, nồng độ $IL-6$ và $TNF-\alpha$ được xác định là tăng cao đáng kể ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy so với nhóm người khỏe. Điều này chứng tỏ, ở các bệnh nhân này quá trình viêm xảy ra khá nghiêm trọng, từ đó có thể khiến cho hệ thống miễn dịch của bệnh nhân suy yếu.

Như vậy, các kết quả đạt được về đa hình gen *A20*, *CYLD*, mức độ biểu hiện của gen *A20*, *CYLD* đều giảm ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy so với nhóm người khỏe mạnh, cũng như nồng độ cytokine $IL-6$ và

TNF- α tăng cao ở các bệnh nhân này là những thông tin cần thiết cho việc tiếp tục phân tích mối liên hệ giữa chúng, từ đó có thể xác định cơ chế bệnh sinh của bệnh bạch cầu dòng tủy.

4.1.3. Mối liên quan giữa đa hình nucleotide đơn, biểu hiện gen *A20*, *CYLD*, *STAT1*, *STAT3* và nồng độ cytokine ở bệnh bạch cầu dòng tủy

A20, *CYLD* là protein DUB đóng vai trò điều hòa các con đường tín hiệu khác nhau nhằm điều chỉnh các quá trình sinh lý bên trong cơ thể, từ phản ứng miễn dịch và phản ứng viêm đến sự tiến triển của chu trình tế bào, quá trình sinh tinh và tạo xương. Cụ thể, *A20*, *CYLD* điều chỉnh làm giảm tín hiệu NF- κ B. Trong đó họ các yếu tố phiên mã đóng vai trò trung gian cho sự biểu hiện của một số lượng lớn gen trong phản ứng viêm. Nhiều nghiên cứu cho thấy, mức độ biểu hiện của gen *A20*, *CYLD* thường thấp ở một số bệnh nhân ung thư và khi các gen này bị làm bất hoạt thì sẽ thúc đẩy sự tăng sinh của các tế bào ung thư.

Phân tích mối liên hệ giữa đa hình gen *A20*, *CYLD*, biểu hiện của gen *A20*, *CYLD* và gen tín hiệu *STAT1*, cũng như nồng độ cytokine IL-6 và TNF- α tiết ra ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy cho thấy, chỉ tìm ra được mối liên hệ chặt chẽ giữa đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* và nồng độ cytokine IL-6 do các bệnh nhân mắc bệnh AML tiết ra. Mặc dù vậy, gen *A20*, *CYLD* vẫn là mục tiêu tiềm năng cho việc nghiên cứu và đánh giá mức độ tiến triển của bệnh, đồng thời kết quả đánh giá này có thể cung cấp những thông tin hữu ích cho các nghiên cứu về vai trò của *A20*, *CYLD* đối với bệnh bạch cầu dòng tủy; từ đó có thể tìm ra được những phương thức đánh giá tình trạng của bệnh, cũng những định hướng biện pháp điều trị bệnh hiệu quả.

4.2. Xác định vai trò của *A20*, *CYLD* đối với quá trình tăng sinh và apoptosis của tế bào K562

Vincristine là một chất được chiết xuất từ cây dừa cạn (*Cantharanthus roseus*) có tác dụng ức chế hiệu quả đối với một số bệnh ung thư như bệnh bạch cầu đơn nhân, ung thư vú, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư đầu và cổ, ung thư tinh hoàn và bệnh bạch cầu dòng lympho. Cơ chế hoạt động của vincristine được xác định là tương tự với các chất chống ung thư đặc hiệu dựa theo chu kỳ của tế bào. Trong quá trình điều trị, vincristine thường gây độc ở hệ thống thần kinh, rồi giải

phóng các chất trung gian cho quá trình tiền viêm như IL-6 và TNF- α khi các tế bào được kích hoạt. Bằng cách kích hoạt con đường tín hiệu NF- κ B/STAT, vincristine được coi là tác nhân điều hòa một phần hoạt động chống ung thư. Một số nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng, vincristine có thể làm giảm bạch cầu trong máu ngoại vi và suy tủy, đồng thời có thể kéo dài được tuổi thọ đáng kể của các mô hình cấy ghép bệnh bạch cầu dòng lympho trên chuột. Theo Paloma và cộng sự (2011), vincristine có thể làm giảm đáng kể khả năng sống sót của tế bào K562 bằng cách ngăn chặn sự tiến triển của chu trình tế bào.

Trong nghiên cứu này, khi cùng được xử lý bởi vincristine, mức độ biểu hiện mRNA của *A20*, *CYLD* tăng đáng kể trong tế bào K562. Trong trường hợp gen *A20* bị bất hoạt thì tác dụng ức chế sự tăng sinh và tồn tại của K562 không còn nữa, trong khi đó chỉ có sự tăng sinh của K562 bị ức chế khi có sự xuất hiện của gen *CYLD* khi tế bào này được xử lý bởi vincristine. So với *A20*, *CYLD* không tác động nhiều đến quá trình apoptosis của K562. Như vậy, vincristine ức chế sự tăng sinh và sống sót của K562 thông qua việc tăng cường sự biểu hiện *A20*.

4.3. Xác định vai trò của gen *CYLD* đối với đại thực bào được biệt hóa bởi M-CSF qua tín hiệu STAT1

CYLD ức chế sự trưởng thành và khả năng tiết cytokine cũng như gây ra hiện tượng thực bào và quá trình apoptosis của đại thực bào thông qua tín hiệu STAT1. Khi không có *CYLD*, sự biểu hiện của các phân tử CD40 và CD86, cũng như sự giải phóng IL6 của đại thực bào được tăng cường đáng kể. Trong khi đó, khả năng hấp thu FITC-dextran và Annexin V/PI của các đại thực bào này ít hơn so với đại thực bào không bị bất hoạt gen *CYLD*. Do đó, có thể thấy rằng, *CYLD* đã thúc đẩy quá trình thực bào của đại thực bào, tuy nhiên với sự hiện diện của fludarabine, tác dụng này của *CYLD* đối với đại thực bào bị loại bỏ. Qua đó, khẳng định được rằng, tác dụng ức chế của *CYLD* đối với chức năng của đại thực bào phụ thuộc vào việc kích hoạt tín hiệu STAT1 lần đầu tiên được ghi nhận trong nghiên cứu này. Không giống như M-HP, khi M-AML (M4/M5b) được xử lý bởi fludarabine, biểu hiện *CYLD* tăng cao kích hoạt sự hấp thu FITC-dextran và quá trình thực bào của M-AML. Bên cạnh đó, *CYLD* thực hiện vai trò tiền thực bào của các đại thực bào từ phân nhóm M4/M5b thông qua con đường STAT1.

CHƯƠNG V: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận:

1. *Mối liên quan giữa đa hình/đột biến trên gen A20, CYLD, biểu hiện gen tín hiệu liên quan, và nồng độ cytokine ở bệnh bạch cầu dòng tủy*

- Đã xác định được 5 điểm đa hình trên gen *CYLD*; 6 điểm đa hình trên gen *A20* ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy. Trong đó, đa hình tại vị trí p.Q731H trên gen *CYLD* có sự khác biệt đáng kể về kiểu gen GC so với kiểu gen GG khi so sánh với nhóm người khỏe.

- Đã xác định được mức độ biểu hiện mRNA của *A20, CYLD* đều giảm đáng kể ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy so với nhóm người khỏe; Trong khi đó, nồng độ IL-6, TNF- α được ghi nhận là tăng ở các bệnh nhân này.

- Đã xác định được mối liên quan chặt chẽ giữa đa hình gen *CYLD* tại vị trí p.Q371H và nồng độ cytokine IL-6 ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy cấp.

2. *Vai trò của gen A20, CYLD đối với chức năng tế bào*

- Đã xác định được vai trò của gen *A20, CYLD* trong việc ức chế quá trình tăng sinh và thúc đẩy apoptosis của tế bào K562 được xử lý bởi vincristine.

- Đã xác định được vai trò của gen *CYLD* trong việc hoạt hóa đại thực bào được biệt hóa từ PBMC của người khỏe (M-HP) khi có sự biểu hiện mRNA của *STAT1*, trong khi đó biểu hiện của *CYLD* lại tăng cường sự hoạt động của đại thực bào M-AML khi được xử lý với fludarabine.

Kiến nghị:

Cần tiếp tục nghiên cứu xác định các điểm đa hình/đột biến trên các exon khác của gen *A20, CYLD*, từ đó có thể đánh giá chính xác hơn về vai trò của gen *A20, CYLD* đối với bệnh bạch cầu dòng tủy. Đồng thời, tiếp tục đánh giá hiệu quả của việc sử dụng các tế bào được biệt hóa bởi M-CSF và xử lý với vincristine trong việc xây dựng hướng điều trị bệnh bạch cầu dòng tủy kết hợp với liệu pháp gen đích *A20, CYLD* hoặc liệu pháp tế bào đích liên quan đến *A20, CYLD*.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Đã xác định được một số điểm đa hình trên gen *A20*, *CYLD* ở các bệnh nhân bạch cầu dòng tủy; đồng thời cũng xác định được mối liên quan giữa đa hình ở vị trí p.Q371H và nồng độ IL-6 ở bệnh bạch cầu dòng tủy cấp.
- Đã xác định được vai trò của gen *A20*, *CYLD* đối với quá trình tăng sinh và thúc đẩy quá trình apoptosis của tế bào K562; Đồng thời xác định được vai trò của *CYLD* trong việc hoạt hóa đại thực bào được biệt hóa từ tế bào PBMC của người bệnh AML khi được xử lý với fludarabine.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyen Thanh Huyen**, Nguyen Thy Ngoc, Nguyen Hoang Giang, Do Thi Trang, Ha Hong Hanh, Vu Duc Binh, Nguyen Van Giang, Nguyen Xuan Canh, Nguyen Thi Xuan (2023). *CYLD stimulates macrophages phagocytosis of leukemic cells through STAT1 signaling in acute myeloid leukemia*. PLoS ONE 18(8):e0283586.
2. Nguyen Huy Hoang, **Nguyen Thanh Huyen**, Do Thi Trang, Nguyen Xuan Canh, Can Van Mao, Mentor Sopjani, Nguyen Ba Vuong, Nguyen Thi Xuan (2022). *Effects of Vinblastine and Vincristine on the function of chronic myeloid leukemic cells through expression of A20 and CYLD*. Cellular and Molecular Biology. 68(10): 47-53.
3. **Nguyen Thanh Huyen**, Nguyen Hoang Giang, Nguyen Thi Xuan. *Expression of deubiquitinase genes and inflammatory response in myeloid leukemia*. Vietnam Journal of Biotechnology. 20(3): 401-408.
4. Nguyễn Hoàng Giang, **Nguyễn Thanh Huyền**, Nguyễn Thị Xuân. *Biểu hiện một số gen điều hòa miễn dịch ở bệnh bạch cầu tủy mạn*. Tạp chí Công nghệ sinh học 2021, 19(1): 51-60.