

BIỂU HIỆN MỘT SỐ GEN ĐIỀU HÒA MIỄN DỊCH Ở BỆNH BẠCH CẦU TỤY MẠN

Nguyễn Hoàng Giang¹, Nguyễn Thanh Huyền², Nguyễn Thị Xuân^{1,3,✉}

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Khoa Công nghệ sinh học, Học Viện Nông Nghiệp Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: xuannt@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 06.5.2020

Ngày nhận đăng: 27.8.2020

TÓM TẮT

Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (CML) là bệnh ung thư máu có sự tăng trưởng bất thường của các tế bào bạch cầu dòng tủy ở tất cả các giai đoạn biệt hóa. Hơn 90% các trường hợp bị bệnh là do đột biến chuyển đoạn thuận nghịch hai gen *BCR* và *ABL* trên nhiễm sắc thể t (9; 22) dẫn đến hình thành nhiễm sắc thể bất thường Philadelphia. Protein BCR-ABL biểu hiện hoạt động tyrosine kinase bất thường làm thay đổi hoạt động của các tín hiệu STAT và NF- κ B gây ra sự tăng sinh không kiểm soát của tế bào dòng tủy. Ba gen *CTLA-4*, *PD-1* và *LAG3* có chức năng kiểm soát miễn dịch bằng cơ chế ức chế hoạt động của tế bào T hỗ trợ. Gen *klotho* có chức năng chống viêm và ung thư. Các gen tín hiệu STAT có vai trò điều hòa chức năng của tế bào thông qua sự phosphoryl hóa và gen *I κ B- α* điều hòa thông qua sự giáng hóa trong tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định biểu hiện mRNA của các gen này trên tế bào bạch cầu của bệnh nhân CML bằng kỹ thuật realtime-PCR. Kết quả cho thấy có sự tăng rõ rệt biểu hiện của các gen tín hiệu *STAT-1* và *STAT-6* và biểu hiện của gen *LAG3* giảm đi ở bệnh nhân CML. Biểu hiện tăng bất thường của gen *STAT1* và *STAT6* cho thấy vai trò quan trọng của các gen tín hiệu này điều hòa hoạt động của tế bào miễn dịch dẫn tới sự hình thành và phát triển bệnh CML và có thể là các marker quan trọng và tiềm năng trong chẩn đoán phát hiện sớm ung thư CML.

Từ khóa: Bệnh bạch cầu tủy mạn CML, *klotho*, *CTLA4*, *I κ B- α* , *PD1*, *LAG3* và *STAT*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (Chronic myeloid leukemia, CML) là bệnh ung thư máu có sự tăng sinh không kiểm soát của các tế bào tủy trong tất cả các giai đoạn biệt hóa. Hơn 90% các trường hợp bị bệnh là do đột biến chuyển đoạn thuận nghịch nhiễm sắc thể t (9; 22) (Kantarjian *et al.*, 2002). Hai nhiễm sắc thể này đổi vị trí cho nhau tạo ra nhiễm sắc thể số 22 ngắn hơn bình thường, được gọi là nhiễm sắc thể Philadelphia (Ph) (Hehlmann *et al.*, 2007). Nhiễm sắc thể Ph chứa tổ hợp gen chuyển đoạn *BCR-ABL*, dẫn

đến kích hoạt tự phát các tín hiệu phân tử tyrosine kinase làm tế bào tăng sinh một cách bất thường (Hantschel *et al.*, 2012). Chính vì vậy, liệu pháp ức chế tyrosine kinase (TKI) là một trong những phương pháp chữa bệnh giúp cải thiện đáng kể tình trạng sống sót của bệnh nhân, tuy nhiên bệnh CML cho đến nay vẫn chưa được chữa khỏi hoàn toàn và trở thành bệnh mạn tính cho đa số bệnh nhân mắc phải (Arzt *et al.*, 2014). Ở bệnh nhân CML, chức năng của tế bào T, tế bào NK bị ức chế dẫn đến suy giảm đáp ứng miễn dịch chống lại ung thư làm tăng sự phát triển của các tế bào ung thư (Christiansson *et al.*, 2013).

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, biểu hiện một số gen có vai trò kiểm soát miễn dịch, trong đó có ba gen là gen cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (*CTLA-4*), programmed cell death-1 (*PD-1*) và lymphocyte activation gene 3 (*LAG3*) liên quan mật thiết tới sự phát triển của tế bào ung thư. Ba gen này có chức năng ức chế hoạt động của tế bào T hỗ trợ đồng thời kích hoạt sự tăng sinh của tế bào T điều hòa khi hệ miễn dịch phơi nhiễm với các yếu tố kháng nguyên lạ (Keir *et al.*, 2008). Biểu hiện gen *CTLA4* và *PD-1* trên tế bào gốc CD34⁺ và tế bào T điều hòa được phát hiện tăng cao trên bệnh nhân CML (Yang *et al.*, 2014) làm suy kiệt số lượng tế bào T hỗ trợ trong cơ thể người bệnh. *CTLA-4* kiểm soát sự tăng sinh của tế bào T chủ yếu ở hạch bạch huyết và *PD-1* ức chế hoạt động của tế bào T ở cơ quan bạch huyết ngoại vi (Buchbinder *et al.*, 2016). *LAG-3* có mặt chính trên tế bào T và NK và là chỉ thị hoạt động của tế bào CD4⁺ and CD8⁺ T và tế bào T điều hòa. *LAG-3* và *CTLA4* hoạt động tương hỗ để ức chế hoạt động của tế bào T (Okazaki *et al.*, 2011). Ngoài ra, trên bề mặt tế bào ung thư có các thụ thể MHC lớp II tương tác đặc hiệu với *LAG-3*, và các thụ thể CD80 và CD86 tương tác đặc hiệu với *CTLA-4*, làm suy yếu hoạt động của tế bào T dẫn tới suy kiệt đáp ứng miễn dịch chống lại khối u (Sharma *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019a). Gần đây, một số liệu pháp miễn dịch ức chế biểu hiện của ba gen này để tăng cường hoạt động của tế bào T và làm giảm ảnh hưởng của tế bào T điều hòa đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị ung thư (Buchbinder *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016).

Bên cạnh các gen kiểm soát miễn dịch, gen *klotho* có chức năng chống lão hóa, chống viêm và ung thư cũng được tập trung nghiên cứu trên bệnh nhân ung thư. Gen này mã hóa cho protein Klotho được tiết vào máu hoặc ở dạng protein nội sinh và đóng vai trò như một hormone kích thích tăng trưởng (Xuan *et al.*, 2018). Nhiều nghiên cứu trên bệnh nhân ung thư đã chỉ ra rằng, gen *klotho* có vai trò quan trọng trong ức chế sự tăng sinh, xâm lấn, di cư và cảm ứng sự chết apoptosis của tế bào ung thư (Wolf *et al.*, 2008; Lorenzi *et al.*, 2010). Nghiên cứu trên

chuột cho thấy, chuột thiếu hụt gen *klotho* biểu hiện kiểu hình lão hóa sớm từ khi mới sinh ra do cơ thể không phân giải được phân tử 1- α , 25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)₂D₃), dẫn đến tình trạng vôi hóa các khớp xương và hỏng hệ miễn dịch (Leibrock *et al.*, 2016).

Song song với các nghiên cứu về gen chức năng, một số gen tham gia truyền tín hiệu kích hoạt tế bào cũng được chú trọng. Các gen này có vai trò kích hoạt tế bào làm thay đổi quá trình phiên mã và dịch mã các gen chức năng trong nhân như các cytokine và chemokine. Nhóm gen signal transducer and activator of transcription (*STAT*) đã được nghiên cứu rộng rãi trên nhiều loại bệnh khác nhau và biểu hiện của nhóm gen này tăng cao trên nhiều bệnh nhân ung thư (Hantschel *et al.*, 2012; Nair *et al.*, 2012; Meissl *et al.*, 2017). Trong đó, gen *STAT-1* phụ thuộc vào quá trình phosphoryl hóa tyrosine và có vai trò ức chế sự phát triển khối u và thúc đẩy quá trình chết tế bào (Meissl *et al.*, 2017). Gen *STAT3* tham gia ngăn chặn quá trình khởi phát của ung thư (Nair *et al.*, 2012). Sự phosphoryl hóa *STAT5* làm khởi phát bệnh đồng thời duy trì sự sống của tế bào ung thư (Hantschel *et al.*, 2012). Hoạt hóa tín hiệu phân tử *STAT6* cũng làm tăng nguy cơ mắc bệnh ung thư máu (Chen *et al.*, 2019b). Ngoài ra, các nghiên cứu về phân tử tín hiệu nuclear factor κ B (NF- κ B) cũng rất được chú ý. Khi tế bào ở trạng thái nghỉ, NF- κ B tương tác với các protein ức chế là I κ B trong đó có I κ B- α . Dưới sự xúc tác của tác nhân hoạt hóa, NF- κ B gây nên quá trình phosphoryl hóa các I κ B, làm cho chúng bị giáng hóa bởi quá trình thủy phân protein, từ đó các NF- κ B sẽ được giải phóng, đi vào nhân tế bào và kích thích quá trình phiên mã các gen nhân. I κ B- α có biểu hiện bất hoạt trong bệnh nhân ung thư hạch Hodgkin trong bệnh nhân CML (Morotti *et al.*, 2017).

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về đa hình và biểu hiện của các gen *CTLA-4*, *PD-1*, *LAG3*, *klotho*, *STAT* và I κ B- α ở bệnh ung thư máu, nhưng nghiên cứu về mức độ biểu hiện của chúng ở bệnh nhân CML Việt Nam chưa được chú ý đến. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tách chiết RNA tổng số từ các mẫu máu và

xác định mức độ biểu hiện của các gen trên phục vụ cho công tác chẩn đoán bệnh và hướng tới các nghiên cứu sâu hơn cho điều trị gen đích đạt hiệu quả.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu máu ngoại vi được thu thập từ 64 bệnh nhân chưa được điều trị, được chẩn đoán mắc bệnh CML tại Bệnh viện Huyết học và Truyền máu Trung ương và Bệnh viện Quân Y 103, Hà Nội. Các bệnh nhân đã được thăm khám lâm sàng, làm các xét nghiệm cận lâm sàng và giải phẫu bệnh để chẩn đoán xác định bệnh.

Nhóm đối chứng gồm 20 người khỏe mạnh, trong đó không có cá nhân nào đang dùng thuốc hoặc bị bất kỳ bệnh cấp tính hay mãn tính nào khác. Tất cả bệnh nhân và tình nguyện viên đã ký văn bản đồng ý tham gia nghiên cứu. Các quy trình thí nghiệm và việc chăm sóc từng cá nhân được thực hiện theo luật pháp Việt Nam và đã được phê duyệt bởi Hội đồng Y đức của Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết RNA tổng số và phân tích mức độ biểu hiện bằng kỹ thuật RT-PCR

RNA tổng số được tách chiết bằng Trizol theo hướng dẫn của hãng Invitrogen. cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số theo quy trình như sau: lấy 1 µg RNA tổng số pha loãng vào nước cất DEPC thành 12,5 µL. Sau đó, thêm 1 µL oligo-dT primer (500 µg/mL, Invitrogen) và ủ ở nhiệt độ 70°C trong 2 phút. Cho thêm 2 µL 10x reaction buffer (Biolabs) vào ống đựng mẫu, 1 µL dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM mỗi loại), 0,5 µL chất ức chế RNase (Roche), 0,1 µL enzyme phiên mã ngược M-MuLV (Biolabs) và 2,9 µL nước cất DEPC. Trộn đều mẫu sau đó ủ ở 42°C trong 1 h. Để dừng phản ứng tổng hợp cDNA, các mẫu được ủ ở 94°C trong 5 phút và dự trữ ở -80°C. Mẫu cDNA được phân tích mức độ biểu hiện các gen

CTL-4, PD-1, LAG-3, klotho, STAT-1, STAT-3, STAT-5, STAT-6, IκB-α và GAPDH. Các primer được sử dụng thể hiện tại Phụ lục 1. Phản ứng quantitative PCR chứa 20 µL tổng thể tích gồm 2 µL cDNA, 2,4 µL MgCl₂ (3 µM), 1 µL hai loại primer (0,5 µM mỗi loại), 2 µL cDNA Master SybrGreen I mix (Roche Molecular Biochemicals) và 12,6 µL nước DEPC. Đoạn cDNA được khuếch đại ở 95°C trong 10 giây, 62°C trong 10 giây, và 72°C trong 16 giây, nhắc lại 40 chu kỳ. Phương pháp RT-PCR được thực hiện trên hệ thống LightCycler System (Roche Diagnostics). Tỷ lệ biểu hiện tương quan giữa các gen nghiên cứu và gen *GAPDH* đối chứng được tính trên mỗi mẫu theo phương pháp ngưỡng chu trình.

Phương pháp xử lý số liệu

Kiểm định sự khác biệt giữa các biến định lượng phân bố không chuẩn bằng phương pháp ANOVA. Các nghiên cứu được lặp lại ít nhất 3 lần. Sự khác biệt giữa mẫu đối chứng và mẫu được xử lý có ý nghĩa thống kê khi chỉ số $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chỉ số xét nghiệm sinh hóa máu bệnh nhân CML

Kết quả xét nghiệm sinh hóa máu chỉ ra rằng tỷ lệ bệnh nhân CML có chỉ số bilirubin, protein toàn phần, ferritin và lactate dehydrogenase (LDH) cao hơn người khỏe mạnh tương ứng là 14,06%, 25%, 37,3% và 56,25% (Bảng 1). Nồng độ LDH tăng quá cao phản ánh tình trạng tổn thương nhiều loại mô và cơ quan nội tạng của bệnh nhân. Chỉ số ferritin tăng cũng phản ánh người bệnh có gen kiểm soát lượng sắt bị đột biến, gây tổn thương đến chức năng gan, thận và tuyến nội tiết. Ngoài ra, các chỉ số hóa sinh khác như ure, globulin, AST và ALT có tỷ lệ bệnh nhân có các chỉ số này cao hơn bình thường tương ứng là 6,25%, 17,2%, 7,81% và 14,06%. Kết quả chỉ ra rằng, các chỉ số bệnh trên tăng cao phản ánh sự liên quan mật thiết của bệnh CML đến tổn thương các cơ quan gan, thận và một số cơ quan khác của bệnh nhân.

Bảng 1. Tỷ lệ bệnh nhân CML có chỉ số xét nghiệm sinh hóa máu cao hơn bình thường.

STT	Chỉ số bệnh	Bệnh nhân (n)	Bệnh nhân (%)	Trị số bình thường
1	Ure (mmol/L)	4/64	6,25	2,5 - 7,5 mmol/L
2	Glucose (mmol/L)	0/64	0	3,9 - 6,4 mmol/L
3	Creatinin (μ mol/L)	0/64	0	Nam: 62 - 120 μ mol/L Nữ: 53 - 100 μ mol/L
4	Acid uric (μ mol/L)	0/64	0	Nam: 180 - 420 μ mol/L Nữ: 150 - 360 μ mol/L
5	Bilirubin toàn phần (μ mol/L)	9/64	14,06	\leq 17 μ mol/L
6	Bilirubin trực tiếp (μ mol/L)	6/64	9,37	\leq 4,3 μ mol/L
7	Bilirubin gián tiếp (μ mol/L)	11/64	17,19	\leq 12,7 μ mol/L
8	Protein toàn phần (g/L)	16/64	25	62 - 82 g/L
9	Albumin (g/L)	0/64	0	35 - 50 g/L
10	Globulin (g/L)	11/64	17,2	24 - 38 g/L
11	A/G	0/64	0	1,3 - 1,8
12	Ferritin	23/64	37,3	Nam: 20 - 250 ng/mL Nữ: 10 - 120 ng/mL
13	Calci ion hóa (mmol/L)	0/64	0	1,17 - 1,29 mmol/L
14	AST (GOT) (U/l)	5/64	7,81	\leq 37 U/L -37°C
15	ALT (GPT) (U/l)	9/64	14,06	\leq 40 U/L -37°C
16	LDH (U/l)	36/64	56,25	230 - 460 U/L -37°C
17	Canxi toàn phần (mmol/L)	0/64	0	2,15 - 2,55 mmol/L
18	Định lượng Sắt huyết thanh (μ mol/L)	0/64	0	Nam: 11 - 27 μ mol/L Nữ: 7- 26 μ mol/L
19	Na ⁺ (mmol/L)	0/64	0	135 - 145 mmol/L
20	K ⁺ (mmol/L)	0/64	0	3,5 - 5 mmol/L
21	Cl ⁻ (mmol/L)	0/64	0	98 - 106 mmol/L

Biểu hiện một số gen chức năng ở bệnh nhân CML

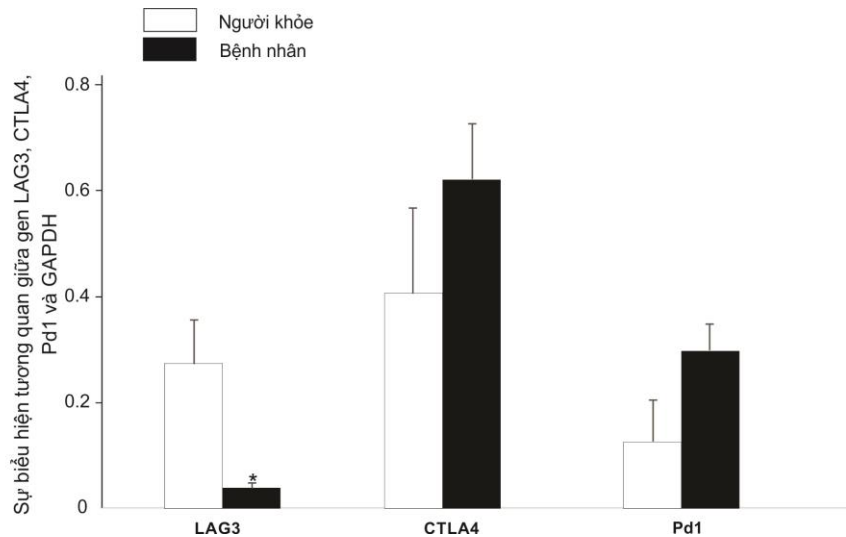
Biểu hiện gen của gen *PD1* và *CTLA4* có tăng nhẹ, trong khi biểu hiện gen *LAG3* lại giảm ở bệnh nhân CML so với người khỏe (Hình 1). Biểu hiện tăng nhẹ của 2 gen *CTLA-4* và *PD-1* phản ánh hệ miễn dịch có sự bất thường về số lượng tế bào T điều hòa và tế bào T hỗ trợ trong cơ thể người bệnh. Nhiều nghiên cứu của các tác giả khác đã chỉ ra rằng biểu hiện mRNA của 3 gen *LAG-3*, *CTLA-4* và *PD-1* tăng cao trên bệnh nhân ung thư trong đó có bệnh bạch cầu

lympho mạn tính (Keir *et al.*, 2008; Okazaki *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014; Shapiro *et al.*, 2017).

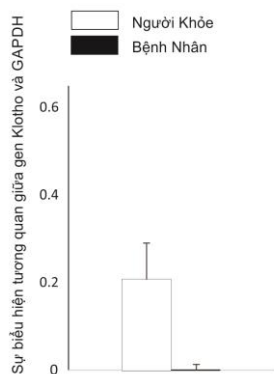
Bên cạnh đó, biểu hiện mRNA của *klotho* ở bệnh nhân mắc CML khá thấp so với người khỏe (Hình 2), chứng tỏ rằng khả năng chống viêm, chống lão hóa của người bệnh là rất kém. Trong một số nghiên cứu khác của chúng tôi cũng cho thấy biểu hiện của gen *klotho* giảm rõ rệt trên bệnh nhân ung thư (tài liệu chưa công bố). Ngoài ra, các nghiên cứu về đột biến gen *klotho* trên bệnh nhân đã chỉ ra rằng biến đổi

vùng promotor của gen này gây ra hiện tượng methyl hóa DNA và đó là nguyên nhân chính gây ra ung thư biểu mô khối u rắn (Rubinek *et al.*, 2012). Nhiều nghiên cứu chỉ ra vai trò của gen *klotho* có chức năng điều hòa hoạt động tế bào miễn dịch, chống lão hóa và ngăn cản sự

phát triển và sống sót của tế bào ung thư (Wolf *et al.*, 2008; Lorenzi *et al.*, 2010; Xuan *et al.*, 2018). Tuy nhiên, các nghiên cứu về gen này trên bệnh nhân ung thư máu còn hạn chế, chính vì thế, gen *klotho* cũng là một gen chức năng quan trọng liên quan đến bệnh ung thư CML.



Hình 1. Biểu hiện gen *LAG3*, *CTLA4* và *PD1* trên bệnh nhân mắc CML (cột màu đen) và người khỏe (cột màu trắng). *($p < 0,05$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm đối chứng và nhóm bệnh nhân (ANOVA).



Hình 2. Biểu hiện gen *klotho* ở bệnh nhân mắc CML (cột màu đen) và mẫu đối chứng (cột màu trắng).

Biểu hiện một số gen tín hiệu trên bệnh nhân CML

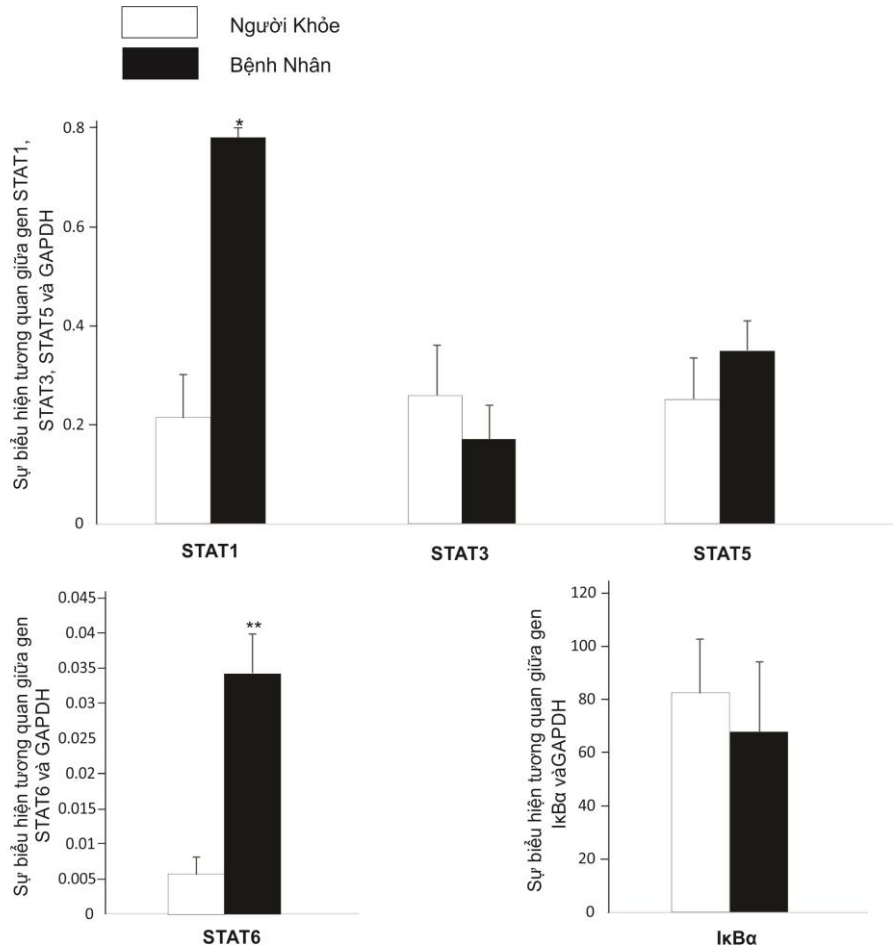
Tương tự với các nghiên cứu về ung thư trước đó (Meissl *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019b), chúng tôi cũng chỉ ra rằng, mức độ biểu hiện của *STAT1* và *STAT6* ở bệnh nhân CML cao hơn so với người khỏe mạnh. *STAT6* biểu

hiện tăng cao trong các dòng tế bào có nguồn gốc từ những u lympho Hodgkin. Với vai trò hoạt hóa một số gen ức chế apoptosis như *Bcl-xL* và *TRAF1*, *STAT6* có khả năng thúc đẩy sự sống của các tế bào lympho chuyển thành tế bào ung thư (Cochet *et al.*, 2006). Biểu hiện gen *STAT3* và *STAT5* trên bệnh nhân CML trong nghiên cứu này không khác biệt so với mẫu đối chứng (Hình 3). *STAT3* và *STAT5* đều được ghi nhận là có liên quan đến việc khởi phát bệnh ung thư, sự phosphoryl hóa của chúng xảy ra ở giai đoạn đầu, sau đó có thể giảm đi và duy trì ở ngưỡng bình thường (Hantschel *et al.*, 2012; Nair *et al.*, 2012). *STAT3* thúc đẩy sự tăng sinh tế bào B xâm lấn và biểu hiện protein *STAT3* ở bệnh nhân ung thư hạch tăng cao làm tăng biểu hiện của *PD-L1* thúc đẩy quá trình trốn tránh miễn dịch của các tế bào ung thư (Song *et al.*, 2018). Một nghiên cứu khác chỉ ra rằng, *STAT5* hoạt hóa cần thiết cho tiến triển của ung thư hạch Hodgkin, *STAT5* gây ra sự tăng sinh bất thường tế bào B, ức chế sự apoptosis của tế bào

hình thành trạng thái bất tử, chuyển các tế bào B thành tế bào ung thư (Scheeren *et al.*, 2008).

IκB-α là gen mã hóa cho protein ức chế hoạt động của tín hiệu phân tử NF-κB. Biểu hiện giảm của gen này chỉ ra sự giáng hóa protein,

đến với sự phosphoryl hóa của một số tín hiệu phân tử khác như *STAT*. Tuy nhiên, ở bệnh nhân CML, chúng tôi chỉ ra biểu hiện tăng của *STAT*, trong khi biểu hiện của *IκB-α* không khác biệt so với mẫu người khỏe (Hình 3).



Hình 3. Biểu hiện gen *STAT1*, *STAT3*, *STAT5*, *STAT6* trên bệnh nhân mắc CML (cột màu đen) và mẫu đối chứng (cột màu trắng). *($p < 0,05$) và **($p < 0,01$) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm đối chứng và nhóm bệnh nhân (ANOVA).

So sánh biểu hiện một số chỉ số sinh học của bệnh nhân CML trên thế giới

Nghiên cứu về gen tín hiệu *STAT* đã cho thấy rằng biểu hiện gen *STAT1* và *STAT6* tăng rõ rệt trên bệnh nhân CML Việt Nam. Tuy nhiên, ở Úc và Ai Cập, biểu hiện gen *STAT3* hoặc *STAT5* tăng cao so với người khỏe, chúng tỏ rằng vai trò điều hòa của gen *STAT* đến từng loại bệnh nhân CML vẫn cần được

nghiên cứu sâu hơn, có thể ảnh hưởng của mỗi loại gen *STAT* đến từng giai đoạn bệnh khác nhau là khác nhau. Bên cạnh đó, để minh họa thêm vai trò của LDH và ferritin trong sự phát triển của bệnh CML, nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra nồng độ của hai chỉ số này bất thường trên bệnh nhân CML (Bảng 2). Đây là hai chỉ số quan trọng phục vụ trong công tác chẩn đoán các loại bệnh bất thường về máu hiện nay.

Bảng 2. Biểu hiện một số chỉ số sinh học của bệnh nhân CML trên thế giới.

STT	Gen/chỉ số hóa sinh	Địa điểm	Biểu hiện gen	Tài liệu tham khảo
1	STAT1	Việt Nam	Tăng	Nghiên cứu này
2	STAT3	Ai Cập	Tăng	(Sayed <i>et al.</i> , 2014)
3	STAT5	Úc	Tăng	(Schmidt <i>et al.</i> , 2009)
4	STAT6	Việt Nam	Tăng	Nghiên cứu này
5	Ferritin, LDH	Ấn Độ, Việt Nam	Tăng	(Saurabh, 2017) và nghiên cứu này

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này góp phần vào sự hiểu biết về mức độ biểu hiện của một số gen chức năng có mặt trên tế bào miễn dịch điều hòa biểu hiện viêm như *klotho*, gen thúc đẩy sự tăng sinh tế bào T điều hòa và ức chế hoạt động tế bào T hỗ trợ như *CTLA4*, *PD1* và *LAG3* và gen liên quan đến con đường tín hiệu JAK-STAT kiểm soát sự phát triển của bệnh CML. Sự biểu hiện tăng bất thường của gen *STAT1* và *STAT6* cho thấy vai trò quan trọng của các gen tín hiệu này điều hòa hoạt động của tế bào miễn dịch dẫn tới sự hình thành và phát triển bệnh CML và có thể là các marker quan trọng và tiềm năng trong chẩn đoán phát hiện sớm ung thư CML.

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành với kinh phí được tài trợ bởi đề tài “Nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình gen, biểu hiện gen, hệ vi sinh, kiểu hình miễn dịch trên bệnh nhân ung thư máu” thuộc Chương trình phát triển khoa học cơ bản trong lĩnh vực Khoa học sự sống (Chương trình 562), giai đoạn 2017-2025, Bộ Khoa học và Công nghệ, mã số ĐTĐLCN.43/21.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arzt L, Kothmaier H, Halbwedl I, Quehenberger F, Popper HH (2014) Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) acts like an oncogene in malignant pleural mesothelioma. *Virchows Arch* 465: 79–88.

Buchbinder EI, Desai A (2016) CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am. J. Clin. Oncol* 39: 98–106.

Chen BJ, Dashnamoorthy R, Galera P, Makarenko V, Chang H, Ghosh S, Evens AM (2019a) The immune checkpoint molecules PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 10: 2030–2040.

Chen N, Feng L, Lu K, Li P, Lv X, Wang X (2019b) STAT6 phosphorylation upregulates microRNA-155 expression and subsequently enhances the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett* 18: 95–100.

Christiansson L, Soderlund S, Svensson E, Mustjoki S, Bengtsson M, Simonsson B, Olsson-Stromberg U, Loskog AS (2013) Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PloS One* 8: e55818.

Cochet O, Frelin C, Peyron JF, Imbert V (2006) Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma-derived cell lines supports cell survival. *Cell. Signal* 18: 449–455.

Hantschel O, Warsch W, Eckelhart E, Kaupe I, Grebien F, Wagner KU, Superti-Furga G, Sexl V (2012) BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. *Nat. Chem. Biol* 8: 285–293.

He Y, Rivard CJ, Rozeboom L, Yu H, Ellison K, Kowalewski A, Zhou C, Hirsch FR (2016) Lymphocyte-activation gene-3, an important immune checkpoint in cancer. *Cancer Sci* 107: 1193–1197.

Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, European L (2007) Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 370: 342–350.

Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F,

- Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SJ, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E. (2002) Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 346: 645–652.
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677–704.
- Leibrock CB, Voelkl J, Kuro OM, Lang F, Lang UE (2016) 1,25(OH)2D3 dependent overt hyperactivity phenotype in klotho-hypomorphic mice. *Sci Rep* 6: 24879.
- Lorenzi O, Veyrat-Durebex C, Wollheim CB, Villemain P, Rohner-Jeanrenaud F, Zanchi A, Vischer UM (2010) Evidence against a direct role of klotho in insulin resistance. *Pflugers Arch* 459: 465–473.
- Meissl K, Macho-Maschler S, Muller M, Strobl B (2017) The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. *Cytokine* 89: 12–20.
- Morotti A, Crivellaro S, Panuzzo C, Carra G, Guerrasio A, Saglio G (2017) IkappaB-alpha: At the crossroad between oncogenic and tumor-suppressive signals. *Oncol Lett* 13: 531–534.
- Okazaki T, Okazaki IM, Wang J, Sugiura D, Nakaki F, Yoshida T, Kato Y, Fagarasan S, Muramatsu M, Eto T, Hioki K, Honjo T (2011) PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. *The Journal of Experimental Medicine* 208: 395–407.
- Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundeleovich A, Evron E, Gal-Yam EN, Kaufman B, Wolf I (2012) Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat* 133: 649–657.
- Sayed D, Badrawy H, Gaber N, Khalaf MR (2014) p-Stat3 and bcr/abl gene expression in chronic myeloid leukemia and their relation to imatinib therapy. *Leuk Res* 38: 243–250.
- Scheeren FA, Diehl SA, Smit LA, Beaumont T, Naspetti M, Bende RJ, Blom B, Karube K, Ohshima K, van Noesel CJ, Spits H (2008) IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood* 111: 4706–4715.
- Schmidt S, Wolf D (2009) Role of gene-expression profiling in chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* 2: 93–103.
- Shapiro M, Herishanu Y, Katz BZ, Dezorella N, Sun C, Kay S, Polliack A, Avivi I, Wiestner A, Perry C (2017) Lymphocyte activation gene 3: a novel therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 102: 874–882.
- Sharma P, Allison JP (2015) The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348: 56–61.
- Song TL, Nairismagi ML, Laurensia Y, Lim JQ, Tan J, Li ZM, Pang WL, Kizhakeyil A, Wijaya GC, Huang DC, Nagarajan S, Chia BK, Cheah D, Liu YH, Zhang F, Rao HL, Tang T, Wong EK, Bei JX, Iqbal J, Grigoropoulos NF, Ng SB, Chng WJ, Teh BT, Tan SY, Verma NK, Fan H, Lim ST, Ong CK (2018) Oncogenic activation of the STAT3 pathway drives PD-L1 expression in natural killer/T-cell lymphoma. *Blood* 132: 1146–1158.
- Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, Kuro-o M, Karlan B, Kaufman B, Koeffler HP, Rubinek T (2008) Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene* 27: 7094–7105.
- Xuan NT, Hai NV (2018) Changes in expression of klotho affect physiological processes, diseases, and cancer. *IJBMS* 21: 3–8.
- Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng QR, Fang Z, Nguyen M, Pierce S, Wei Y, *et al.* (2014) Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia* 28: 1280–1288.
- Saurabh K, Ghalaut VS, Bala J (2017) Chronic myeloid leukemia and ferritin levels. *Biomed Biotechnol Res J* 1:120–3.

EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN IMMUNE REGULATION IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Nguyen Hoang Giang¹, Nguyen Thanh Huyen², Nguyen Thi Xuan^{1,3}

¹*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Vietnam National University of Agriculture, Hanoi, Vietnam*

³*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Chronic myeloid leukemia (CML) is a blood cancer involved in abnormal proliferation of myeloid cells at all stages of differentiation. Translocation of regions of the *BCR* and *ABL* genes, leading to the fusion gene *BCR-ABL*, which forms the Philadelphia (Ph) chromosome, is the cause of more than 90% of CML. The *BCR-ABL* protein shows abnormal tyrosine kinase activity, leading to changes in proliferation signals including signal transducer and activator of transcriptions (STATs) and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B (NF- κ B) and resulting in uncontrolled proliferation of myeloid cells. *CTLA-4*, *PD-1* and *LAG3* genes are known as immunosuppressive receptors playing important roles in controlling immune response by inhibiting activity of T helper cells. *Klotho* gene has anti-aging, anti-inflammatory and anti-cancer functions. STAT signaling pathway genes regulate cancer cell functions by their phosphorylation and *I κ B- α* gene by degradation of its expression. In this study, we conducted experiments to determine mRNA expression of these genes on immune cells in CML patients by using realtime-PCR. Results showed a marked increase in the expression of *STAT-1* and *STAT-6* signaling genes and a decreased *LAG3* expression in CML patients as compared with healthy controls. In addition, other gene expressions such as *CTLA4*, *PD1*, *klotho*, *I κ B- α* , *STAT3* and *STAT5* were unaltered in CML cells. The abnormal increased expression of *STAT1* and *STAT6* genes indicated an important role of these signaling genes in regulating activity of immune cells, leading to pathogenesis and development of CML disease. The evidence suggested that *STAT-1* and *STAT-6* genes could be important and potential markers in early prognosis of CML.

Keywords: *Chronic myeloid leukemia (CML), klotho, CTLA4, I κ B- α , PD1, LAG3 và STAT*

Phụ lục 1.

Tên các loại cặp mồi	Mồi xuôi/ngược	Trình tự mồi
<i>CTLA-4</i>	Mồi xuôi	5'-GTCCGGGTGACAGTGCTTCG-3'
<i>CTLA-4</i>	Mồi ngược	5'-CCAGGTAGTATGGCGGTGGG-3'
<i>PD-1</i>	Mồi xuôi	5'-TGCAGCTTCTCCAACACATC-3'
<i>PD-1</i>	Mồi ngược	5'-CACGCTCATGTGGAAGTCAC-3'
<i>LAG-3</i>	Mồi xuôi	5'-CCTCACTGTTCTGGGTCTGG-3'
<i>LAG-3</i>	Mồi ngược	5'-GGATATGGCAGGTGTAGGTC-3'
<i>Klotho</i>	Mồi xuôi	5' CTAAGCCAGGACAAGATG 3'
<i>Klotho</i>	Mồi ngược	5' TCAGGTCGGTAAACTGAG 3'
<i>STAT-1</i>	Mồi xuôi	5'-CCCTTCTGGCTTTGGATTGAA-3'
<i>STAT-1</i>	Mồi ngược	5'-CTTCCCAGGAGCTCTCACTGA-3'
<i>STAT-3</i>	Mồi xuôi	5'-GGA GGA GTT GCA GCA AAA AG-3'
<i>STAT-3</i>	Mồi ngược	5'-TGT GTT TGT GCC CAG AAT GT-3'
<i>STAT-5</i>	Mồi xuôi	5'-CAGACCAAGTTTGCAGCCAC-3'
<i>STAT-5</i>	Mồi ngược	5'-CACAGCACTTTGTCAGGCAC-3'
<i>STAT-6</i>	Mồi xuôi	5'-GCCCACTCACTCCAGAGGACCT-3'
<i>STAT-6</i>	Mồi ngược	5'-GGTGTTGGGAAAAGTCGACAT-3'
<i>IκB-α</i>	Mồi xuôi	5'-GCAAAATCCTGACCTGGTGT-3'
<i>IκB-α</i>	Mồi ngược	5'-GCTCGTCCTCTGTGAACTCC-3'
<i>GAPDH</i>	Mồi xuôi	5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAA-3'
<i>GAPDH</i>	Mồi ngược	5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCAT-3'