

KHẢO SÁT BIỂU HIỆN CỦA HEXOKINASE 2 MỨC ĐỘ MRNA TRÊN BỆNH NHÂN U LYMPHO

Vũ Đức Bình¹, Lê Hạ Long Hải^{2,3}, Tạ Thành Đạt¹, Trần Tín Nghĩa⁴,
Trần Thị Lan², Nguyễn Thị Oanh^{2,5}, Nguyễn Hoàng Việt²

TÓM TẮT

Enzyme HK2 có vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa glucose và được chứng minh có liên quan đến sự hình thành và phát triển của nhiều dạng ung thư. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của HK2 trong máu ngoại vi trên bệnh nhân u lympho vẫn chưa từng được đề cập đến. Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát biểu hiện HK2 mức độ mRNA trên hai nhóm: nhóm bệnh u lympho và nhóm đối chứng. Kết quả đếm số lượng tổng tế bào bạch cầu, bạch cầu trung tính và lympho đều tăng cao ở nhóm bệnh nhân u lympho và hạ thấp ở bạch cầu ưa acid ($p < 0,05$), ngoại trừ bạch cầu đơn nhân và ưa bazo ($p > 0,05$) so với nhóm đối chứng khỏe mạnh. Tuy vậy, mức độ biểu hiện HK2 thấp hơn đáng kể ở nhóm bệnh u lympho ($p < 0,05$). Nghiên cứu gợi ý vai trò của HK2 trong quá trình hình thành u lympho và là dấu ấn sinh học tiềm năng trong tiên lượng và đánh giá hiệu quả điều trị.

Từ khóa: Hexokinase 2, u lympho, mRNA

SUMMARY

EVALUATE EXPRESSION OF HEXOKINASE 2 AT mRNA LEVEL IN LYMPHOMA PATIENTS

Enzyme HK2 plays important role in glucose metabolism pathway and has been associated with several cancers in progression and development. However, the expression of HK2 at mRNA in peripheral blood of lymphoma patients have never been mentioned. Our study was conducted to evaluate HK2 expression at mRNA level in control-case study. The results of counting the number of total white blood cells, neutrophil and lymphocyte were increased in the lymphoma groups whereas decreased in eosinophil ($p < 0.05$), no significant in basophils and monocytes ($p > 0.05$) compared with healthy controls group. Notably, HK2 expression in lymphoma patients was significantly lower than healthy individuals. Our study suggests the role of HK2 in lymphoma formation and is a potential biomarker in diagnosis and assessment of treatment effectiveness.

Keywords: Hexokinase 2, lymphoma, mRNA

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

U lympho có nguồn gốc từ sự tăng sinh mất

kiểm soát của các tế bào hạch bạch huyết và được chia thành hai dạng chính, bao gồm U lympho Hodgkin (HL) và U lympho không Hodgkin (NHL). Trong đó, NHL là dạng phổ biến nhất trong các trường hợp u lympho (~90%). Theo ước tính, có 544.000 trường hợp NHL mới được phát hiện trên toàn thế giới vào năm 2020, với khoảng 260.000 người chết vì căn bệnh này. Sự hấp thu glucose cao, sự biểu hiện không kiểm soát của các enzyme glycolytic, khả năng chuyển hóa glycolytic và oxy hóa, tăng chuyển hóa glutamine, sinh tổng hợp axit béo là những quá trình chuyển hóa đặc trưng của u lympho.¹

Các enzyme Hexokinase (HKs) tham gia vào bước đầu tiên trong quá trình chuyển hóa glucose, chịu trách nhiệm phosphoryl hóa glucose hoặc glycogen thành glucose 6-phosphate. Sự rối loạn chuyển hóa glucose dẫn đến tăng các chất trung gian của quá trình đường phân hoặc quá tải quá trình đường phân, dẫn tới hình thành khối u. Trong số 4 loại HK isoenzyme (HK1, HK2, HK3, HK4) đã được phát hiện, sự gia tăng biểu hiện của HK2 được cho là có liên quan đến cơ chế hình thành nhiều loại ung thư và tiên lượng hiệu quả điều trị kém cho bệnh nhân.² Bên cạnh đó, sự biểu hiện của HK2 cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa năng lượng, con đường tín hiệu chống apoptosis và đáp ứng miễn dịch. Các nghiên cứu đã chỉ ra xóa bỏ gene HK2 có thể ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư, góp phần cải thiện khả năng sống sót trên mô hình chuột thí nghiệm.³ Dù vậy, mối liên quan giữa mức độ biểu hiện của HK2 đối với các loại u lympho đến nay vẫn chưa được làm rõ.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát mức độ biểu hiện của HK2 mức độ mRNA ở máu ngoại vi trên bệnh nhân u lympho so với nhóm chứng. Kết quả nghiên cứu gợi ý HK2 có thể là dấu ấn sinh học tiềm năng cho phương pháp điều trị đích trong u lympho.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. Bao gồm 35 bệnh nhân được chẩn đoán mắc u lympho nguyên phát tại Viện Huyết học & Truyền máu Trung Ương và 14 người khỏe mạnh có độ tuổi và giới tương đồng với nhóm bệnh. Mỗi đối

¹Viện Huyết học và Truyền Máu Trung Ương

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Bệnh viện Da Liễu Trung Ương

⁴Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

⁵Bệnh viện Nội Tiết Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hoàng Việt

Email: hoangviet@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 12.3.2024

Ngày phản biện khoa học: 18.4.2024

Ngày duyệt bài: 22.5.2024

tương tham gia nghiên cứu được thu thập 2mL máu ngoại vi trong ống chống đông EDTA tại thời điểm chưa từng tham gia điều trị.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết RNA tổng số: Mẫu máu ngoại vi sau khi được thu thập sẽ được tiến hành tách chiết RNA tổng số bằng kit QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN#52304). Các bước tách chiết được thực hiện trong điều kiện lạnh 4°C theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp cDNA: Các mẫu RNA tổng số sau khi được tách chiết sẽ được tổng hợp chuỗi cDNA bằng Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo#K1622) trong điều kiện 42°C trong 60 phút và 70°C trong 5 phút

Phản ứng qPCR xác định biểu hiện của HK2 bằng SybrGreen với trình tự cặp mỗi được sử dụng HK2-F: 5'-GATTGTCCGTAACATTCTCATCGA-3'; HK2-R: 5'-TGTCTTGAGCCGCT CTG AGAT-3' có kích thước 79bp và vùng gen nội chuẩn β -actin-F: 5'-CGA CAACGGCTC GGC ATGTGC-3'; β -actin-R: 5'-GTCACCGGAGTCCATCACGATGC-3' có kích thước 442bp. Phản ứng qPCR được thực hiện trên hệ thống của máy Realtime PCR Studio3 (Applied Biosystem). Mức độ biểu hiện của mẫu nghiên cứu được tính theo công thức Livak: $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Xử lý số liệu: Kiểm định Student t-test để so sánh mức độ biểu hiện của HK2 và số lượng các dòng tế bào bạch cầu trên từng nhóm tham gia nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm chính của đối tượng nghiên cứu

	U Lympho	Đối chứng	p
Tuổi trung bình	54,2 ± 15	55,4 ± 12	ns
Giới			
Nam	19 (54,3%)	7 (50%)	ns
Nữ	16 (45,7%)	7 (50%)	
Tổng số	35	14	

Nghiên cứu được thực hiện trên hai nhóm: nhóm u lympho và nhóm khỏe mạnh. Đặc điểm của những đối tượng tham gia nghiên cứu được liệt kê ở Bảng 1. Trong đó, nhóm bệnh có độ tuổi trung bình là 54,2 ± 15, tỉ lệ phân bố giữa nam và nữ lần lượt chiếm 54,3% và 45,7%. Không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa độ tuổi và sự phân bố giới tính trong hai nhóm bệnh-chứng ($p > 0,05$).

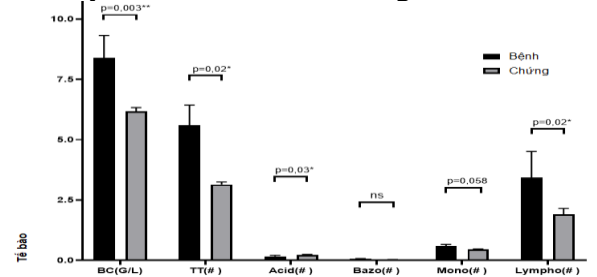
Bảng 2: Đặc điểm phân loại tế bào u lympho

Đặc điểm phân loại tế bào	Số lượng	Tỉ lệ (%)
---------------------------	----------	-----------

U lympho Hodgkin (HL)	6 (17,1%)
U lympho không Hodgkin (NHL)	29 (82,9%)
U Lympho tế bào B (ULTB-B)	17 (58,6%)
U Lympho tế bào T (ULTB-T)	3 (10,3%)
U lympho thể nang	2 (6,9%)
U Lympho tế bào NK/T (NK/TL)	2 (6,9%)
Mantle	1 (3,4%)
Không phân loại	4 (13,9%)
Tổng số	35

Phần lớn các bệnh nhân u lympho được chẩn đoán mắc NHL (82,9%), so với HL (17,1%). Sự phân bố các dạng NHL được xác định trong nghiên cứu bao gồm u lympho tế bào B (58,6%), u lympho tế bào T (10,3%), U lympho thể nang (6,9%), U lympho tế bào NK/T (6,9%) và Mantle (3,4%) (Bảng 2).

3.2. Môi trường quan giữa số lượng tế bào bạch cầu với các nhóm nghiên cứu

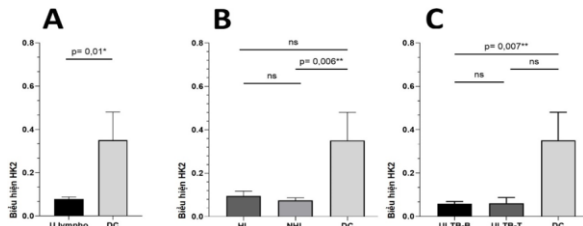


Hình 1: So sánh số lượng tế bào các dòng bạch cầu giữa nhóm u lympho và nhóm đối chứng

Kết quả so sánh số lượng tế bào bạch cầu giữa nhóm u lympho và nhóm đối chứng được thể hiện ở Hình 1. Theo đó, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được ghi nhận về tổng số lượng tế bào bạch cầu giữa nhóm bệnh và nhóm chứng ($p=0,003$). Cụ thể, số lượng các dòng tế bào bạch cầu trung tính và lympho, đều tăng ở nhóm bệnh nhân u lympho, tuy nhiên giảm ở số lượng bạch cầu ưa acid ($p < 0,05$), không có sự khác biệt ở bạch cầu đơn nhân và ưa kiềm ($p > 0,05$).

3.3. Đánh giá biểu hiện HK2 mức độ mRNA giữa các nhóm đối tượng nghiên cứu.

Kết quả cho thấy biểu hiện HK2 trong máu ngoại vi của nhóm bệnh thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng ($p=0,01$) (Hình 2A). Khi so sánh biểu hiện HK2 giữa các dạng của u lympho với nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê chỉ được ghi nhận ở nhóm NHL ($p=0,006$), không có mối liên quan giữa nhóm HL với nhóm chứng, cũng như giữa 2 nhóm HL và NHL ($p > 0,05$) (Hình 2B). Bên cạnh đó, HK2 chỉ biểu hiện thấp có ý nghĩa thống kê trong u lympho tế bào B ($p=0,007$) mà không có ý nghĩa trong u lympho tế bào T ($p > 0,05$) (Hình 2C).



Hình 2: Khảo sát biểu hiện HK2 mức độ mRNA giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng

(A) Mức độ biểu hiện HK2 giữa nhóm bệnh u lympho và nhóm đối chứng (DC). (B) Mức độ biểu hiện HK2 giữa nhóm Hodgkin Lymphoma và Non-Hodgkin Lymphoma với nhóm đối chứng. (C) Mức độ biểu hiện HK2 giữa nhóm u lympho tế bào B và T trong NHL với nhóm đối chứng.

IV. BÀN LUẬN

HK2 đóng vai trò quan trọng trong sự hình thành và phát triển của nhiều dạng ung thư khác nhau. Khả năng liên kết của HK2 với ty thể làm tăng cường phản ứng xúc tác của HK2 trong quá trình đường phân dẫn đến sự phát triển và di căn của khối u. Mặc dù vậy, biểu hiện của HK2 trong u lympho và các cơ chế phân tử liên quan vẫn chưa được hiểu rõ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã bước đầu khảo sát mức độ biểu hiện của HK2 trong các dạng điển hình của u lympho và đánh giá sự khác biệt của chúng giữa nhóm bệnh và nhóm chứng.

U lympho liên quan tới quá trình tăng sinh mất kiểm soát của các tế bào bạch huyết trong cơ thể, do đó có sự khác biệt rõ rệt về số lượng tế bào miễn dịch giữa bệnh nhân và người bình thường. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra số lượng bạch cầu trong nhóm u lympho cao hơn đáng kể so với nhóm chứng (8,39 G/L so với 6,17 G/L, $p=0,003$). So sánh các dòng tế bào bạch cầu cũng cho kết quả tương tự, bao gồm bạch cầu trung tính, lympho, đơn nhân và ưa acid ($p<0,05$). Không có sự khác biệt về bạch cầu ưa bazo giữa nhóm bệnh và nhóm chứng ($p>0,05$) (Hình 1). Đánh giá sự thay đổi về tỉ lệ các loại tế bào miễn dịch có tiềm năng trở thành dấu ấn sinh học hữu ích trong chẩn đoán u lympho. Trong đó, tỉ lệ tế bào lympho và bạch cầu đơn nhân đã đóng vai trò quan trọng như một dấu ấn tiên lượng trong nhiều loại hình ung thư khác nhau. Porrata và cộng sự (2012) đã chỉ ra việc xác định tỉ lệ giữa tế bào lympho và bạch cầu đơn nhân là một yếu tố tiên lượng độc lập cho khả năng sống sót và dự đoán kết quả lâm sàng ở bệnh nhân HL. Ngưỡng tỉ lệ 1,1 hoặc cao hơn của hai loại tế bào trên có liên quan đáng kể đến tỷ lệ sống sót chung (HR: 0,18; 95% CI: 0,08 -

0,38, $p<0,0001$), tỷ lệ sống sót cụ thể đối với bệnh u lympho (HR: 0,10; 95% CI: 0,04- 0,25, $p<0,0001$), thời gian sống không bệnh (HR: 0,35; 95% CI: 0,18 -0,66, $p<0,002$) và thời gian bệnh tiến triển (HR: 0,27; 95% CI: 0,17- 0,57, $p<0,0006$).⁴ Do đó, đánh giá tỉ lệ giữa tế bào lympho và bạch cầu đơn nhân có thể phản ánh khả năng đáp ứng miễn dịch của bệnh nhân với môi trường vi khối u.

HK2 là dạng đồng phân chính của enzyme hexokinase, đóng vai trò then chốt trong việc hấp thu và sử dụng glucose của tế bào và được biểu hiện cao trên các tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát hiện mức độ biểu hiện mRNA HK2 thấp hơn đáng kể ở nhóm bệnh so với nhóm chứng (Hình 2). Kết quả trên gợi ý sự biểu hiện của HK2 có kết quả kém hơn đáng kể so với những bệnh nhân âm tính về thời gian sống thêm không bệnh 5 năm (68% với 84%, $p=0,029$) và thời gian sống thêm toàn thể 5 năm (78% với 94%, $p=0,05$).⁵ Lin và cộng sự (2023) đã chứng minh mức độ biểu hiện HK2 tương quan thuận với mức độ biểu hiện của PD-L1, tương quan nghịch với khả năng xâm nhập của tế bào T-CD8+ và thời gian sống của bệnh nhân ung thư vú.⁶ Bên cạnh đó, vai trò tiềm năng của HK2 trong điều trị u lympho tế bào B cũng được nghiên cứu. Nakajima và cộng sự (2019) báo cáo rằng nồng độ HK2 biểu hiện quá mức trong dòng tế bào B ác tính khi nuôi cấy trong điều kiện thiếu oxi, gây ra tình trạng kháng cisplatin. Ức chế HK2 bằng HDAC đã cải thiện đáng kể khả năng kháng cisplatin trong cả điều kiện nuôi cấy thông thường và nuôi cấy thiếu oxi.⁷ Ngoài ra, Zhao và cộng sự (2023) đã chỉ ra ức chế HK2 có thể ngăn chặn quá trình tăng sinh, di cư và xâm lấn của u lympho tế bào B lớn lan tỏa, thông qua việc ức chế con đường tín hiệu ERK1/2.⁸ Hơn nữa, đánh giá biểu hiện của HK2 có giá trị như một dấu ấn sinh học hữu ích trong tiên lượng và đánh giá nguy cơ mắc bệnh. Bệnh nhân u lympho tế bào B lớn lan tỏa dương tính với HK2, do nghiên cứu hiện tại là bước đầu khảo sát mức độ biểu hiện của HK2 trong các dạng u lympho, các nghiên cứu tiếp theo cần được mở rộng để làm sáng tỏ thêm về vai trò của HK2 trong tiên lượng và đánh giá hiệu quả điều trị trên bệnh nhân u lympho.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã bước đầu đánh giá mức độ biểu hiện HK2 ở mức độ mRNA trong các dạng điển hình của u lympho và đã chỉ ra rằng mức độ biểu hiện HK2 thấp hơn đáng kể giữa các nhóm

u lympho với nhóm đối chứng ($p < 0,05$). Kết quả gợi ý vai trò của HK2 trong quá trình hình thành u lympho và tiềm năng của HK2 trong tiên lượng và đánh giá hiệu quả điều trị.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi quỹ NAFOSTED trong đề tài mã số 108.02-2018.312.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Calvo-Vidal MN, Cerchiatti L.** The metabolism of lymphomas. *Current Opinion in Hematology.* 2013; 20(4): 345. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283623d16
2. **Jiao L, Zhang HL, Li DD, et al.** Regulation of glycolytic metabolism by autophagy in liver cancer involves selective autophagic degradation of HK2 (hexokinase 2). *Autophagy.* 2018;14(4):671-684. doi:10.1080/15548627.2017.1381804
3. **Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, et al.** Hexokinase 2 Is Required for Tumor Initiation and Maintenance and Its Systemic Deletion Is Therapeutic in Mouse Models of Cancer. *Cancer Cell.* 2013;24(2):213-228. doi:10.1016/j.ccr.2013.06.014
4. **Porrata LF, Ristow K, Colgan JP, et al.** Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio at diagnosis and survival in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2012;97(2):262-269. doi:10.3324/haematol.2011.050138
5. **Jin J, Gui A, Chen G, et al.** Hexokinase II expression as a prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma: pre- and post-rituximab era. *Int J Hematol.* 2022;116(3): 372-380. doi:10.1007/s12185-022-03358-0
6. **Lin J, Fang W, Xiang Z, et al.** Glycolytic enzyme HK2 promotes PD-L1 expression and breast cancer cell immune evasion. *Front Immunol.* 2023;14: 1189953. doi:10.3389/fimmu.2023.1189953
7. **Nakajima K, Kawashima I, Koshiisi M, et al.** Glycolytic enzyme hexokinase II is a putative therapeutic target in B-cell malignant lymphoma. *Experimental Hematology.* 2019;78:46-55.e3. doi:10.1016/j.exphem.2019.09.023
8. **Zhao H, Xiang G, Shao T, Wang M, Dai W.** HK2 contributes to the proliferation, migration, and invasion of diffuse large B-cell lymphoma cells by enhancing the ERK1/2 signaling pathway. *Open Life Sci.* 2023; 18(1):20220726. doi:10.1515/biol-2022-0726

NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT REAL-TIME PCR ĐỂ KIỂM TRA CHỈ TIÊU TỔNG SỐ VI KHUẨN HIẾU KHÍ TRONG GIỚI HẠN NHIỄM KHUẨN CỦA DƯỢC PHẨM

Trịnh Túy An¹, Lưu Quốc Khánh¹, Lê Văn Hoài Trân¹, Nguyễn Khắc Tiệp², Vũ Thanh Thảo¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Kiểm nghiệm giới hạn nhiễm khuẩn là yêu cầu bắt buộc đối với dược phẩm trước khi đưa vào lưu hành trên thị trường. Phương pháp real-time PCR cho phép kiểm tra nhanh sự hiện diện của các vi sinh vật trong mẫu với độ nhạy và độ chính xác cao. **Mục đích:** Nghiên cứu kỹ thuật real-time PCR để kiểm tra chỉ tiêu tổng số vi khuẩn hiếu khí trong giới hạn nhiễm khuẩn. **Phương pháp:** Phương pháp chiết RNA bằng SDS-TRIzol được khảo sát trên các chủng vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Mỗi và nồng độ mỗi thích hợp để xác định mỗi chỉ tiêu được kiểm tra in silico và in vitro. Quy trình định lượng vi khuẩn bằng real-time PCR được thẩm định độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn định lượng (LOQ) và giới hạn phát hiện (LOD). **Kết quả:** Phương pháp chiết RNA bằng SDS-TRIzol cho hiệu quả chiết RNA tốt nhất với thời gian xử lý nhiệt để phá vỡ thành

tế bào vi khuẩn là 5 phút và không xử lý với lysozym. Định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí bằng RT-qPCR với cặp mồi Bac_890F/Bac_1034R nồng độ 50 nM cho LOQ và LOD là 8 CFU/ml và 2 CFU/ml. Quy trình khảo sát đạt các yêu cầu thẩm định về độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác và độ đúng (RSD < 25%). **Kết luận:** Kỹ thuật real-time PCR có thể được áp dụng để kiểm tra giới hạn nhiễm khuẩn về tổng số vi khuẩn hiếu khí trong dược phẩm. **Từ khóa:** real-time PCR, giới hạn nhiễm khuẩn, vi khuẩn hiếu khí.

SUMMARY

STUDY ON REAL-TIME PCR METHOD TO EXAMINE AEROBIC MESOPHILIC BACTERIA CRITERIA ON BACTERIAL LIMITS OF PHARMACEUTICALS

Background: Microbiological testing is a mandatory requirement for pharmaceuticals being put into circulation on the market. Real-time PCR is a technique that enables rapid detection of microorganisms present in a sample with high sensitivity and precision. **Objectives:** This research aims to study real-time PCR techniques for examining aerobic mesophilic bacteria criteria of bacterial limits. **Methods:** The RNA extraction method using SDS-TRIzol was investigated on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. For each criterion on

¹Đại học Y Dược TP.HCM

²Đại học Dược Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Vũ Thanh Thảo

Email: vuthanhthao@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 12.3.2024

Ngày phản biện khoa học: 19.4.2024

Ngày duyệt bài: 21.5.2024