

NGHIÊN CỨU ĐA HÌNH ĐƠN NUCLEOTIDE *RS36084323* CỦA GEN *PDCD-1* Ở BỆNH NHÂN NHIỄM VI RÚT VIÊM GAN B MẠN TÍNH

Ngô Thị Uyên¹, Nghiêm Xuân Hoàn², Tạ Thành Văn¹
Phạm Thị Minh Huyền², Đào Phương Giang² và Đặng Thị Ngọc Dung^{1,✉}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Đa hình đơn nucleotide (SNP) của gen *PDCD-1* được cho là có liên quan đến sự thay đổi phiên mã *PD-1* là phối tử quan trọng tham gia ức chế điểm kiểm soát miễn dịch tế bào T vì vậy có thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh lý bệnh của bệnh viêm gan B mạn tính. Nghiên cứu mô tả cắt ngang gồm 298 bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B (HBV) mạn tính [133 bệnh nhân viêm gan B mạn tính (CHB), 165 ung thư biểu mô tế bào gan (HCC)] và 159 người khỏe mạnh (HC) được tiến hành xác định tỉ lệ kiểu gen tại locus SNP *rs36084323* của gen *PDCD-1* bằng phương pháp giải trình gen Sanger sequencing và xác định mối liên quan giữa SNP *rs36084323* với nguy cơ nhiễm vi rút HBV mạn tính và ung thư gan. Kết quả cho thấy tỉ lệ kiểu gen CC, CT, TT lần lượt ở nhóm HC là 31,4%, 49,7%, 18,9%, ở nhóm CHB là 35,3%, 51,9%, 12,8%, ở nhóm HCC là 30,9%, 50,3%, 18,8%. Phân tích mô hình di truyền trội, so sánh tỉ lệ kiểu gen CC và CT với kiểu gen TT giữa các nhóm: nhiễm HBV mạn tính và HC: OR 1,21, 95%CI = 0,73 - 2,00, $p > 0,05$; HCC và CHB: OR = 1,58, 95%CI = 0,83 - 3,00, $p > 0,05$. Kết quả này cho thấy, SNP *rs36084323* của gen *PDCD-1* không liên quan đến nguy cơ nhiễm vi rút viêm gan B và không làm tăng nguy cơ tiến triển viêm gan B mạn tính thành ung thư gan.

Từ khóa: *PDCD-1*, *PD-1*, *PD-L1*, *rs36084323*, HBV, viêm gan B.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan B là một bệnh nhiễm trùng gây ra bởi vi rút viêm gan B (hepatitis virus BHBV), một trong những tác nhân gây bệnh phổ biến nhất trên toàn cầu. Theo tổ chức Y tế thế giới WHO, tính đến năm 2019 trên toàn thế giới có khoảng 296 triệu người mắc viêm gan B mạn tính và có khoảng 1,5 triệu ca nhiễm mới mỗi năm với 820 nghìn bệnh nhân tử vong.¹ Nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính có thể tiến triển thành xơ gan và ung thư gan, là hai nguyên nhân chính dẫn đến

tử vong của các bệnh nhân viêm gan B mạn tính, đáng chú ý là tỉ lệ xơ gan và ung thư gan ngày càng gia tăng làm tăng thêm gánh nặng bệnh tật cho các quốc gia trên thế giới.²

Tỉ lệ nhiễm vi rút viêm gan B phân bố cao nhất ở vùng Tây Thái Bình Dương, châu Phi, trong đó vùng Đông Nam Á có khoảng 18 triệu người nhiễm viêm gan B.¹ Việt Nam là một nước có tỉ lệ viêm gan B cao với khoảng 7,8 triệu người nhiễm viêm gan B ước tính khoảng 12% (điều tra trên không bao gồm các nhóm có nguy cơ cao) đã trở thành vấn đề đáng lưu tâm cho dù tỉ lệ mắc mới giảm do chương trình tiêm chủng mở rộng đã phát huy hiệu quả.

Vi rút viêm gan B (HBV) xâm nhập vào cơ thể người bệnh gây tình trạng viêm gan B cấp,

Tác giả liên hệ: Đặng Thị Ngọc Dung,

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: dzunghmu@gmail.com

Ngày nhận: 25/08/2021

Ngày được chấp nhận: 22/09/2021

sau đó có thể tiến triển thành viêm gan B mạn tính. Các nghiên cứu chỉ ra rằng sự suy yếu chức năng miễn dịch qua trung gian tế bào TCD8+ đặc hiệu với HBV là một trong cơ chế quan trọng trong nhiễm viêm gan B mạn tính.³ Sự suy yếu của các tế bào TCD8+ liên quan đến sự hoạt hóa con đường ức chế điểm kiểm soát miễn dịch thông qua con đường chết theo chương trình PD-1/PD-L1, PD-L2 (programmed Death Cell 1/ Programmed cell death ligand 1,2).^{4,5}

Protein PD-1 được mã hóa bởi gen *PDCD-1* nằm trên nhiễm sắc thể số 2, vị trí 2q37.3, trong đó vùng promoter là vùng gắn phức hợp khởi đầu phiên mã được cho rằng có liên quan với ái lực gắn yếu tố phiên mã, hoạt hóa gen, bất hoạt gen hoặc khởi đầu quá trình phiên mã. Như vậy các biến thể di truyền nằm tại vùng khởi động gen *PDCD-1* có thể làm thay đổi chức năng của gen hay mức độ biểu hiện gen. Trong số nhiều biến thể của gen *PDCD-1*, đa hình đơn nucleotide *rs36084323* (PD1.1 hay -538C/T) nằm trên bộ ba bắt đầu dịch mã (start codon) của vùng gen khởi động (promoter region). Vì vậy đa hình đơn nucleotide *rs36084323* có thể có vai trò đối với tính cảm nhiễm của vi rút HBV và tiến triển của viêm gan B thành ung thư gan. Tuy nhiên mối liên quan giữa SNP *rs36084323* với tính cảm nhiễm HBV và tiến triển bệnh lý gan do nhiễm vi rút HBV có sự khác nhau giữa các nghiên cứu. Do đó chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục đích xác định tỉ lệ kiểu gen SNP *rs36084323* trong nhóm nhiễm vi rút HBV mạn tính (nhóm bệnh) và nhóm người khỏe mạnh (nhóm chứng), mối liên quan với bệnh viêm gan B mạn tính, cũng như nguy cơ tiến triển thành ung thư gan.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu gồm hai nhóm: bệnh

nhân nhiễm vi rút HBV mạn tính và người khỏe mạnh không mang vi rút HBV.

Nhóm bệnh: 298 bệnh nhân nhiễm vi rút HBV mạn tính được lựa chọn theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Bộ Y tế 2019: HBsAg và/ hoặc HBV-DNA dương tính ≥ 6 tháng, hoặc HBsAg dương tính và anti HBe IgM âm tính.⁶ Bao gồm: 133 bệnh nhân viêm gan B mạn tính (CHB) và 159 bệnh nhân ung thư gan/viêm gan B mạn tính (HCC), tại Bệnh viện TƯ Quân đội 108 từ tháng 9 năm 2020 đến tháng 5 năm 2021.

Nhóm đối chứng: gồm 159 người không nhiễm HBV mạn tính được chọn từ đợt kiểm tra sức khỏe, phù hợp với các tiêu chuẩn được lựa chọn.

Tất cả đối tượng nghiên cứu đều âm tính với anti-HCV VÀ Anti-HIV, độ tuổi từ 18-70 và không mắc các bệnh lý tự miễn. Toàn bộ mẫu nghiên cứu được xử lý tách khối bạch cầu và bảo quản tủ âm ở -20°C cho đến khi tách DNA tổng số.

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả cắt ngang (có nhóm chứng).

Địa điểm nghiên cứu: Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

Phương pháp chọn mẫu: Phương pháp chọn mẫu thuận tiện.

Tách chiết, tinh sạch DNA tổng số và xác định kiểu gen tại locus SNP *rs36084323*

DNA tổng số được tách chiết bằng phương pháp tách chiết DNA sử dụng phenol-chloroform, sau đó kiểm tra độ tinh sạch và nồng độ bằng máy quang phổ (Nanophotometer IMPLEN, Đức), bảo quản ở -20°C đến khi sử dụng.

Để xác định kiểu gen tại locus SNP *rs36084323*, đoạn gen chứa vị trí đa hình này được nhân bản bằng PCR với cặp mồi xuôi: 5'TGGCACGAGTGGGCTGGAG3'; mồi ngược: 5'GGCTCAGGTTCCCTGGGCTG 3'.

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: giai đoạn

biến tính 95°C 10 phút, lặp lại 35 chu kỳ (biến tính 95°C 30 giây, gắn mồi 60°C 30 giây, kéo dài 72°C 45 giây), kéo dài 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% với kích thước 388bp.

Sau đó mẫu được tiến hành giải trình tự bằng BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), hệ thống tự động ABI 3130XL theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

3. Xử lý số liệu

Số liệu thu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 20.0 (IBM, USA) sử dụng phương pháp thống kê gồm: kiểm định T-test

kiểm định sự khác biệt về giá trị trung bình của hai biến, kiểm định Mann-Whitney so sánh dữ liệu của các biến liên tục giữa các nhóm khác nhau, kiểm định Khi bình phương (Chi-square test) xác định mối liên quan giữa kiểu gen SNP *rs36084323* với nguy cơ mắc bệnh, tiến triển bệnh bằng các giá trị OR và khoảng tin cậy 95% (95%CI), kết quả có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được chấp thuận bởi Hội đồng Đạo đức nghiên cứu y sinh học Trường Đại học Y Hà Nội số 64/GCN-HĐĐĐNCYSSH-ĐHYHN 25/03/2020.

III. KẾT QUẢ

1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Chỉ số	Bệnh (n = 298)	Chứng (n = 159)	p	OR 95%CI
Tuổi	51,96 ± 12,42	43,9 ± 8,73	0,00a	N/A
Nam	263 (88,3%)	76 (47,8%)	0,00*	8,21 [5,13 - 13,3]
Nữ	35 (11,7%)	83 (52,2%)		
WBC (G/L)	7,55 ± 3,05	7,17 ± 1,39	0,48b	N/A
RBC (T/L)	4,74 ± 0,72	4,84 ± 0,46	0,15b	
PLT (G/L)	210,36 ± 94,95	268,10 ± 56,10	0,00b	
AST (U/L)	324,86 ± 494,14	22,51 ± 6,90	0,00b	
ALT (U/L)	434,26 ± 754,38	20,6 ± 12,81	0,00b	
GGT (U/L)	274,72 ± 402,05	29,53 ± 28,71	0,00b	
Bilirubin toàn phần (µmol/L)	2,82 ± 2,39	3,17 ± 3,22	0,27b	
Bilirubin trực tiếp (µmol/L)	3,52 ± 2,35	1,33 ± 0,58	0,06b	
Protein (g/L)	73,17 ± 8,53	78,65 ± 4,55	0,00a	
Albumin (g/L)	37,36 ± 5,34	43,76 ± 2,25	0,00a	

p^* : Kiểm định Khi bình phương (χ^2), p^a : Kiểm định T-test, p^b : Kiểm định Mann-Whitney

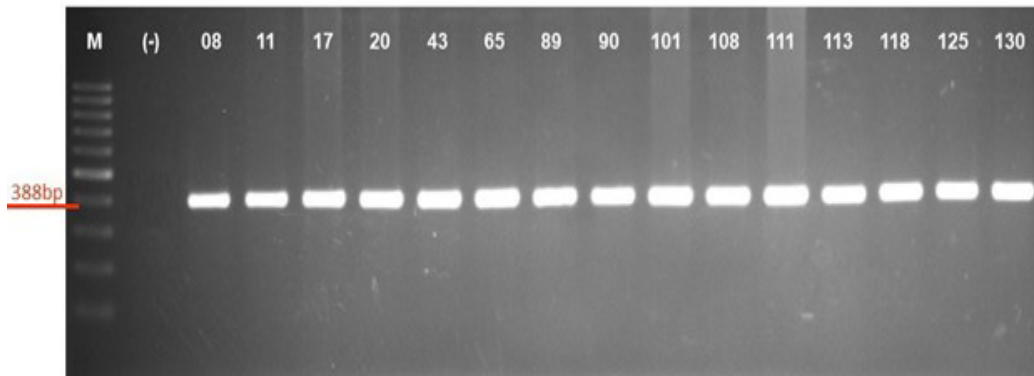
Trong nhóm đối tượng nghiên cứu, độ tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính cao hơn nhóm chứng với $p < 0,05$.

Kết quả bảng 1 cho thấy các chỉ số hoạt độ enzym AST, ALT, GGT ở nhóm bệnh tăng cao hơn

so với nhóm đối chứng ($p > 0,05$). Nồng độ Protein, Albumin, số lượng tiểu cầu (PLT) có sự giảm ở nhóm bệnh nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính ($p > 0,05$). Trong khi đó chỉ số Bilirubin toàn phần và Bilirubin trực tiếp, số lượng hồng cầu (RBC), số lượng bạch cầu (WBC) có sự tương đồng giữa hai nhóm ($p < 0,05$) (bảng 1).

2. Xác định kiểu gen tại locus SNP *rs36084323*

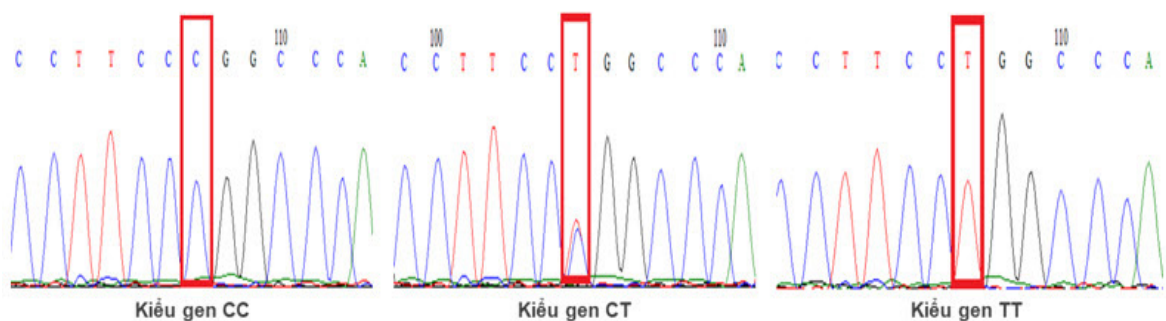
Nghiên cứu được thực hiện trên 298 mẫu DNA nhóm bệnh và 159 mẫu DNA nhóm chứng và được sử dụng làm khuôn cho các phản ứng PCR.



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn DNA chứa locus SNP *rs36084323*

M: (marker) thang DNA chuẩn 100bp, (-) chứng âm, các mẫu bệnh nhân được kí hiệu bằng số. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%, cho thấy đoạn DNA khuếch đại có kích thước khoảng 388bp với băng rõ nét, kích thước phù hợp với đoạn DNA đích chứa locus SNP *rs36084323*.

Các sản phẩm PCR thu được sau khi điện di được tinh sạch và giải trình tự bằng máy tự động. Trình tự DNA thu được so sánh với trình tự gốc trên Genbank (NC_000002.12:g.241859444C>T) (Hình 2).



Hình 2. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR gen *PDCD-1* chứa locus SNP *rs36084323* của các bệnh nhân mang kiểu gen CC, CT, TT

3. Phân tích mối liên quan giữa locus SNP *rs36084323* với nguy cơ nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính và nguy cơ mắc ung thư gan ở bệnh nhân viêm gan B mạn tính

Bảng 2. Mối liên hệ giữa kiểu alen, kiểu gen tại locus SNP *rs36084323* của gen PDCD-1 với nguy cơ nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính và nguy cơ ung thư gan

SNP <i>rs36084323</i>	Nhóm bệnh n (%)	Nhóm chứng n (%)	OR 95%CI	p*
Kiểu gen				
CC	98 (32,9%)	50 (31,4%)		0,75
CT	152 (51%)	79 (49,7%)		
TT	48 (16,1%)	30 (18,9%)		
Alen				
C	348 (58,4%)	179 (56,3%)	1,10	0,54
T	248 (41,6%)	139 (43,7%)	[0,83 - 1,44]	
Mô hình trội				
CC+CT	250(83,9%)	129(81,1%)	1,21	0,46
TT	48 (16,1%)	30 (18,9%)	[0,73 - 2,00]	
	Viêm gan B mạn tính n (%)	Ung thư gan n (%)	OR 95%CI	p*
Kiểu gen				
CC	47 (35,3%)	51 (30,9%)		0,35
CT	69 (51,9%)	79 (50,3%)		
TT	17 (12,8%)	30 (18,8%)		
Kiểu alen				
C	163 (61,3%)	185 (56,1%)	0,81	0,20
T	103 (38,7%)	145 (43,9%)	[0,58 - 1,12]	
Mô hình trội				
CC+CT	116 (87,2%)	134 (81,2%)	1,58	0,16
TT	17 (12,8%)	31 (18,8%)	[0,83 - 3,00]	

p*: Kiểm định Khi bình phương (χ^2)

So sánh tỉ lệ kiểu gen CC+CT và tần số alen C ở nhóm bệnh cao hơn so với nhóm chứng. Phân tích mối liên quan của kiểu gen và alen giữa SNP *rs36084323* và mô hình trội với nguy cơ mắc viêm gan B mạn tính không thấy sự khác biệt có nghĩa ý thống kê ($p > 0,05$)

Phân tích tỉ lệ kiểu gen CC+CT và TT, tỉ lệ alen C và T giữa hai nhóm viêm gan B mạn tính và ung thư gan không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, không làm tăng nguy cơ mắc ung thư gan ở nhóm bệnh nhân viêm gan B mạn tính ($p > 0,05$).

4. Mối liên quan giữa các yếu tố nguy cơ và nguy cơ mắc bệnh, tiến triển bệnh

Nguy cơ về giới: Trong nhóm bệnh nhân nghiên cứu tỉ lệ nam giới chiếm 88,3% trong khi nhóm chứng nam giới chỉ chiếm 47,8% cho thấy nam giới là một yếu tố nguy cơ làm tăng khả năng nhiễm vi rút HBV ($p < 0,05$) (bảng 1). Do đó trên đối tượng nam giới, nghiên cứu của chúng tôi tiến hành phân tích mối liên quan giữa kiểu gen tại SNP rs36084323 với nguy cơ mắc bệnh viêm gan B.

Bảng 3. Tỉ lệ kiểu gen và mối liên quan giữa kiểu gen SNP rs36084323 với nguy cơ mắc viêm gan B và nguy cơ mắc ung thư gan ở nam giới

		Nhóm bệnh		Nhóm chứng		OR 95%CI	p*
		n	%	n	%		
Kiểu gen	CC	83	31,6	27	35,5	N/A	0,38
	CT	137	52,1	33	43,4		
	TT	43	16,3	16	21,1		
Mô hình trội	CC+CT	220	83,7	60	78,9	1,36 [0,72 - 2,59]	0,34
	TT	43	16,3	16	21,1		
		Ung thư gan		Viêm gan B mạn tính		OR 95%CI	P*
		n	%	n	%		
Kiểu gen	CC	46	29,9	37	33,9	N/A	0,26
	CT	78	50,6	59	54,1		
	TT	30	19,5	13	11,9		
Mô hình trội	CC+CT	124	80,5	96	88,1	0,56 [0,28 - 1,13]	0,10
	TT	30	19,5	13	11,9		

p*: Kiểm định Khi bình phương (χ^2)

Tuy nhiên kiểu gen CC, CT, TT giữa nhóm bệnh với nhóm chứng và giữa nhóm ung thư gan với nhóm viêm gan B mạn tính không có sự khác biệt liên quan đến nguy cơ mắc bệnh và tiến triển thành ung thư ở nam ($p > 0,05$). Phân tích theo mô hình trội, tỉ lệ kiểu gen (CC+CT) ở nhóm bệnh cao hơn nhóm chứng (OR = 1,36; 95%CI = 0,72 - 2,59), và giữa nhóm ung thư gan với nhóm viêm gan B mạn tính (OR = 0,56; 95%CI = 0,28 - 1,13) nhưng kết quả này không có ý nghĩa thống kê để khẳng định những người mang alen C(CT+CT) có nguy cơ nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính hay liên quan đến tiến triển bệnh viêm gan B mạn tính ($p > 0,05$).

Khi so sánh độ tuổi trung bình giữa nhóm bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B và nhóm chứng, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có sự khác biệt về độ tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân ung thư gan với nhóm viêm gan B mạn tính và nhóm chứng ($p < 0,05$). Do đó chúng tôi tiến hành đánh giá mối liên quan giữa kiểu gen SNP rs36084323 và tuổi với nguy cơ mắc viêm gan B và nguy cơ tiến triển thành ung thư gan.

Bảng 4. Mối liên quan giữa kiểu gen SNP rs36084323 và nguy cơ nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính và nguy cơ tiến triển thành ung thư gan ở nhóm tuổi từ 45

		Nhóm bệnh		Nhóm chứng		OR [95%CI]	P*
		n	%	n	%		
Kiểu gen	CC	75	34,6	29	38,7	N/A	0,81
	CT	104	47,9	34	45,3		
	TT	38	17,5	12	16		
Mô hình trội	CC+CT	179	82,5	63	84	0,90 [0,44 - 1,82]	0,77
	TT	38	17,5	12	16		
		Ung thư gan		Viêm gan B mạn		OR [95%CI]	p*
		n	%	n	%		
Kiểu gen	CC	45	30,8	30	42,3	N/A	0,25
	CT	74	50,7	30	42,3		
	TT	27	18,5	11	15,5		
Mô hình trội	CC+CT	119	81,5	60	84,5	0,81 [0,38 - 1,74]	0,59
	TT	27	18,5	11	15,5		

p*: Kiểm định Khi bình phương (χ^2)

Trong nhóm đối tượng ≥ 45 tuổi, tỉ lệ kiểu gen giữa ba nhóm viêm gan B mạn tính, nhóm ung thư gan và nhóm chứng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Phân tích mô hình trội, kiểu gen (CC+CT) khác nhau giữa nhóm bệnh và nhóm chứng (OR = 0,90; 95%CI = 0,44 - 1,82), giữa nhóm ung thư gan và với viêm gan B mạn tính (OR = 0,81; 95%CI=0,38 - 1,74), tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa để khẳng định nguy cơ mắc bệnh và tiến triển thành ung thư cao hơn của nhóm bệnh mang alen C ($p > 0,05$)

IV. BÀN LUẬN

Trong nhóm đối tượng nghiên cứu, độ tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân ung thư gan cao hơn nhóm viêm gan B mạn tính. Kết quả này phù hợp với các kết quả nghiên cứu về viêm gan B và ung thư gan trên thế giới. Theo nghiên cứu của Linghua Zheng và cộng sự thực hiện trên 336 bệnh nhân, tuổi trung bình

CHB $35,15 \pm 13,63$, 74,6%, HCC $53,84 \pm 10,18$ tỉ lệ nam giới chiếm 88,2%, và tỉ lệ nam giới chiếm 88,7%. Theo Nguyễn Thị Thúy Vân và cộng sự tiến hành nghiên cứu cắt ngang tại với 837 bệnh nhân, độ tuổi trung bình của bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính tại Thái Bình là $42,3 \pm 15,8$. Theo nghiên cứu của Lê Văn Quảng và cộng sự tại 3 bệnh viện bao gồm Viện Ung thư Quốc gia Việt Nam, Bệnh viện Bạch Mai và Bệnh viện Đại học Y Hà Nội nằm ở miền Bắc Việt Nam với độ tuổi trung bình của bệnh nhân ung thư gan là 57 (19 - 86), tỉ lệ nam giới chiếm 89,9%.⁷⁻¹⁰

Tỉ lệ nam giới trong nhóm bệnh nhân viêm gan B mạn tính cao (88,3%) phù hợp với các nghiên cứu ở trên. Nam giới là một yếu tố nguy cơ đã được chứng minh có liên quan đến nguy cơ gây bệnh và tiến triển của viêm gan B thành ung thư gan bởi các yếu tố như rượu, bia, thuốc lá, hormon.^{7,11} Kết quả này cũng phù hợp với yếu tố dịch tễ viêm gan B tại Việt Nam với tỉ lệ

nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính cao hơn ở nam giới.¹²

Gen *PDCD-1* nằm trên cánh dài của NST số 2 (2q27.3), mã hóa protein bề mặt *PD-1*. *PD-1* được biểu hiện chủ yếu trên các tế bào T CD4 hoạt hóa, tế bào T CD8 hoạt hóa cũng như các tế bào B ngoại vi, ngoài ra còn có mặt trên các tế bào diệt tự nhiên (NK -natural kill cells), bạch cầu đơn nhân hoạt hóa và một số tế bào tua gai.¹³ *PD-1* là một glycoprotein xuyên màng, gồm phần ngoại bào là miền immunoglobulin Ig giống IgV ở đầu N, và phần nội bào chứa một motif ức chế phụ thuộc thụ thể tyrosine (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif - ITIM) và một motif chuyển phụ thuộc thụ thể tyrosine (Immunoreceptor tyrosine-base switch motif -ITSM).¹⁴ *PD-1* khi được liên kết với phối tử của nó là *PDL-1/PDL-2* có thể kích hoạt ITIM và ITSM tạo ra tín hiệu ức chế làm sự hoạt hóa của tế bào T, giảm sản xuất cytokine, giảm khả năng ly giải tế bào đích, cuối cùng làm tăng quá trình chết theo chương trình của tế bào T. Do đó *PD-1* tham gia qua trình điều hòa chức năng của tế bào T trong quá trình đáp ứng miễn dịch, tăng dung nạp miễn dịch nhằm ngăn cản các phản ứng miễn dịch quá mẫn, duy trì khả năng dung nạp miễn dịch cho các tế bào trong cơ thể. Tăng biểu hiện *PD-1* trên tế bào lympho T đặc hiệu u là giảm khả năng hoạt hóa của tế bào T giúp tế bào u lẩn tránh đáp ứng miễn dịch vật chủ tạo điều kiện cho khối u hình thành và phát triển. Vì vậy ức chế con đường tín hiệu *PD-1/PD-L1* có khả năng làm tăng các phản ứng chống lại tế bào u của tế bào miễn dịch. Các đa hình đơn gen từ lâu được chứng minh là có thể liên quan đến điều hòa biểu hiện gen theo nhiều cơ chế.¹⁴

Rs36084323 nằm trong vùng promoter, là vị trí liên kết cho các phức hợp điều hòa phiên mã *UCE-2* là yếu tố tăng cường phiên mã.¹⁶ Đáp ứng với *UCE-2* của promoter trong cấu

trúc *rs36084323* mang alen C cao hơn đáng kể so với alen T, do đó có khả năng biểu hiện *PD-1* cao hơn. Do đó tăng khả năng ức chế sự hoạt hóa và tăng sinh tế bào T, dẫn đến giảm khả năng loại bỏ tế bào ung thư.¹¹ Tuy nhiên các kết quả nghiên cứu rất khác nhau. Trong phân tích gộp của Hashemi thấy đa hình này không liên quan với nguy cơ ung thư nói chung.¹⁷ Nhưng khi phân tích theo chủng tộc trong nghiên cứu của Da LS và cộng sự lại cho thấy tại locus *rs36084323* kiểu gen TT tăng nguy cơ ung thư ở quần thể người châu Á.¹⁸ Một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng alen C liên quan đến giảm nguy cơ mắc các bệnh ung thư.^{19,20} Ở đối tượng viêm gan B, kết quả nghiên cứu của Gyoyu Zhang và cộng sự²¹ tại Thiểm Tây, Trung Quốc cho thấy tỉ lệ kiểu gen tại locus SNP *rs36084323* giữa những bệnh nhân viêm gan B mạn tính và nhóm đối chứng không có sự khác nhau. Tuy nhiên một nghiên cứu khác tại bệnh viện Xiangya, Đại học Trung Nam Trung Quốc do Zouhua Hou và cộng sự²² lại cho thấy, kiểu gen TT chiếm tỉ lệ cao hơn đáng kể ở nhóm nhiễm vi rút HBV mạn tính so với nhóm bệnh nhân tự phục hồi sau nhiễm viêm gan B cấp. Các nghiên cứu hiện nay chưa có sự đồng nhất về kết quả. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ kiểu gen và alen tại locus SNP *rs36084323* giữa các nhóm tương đồng nhau, phân tích mô hình di truyền cũng không cho thấy có sự khác biệt về tỉ lệ kiểu gen (CC+CT) ở cả 3 nhóm bệnh nhân viêm gan B mạn tính, ung thư gan và nhóm chứng. Kết quả này cho thấy SNP *rs36084323* không có ảnh hưởng đến nguy cơ mắc viêm gan B ở người Việt Nam và không làm tăng nguy cơ tiến triển thành ung thư gan ở bệnh nhân nhiễm viêm gan B mạn tính. Phân tích đa biến trong nhóm bệnh nhân nam giới và nhóm từ 45 tuổi, không có mối liên quan giữa kiểu gen và nguy cơ mắc bệnh cũng như tiến triển thành ung thư gan ở bệnh nhân viêm gan B

mạn tính. Nhiễm vi rút HBV mạn tính phụ thuộc vào sự tương tác của nhiều yếu tố và không có một gen nào chịu trách nhiệm duy nhất đối với bệnh. Đôi khi những yếu tố môi trường có thể ảnh hưởng tới tính nhạy cảm ở các quần thể khác nhau. Vậy nên những kết luận khác nhau trong các nghiên cứu về SNP có thể là do sự khác biệt về quần thể, dân tộc nghiên cứu và cỡ mẫu nghiên cứu. Nghiên cứu của chúng tôi chưa có sự tương xứng về số lượng các nhóm đối tượng do hạn chế về thời gian, chi phí và quần thể chọn mẫu. Đây là nghiên cứu đầu tiên về SNP *rs36084323* trên đối tượng bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B tại Việt Nam, những nghiên cứu tiếp theo với cỡ mẫu lớn hơn, tiến hành trên nhiều nhóm bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B là cần thiết để đưa ra các kết luận thuyết phục hơn.

V. KẾT LUẬN

Tần số alen C và T tại locus SNP *rs36084323* của gen *PDCD-1* không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh nhân nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính, nhóm ung thư gan và ở nhóm người không nhiễm HBV. Phân tích theo mô hình trội, sự khác biệt về tần số kiểu gen CC và CT ở nhóm bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính không có ý nghĩa thống kê, cho thấy kiểu gen không liên quan đến nguy cơ nhiễm vi rút viêm gan B mạn tính và không làm tăng nguy cơ tiến triển thành ung thư gan ở nhóm mẫu của nghiên cứu này tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, Bộ môn Hóa sinh - Trường Đại học Y Hà Nội, Quỹ Phát triển công nghệ và khoa học quốc gia (Nafosted; mã số đề tài: 108.02-2018.315) đã hỗ trợ để thực hiện nghiên cứu này và toàn thể bệnh nhân đã đồng ý tham gia vào nghiên cứu của chúng tôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hepatitis B. Accessed August 10, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
2. World Health Organization. Global Hepatitis Programme. Global Hepatitis Report, 2017. 2017. Accessed April 23, 2020. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>
3. Peng H, Li QL, Hou SH, et al. Association of genetic polymorphisms in CD8 + T cell inhibitory genes and susceptibility to and progression of chronic HBV infection. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015; 36: 467-474. doi:10.1016/j.meegid.2015.08.018
4. Chamoto K, Al-Habsi M, Honjo T. Role of PD-1 in Immunity and Diseases. In: Yoshimura A, ed. Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer International Publishing; 2017: 75-97. doi:10.1007/82_2017_67
5. Azuma M, Yagita H, eds. Co-Signal Molecules in T Cell Activation: Immune Regulation in Health and Disease. Vol 1189. Springer Singapore; 2019. doi:10.1007/978-981-32-9717-3
6. Bộ Y Tế. Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị bệnh viêm gan vi rút B. Published online July 29, 2019:17.
7. Taylor BC, Yuan J-M, Shamlivan TA, Shaukat A, Kane RL, Wilt TJ. Clinical outcomes in adults with chronic hepatitis B in association with patient and viral characteristics: A systematic review of evidence. *Hepatology*. 2009; 49(S5): S85-S95. doi:10.1002/hep.22929
8. Zheng L, Li D, Wang F, et al. Association Between Hepatitis B Viral Burden in Chronic Infection and a Functional Single Nucleotide

- Polymorphism of the PDCD1 Gene. *J Clin Immunol.* 2010; 30(6): 855-860. doi:10.1007/s10875-010-9450-1
9. Nguyen VTT, McLaws ML, Dore GJ. Highly endemic hepatitis B infection in rural Vietnam. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22(12): 2093-2100. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.05010.x
10. Le VQ, Nguyen VH, Nguyen VH, et al. Epidemiological Characteristics of Advanced Hepatocellular Carcinoma in the Northern Region of Vietnam. *Cancer Control.* 2019; 26(1): 1073274819862793. doi:10.1177/1073274819862793
11. Cote PJ, Korba BE, Miller RH, et al. Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology.* 2000; 31(1): 190-200. doi:10.1002/hep.510310128
12. Nguyen VTT. Hepatitis B Infection in Vietnam: Current Issues and Future Challenges. *Asia Pac J Public Health.* 2012; 24(2): 361-373. doi:10.1177/1010539510385220
13. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008; 26: 677-704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
14. Okazaki T, Honjo T. The PD-1–PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in Immunology.* 2006; 27(4): 195-201. doi:10.1016/j.it.2006.02.001
15. Wagner M, Jasek M, Karabon L. Immune Checkpoint Molecules—Inherited Variations as Markers for Cancer Risk. *Front Immunol.* 2021; 11: 606721. doi:10.3389/fimmu.2020.606721
16. Sasaki H, Tatematsu T, Okuda K, et al. PD-1 gene promoter polymorphisms correlate with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Mol Clin Oncol.* 2014; 2(6): 1035-1042. doi:10.3892/mco.2014.358
17. Hashemi M, Karami S, Sarabandi S, et al. Association between PD-1 and PD-L1 Polymorphisms and the Risk of Cancer: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Cancers (Basel).* 2019; 11(8). doi:10.3390/cancers11081150
18. Da LS, Zhang Y, Zhang CJ, et al. The PD-1 rs36084323A>G polymorphism decrease cancer risk in Asian: A meta-analysis. *Pathology - Research and Practice.* 2018; 214(11): 1758-1764. doi:10.1016/j.prp.2018.09.015
19. Hua Z, Li D, Xiang G, et al. PD-1 polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese Han population of Northeast China. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 129(1): 195-201. doi:10.1007/s10549-011-1440-3
20. Li Y, Zhang HL, Kang S, et al. The effect of polymorphisms in PD-1 gene on the risk of epithelial ovarian cancer and patients' outcomes. *Gynecol Oncol.* 2017; 144(1): 140-145. doi:10.1016/j.ygyno.2016.11.010
21. Zhang G, Liu Z, Duan S, et al. Association of polymorphisms of programmed cell death-1 gene with chronic hepatitis B virus infection. *Human Immunology.* 2010; 71(12): 1209-1213. doi:10.1016/j.humimm.2010.08.014
22. Hou Z, Zhou Q, Lu M, Tan D, Xu X. A Programmed Cell Death-1 Haplotype is Associated with Clearance of Hepatitis B Virus. *Ann Clin Lab Sci.* 2017; 47(3): 334-343.

Summary

ASSOCIATION SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM RS36084323 IN *PDCD-1* GENE IN HEPATITIS B PATIENTS

The single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *PDCD-1* gene are thought to be involved in transcriptional changes of PD-1, which is an important ligand involved in T-cell depletion and therefore may play a role important in the pathophysiology of chronic Hepatitis B. We designed a cross sectional study– recruited 298 patients with chronic HBV infection [133 patients with chronic hepatitis B (CHB) and 165 patients with hepatocellular cancer (HCC)] and 159 healthy individuals (HC). PD1.1 was genotyped by Sanger sequencing method. We analyzed the association between SNP rs36084323 and HBV infection susceptibility and HCC progression risk. The frequencies of genotype at SNP rs36084323 CC, CT, and TT were: 31.4%, 49.7% 18.9% in the HC group; 35.3%, 51.9%, and 12.8% in the CHB group, and 30.9%, 50.3%, and 18.8% in HCC group. There were no association between rs36084323 and HBV infection susceptibility and HCC development risk in the recessive model (TT vs. CC+CT): HBV infection vs. HC: OR = 1.21, 95% CI = 0.73 - 2.00, P > 0.05 and HCC vs. CHB: OR = 1.58, 95% CI = 0.83 - 3.00, P > 0.05. Result suggests that the SNP rs36084323 of the *PDCD-1* gene did not associate with hepatitis B infection and HCC predisposition.

Keywords: *PDCD-1*, PD-1, PD-L1, rs36084323, HBV, hepatitis B, HCC.