

ĐỘ BIẾN TRÊN GEN CXCL1 Ở TRẺ SƠ SINH BỊ PHƠI NHIỄM ASEN TRƯỚC SINH

Trần Phương Thảo¹, Tạ Thị Bình², Nguyễn Huy Hoàng¹

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

²Viện Y học lao động và Vệ sinh môi trường

TÓM TẮT

Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) là phân tử cytokine nhỏ thuộc họ chemokine, trước kia gọi là gen GRO1, GRO α , KN hay NAP-3. Gene mã hóa CXCL1 nằm trên chromosome 4, có ảnh hưởng tới các tế bào hệ thống thần kinh trung tâm cũng như màng trong tế bào, liên quan tới sự hình thành mạch và được bài tiết bởi các tế bào u ác tính, có tính chất phân chia và có liên quan đến phát sinh khối u ác tính. Gen CXCL1 là một nhân tố tham gia vào quá trình phiên mã, nên tác động đến khả năng miễn dịch của cơ thể. Bên cạnh đó, phơi nhiễm asen hoạt hóa quá trình phiên mã thông qua phản ứng stress ở các loài động vật và cả ở người. CXCL1 liên quan đến phơi nhiễm asen và có khả năng là một biomarker trong phơi nhiễm asen trước sinh. Phân tích tự gen mẫu máu cuống rốn của trẻ sơ sinh phát hiện 1 đột biến thay thế một nucleotide thứ 1124 trên genome từ G thành A (g.1124G>A) ở vị trí codon 76 chuyển đổi amino acid từ alanine thành threonine (A76T) trên 2 mẫu cuống rốn của trẻ sơ sinh phơi nhiễm với asen có nồng độ cao trong nước sinh hoạt (trên 200 μ g/l). Ngoài ra cả ba mẫu nghiên cứu đều mang allele đột biến G trên SNP rs4074. Kết quả này là tiền đề cho việc đánh giá sự biến đổi về gen ở trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm asen trước sinh.

Từ khóa: CXCL1, đa hình nucleotide đơn, đột biến, miễn dịch, phơi nhiễm asen.

MỞ ĐẦU

Việt Nam cũng là một trong những nước nằm trong vùng có ô nhiễm asen nguồn nước ngầm trên bản đồ thế giới. Việc asen tồn tại trong nguồn nước ăn uống và sinh hoạt của người dân với nồng độ quá mức cho phép đã tác động đáng kể đến sức khỏe con người. Cho đến nay, đã có khá nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới xác định phơi nhiễm asen trong thời gian dài có liên quan mật thiết với khả năng gia tăng các bệnh ung thư da, phổi, vòm họng, thận, bàng quang, ruột... (Hopenhayn-Rich, *et al.* 1998). Các nghiên cứu này tập trung ở khu vực châu Á, Ấn Độ, và Mi (Ferreccio, *et al.* 2000); (Hopenhayn-Rich, *et al.* 2000). Một số cơ chế sinh ung thư được cho rằng liên quan đến phơi nhiễm asen bao gồm cả cơ chế gây độc và không gây độc như cơ chế kích thích sự biến đổi nhiễm sắc thể (induction of chromosomal aberrations), oxy hóa stress, khuếch đại gene, điều hòa chu trình tế bào và methyl hóa DNA. (Fry, *et al.* 2007).

Một nghiên cứu ở Bangladesh trên 29134 các bà mẹ mang thai cho thấy có sự liên quan đáng kể giữa phơi nhiễm asen thời kỳ trước sinh và số trẻ gòn sống sau sinh. Theo Ferrario và cộng sự (2009), phụ nữ có độ nhạy với asen cao hơn nhiều so với nam giới. Khi phụ nữ mang thai bị phơi nhiễm asen thì sẽ bị tăng huyết áp đồng thời cũng bị thiếu máu, bên cạnh đó asen từ cơ thể mẹ sẽ nhanh chóng được đưa đến bào thai từ đó làm tăng nguy cơ sảy thai, sinh non, tử vong ở trẻ sơ sinh hoặc gây giảm tăng trưởng của thai và trẻ sơ sinh dù chỉ phơi nhiễm một hàm lượng rất nhỏ.

Theo nghiên cứu của Fry và cộng sự 2007, một bộ 11 gen trong đó có CXCL1 có tiềm năng là biomarker trong xác định phơi nhiễm asen trước sinh. Nhóm nghiên cứu đã phân tích mối liên quan giữa phơi nhiễm asen và biểu hiện của 11 gen này, kết quả cho thấy độ chính xác trong tiên đoán về phơi nhiễm asen trước sinh lên đến 83%. Phơi nhiễm asen là một nhân tố kích hoạt quá trình phiên mã thông qua phản ứng stress ở các loài động vật và cả con người. Các phân tích mạng lưới sinh học đã chỉ ra rằng quá trình phiên mã dưới sự ảnh hưởng của asen có thể làm thay đổi một số các quá trình sinh học bao gồm chết theo chương trình (apoptosis), tín hiệu tế bào, phản ứng viêm, đáp ứng stress, và sau cùng là ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Argo và cộng sự 2006 cũng đã sử dụng microarray đánh giá các đặc tính biểu hiện gen trong tế bào lympho ngoại vi của người bệnh bị phơi nhiễm asen trong đó có nhóm gen CXCL. Gen CXCL1 được cho là nhân tố làm tăng cường phiên mã ở những người bị phơi nhiễm asen. Sự biểu hiện của CXCL1/GRO1 bị giảm đi trong các nguyên bào sợi ở người sau khi xử lý với 5 μ M asen trong 0-24 giờ (Yih, *et al.* 2002), nhưng lại tăng lên khi asen liên kết với tế bào lympho trong máu của các đối tượng nghiên cứu đã ăn và uống nước giếng nhiễm asen trong một khoảng thời gian dài (Wu, *et al.* 2003). Các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* chỉ ra sự suy giảm quá trình sản sinh lymphocyte, giảm số lượng tế bào CD4+, tỉ lệ tế bào CD4+:CD8+ cũng như giảm tế bào điều hòa T ở người bị phơi nhiễm (Hernandez-Castro, *et al.* 2009). Một nghiên cứu khác cũng cho thấy rằng phơi nhiễm asen trong thời kỳ thai nghén cùng với oxy hóa stress làm tăng cytokines và leptin ở nhau thai, hơn nữa còn làm giảm số lượng tế bào T trong nhau thai, phá vỡ cân bằng miễn dịch và gây ảnh hưởng đến quá trình phát triển của bào thai (Ahmed, *et al.* 2011).

Trong cơ thể, asen được chuyển hóa thành các monomethyl asen (MMAs), dimethyl asen (DMAs) và được bài tiết chủ yếu qua nước tiểu. Thực tế cho thấy, sự xuất hiện các sai khác về MMAs trong nước tiểu giữa các cá thể có liên quan đến sự đa hình di truyền (Vahter, *et al.* 2000). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được hai đột biến mới và 1 điểm đa hình nucleotide đơn trên gen CXCL1 ở những trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm asen trước sinh bằng phương pháp đọc trình tự gen. Kết quả này là tiền đề cho việc đánh giá mức độ tổn thương di truyền tế bào và gen gây ra do asen

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Mẫu máu cuống rốn (HT03, HT09, HT22) của trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm asen trước sinh được thu thập từ Bệnh viện đa khoa tỉnh Hà Nam – vùng được đánh giá có mức độ ô nhiễm asen cao.

Các hóa chất dùng cho phản ứng PCR (buffer, dNTP, enzyme taq polymerase...) và bộ Kit tách chiết DNA, tinh sạch DNA nhập từ hãng Fermentas (Mỹ) cung cấp. Các cặp mồi đặc hiệu được cung cấp bởi hãng Integrated DNA Technologies.

Trình tự đoạn mồi (primers) nhân đoạn gen CXCL1 được thiết kế dựa vào phần mềm tin sinh học primer3 Biology Workbench (<http://seqltool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi#1>) (Bảng 1)

Bảng 1. Trình tự mồi nhân đoạn gen CXCL1

Kí hiệu	Mồi	Trình tự nucleotit
CXCL-3	Exon 1, 2, 3 – Intron 1, 2	F 5' – GCCGCAGGCACCTCCTCGC – 3'
		R 5' – TCCTACTGGGCCTCAAATGAAG – 3'
CXCL-4	Exon 3, 4 – Intron 3	F 5'-GCTTGCCTCAATCCTGCAT – 3'
		R 5' – CTCTCCTAAGCGATGCT – 3'

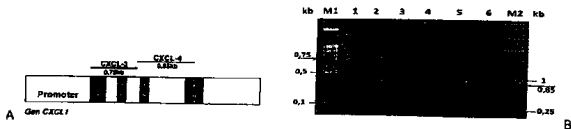
Phương pháp nhân và giải trình tự gen CXCL1

DNA tổng số của các mẫu bệnh được tách chiết bằng bộ kit GeneJet™ Genomic DNA Purification Kit của hãng Fermentas từ máu cường rốn của trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm asen trước sinh.

Toàn bộ gen chức năng CXCL1 được nhân lên bằng phương pháp PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu như trong Bảng 1. Phản ứng PCR được tiến hành thực hiện trong tổng thể tích 50 µl gồm các thành phần: ADN khuôn (100 - 200ng), mỗi xuôi và mỗi ngược (20 pmol), dNTP (0,4 mM), MgSO₄ (4mM) Taq polymerase (3U), buffer PCR (1X). Chu trình nhiệt của cả hai cặp mồi CXCL-3 và CXCL-4 được thực hiện gồm 30 chu kỳ với biến tính ở 95°C trong 3 phút, gắn mồi ở 55°C trong 1 phút và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 30 giây. Sản phẩm PCR của gen CXCL1 được tiến hành tinh sạch bằng bộ GeneJet Gel Extraction Kit (Fermentas). Cuối cùng, sản phẩm PCR tinh sạch sẽ được tiến hành đọc trình tự trực tiếp trên máy giải trình tự ABI 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, Hoa Kỳ).

Kết quả đọc trình tự được phân tích và so sánh với trình tự trên ngân hàng gene (GeneBank) với mã số NCBI NM_001511.3.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN



Hình 1: Kết quả nhân gen CXCL1. A: Sơ đồ nhân gen CXCL1. B: Điện di sản phẩm PCR nhân gen CXCL1
 M: Marker; 1: mẫu HT 03 đoạn CXCL-3, 2: mẫu HT 09 đoạn CXCL-3, 3: mẫu HT 22 đoạn CXCL-3, 4: mẫu HT 03 đoạn CXCL-4, 5: mẫu HT 09 đoạn CXCL-4, 6: mẫu HT 22 đoạn CXCL-4.

Sản phẩm DNA tổng số sau khi được tách chiết từ mẫu máu cường rốn của trẻ sơ sinh đạt độ tinh sạch đủ để làm khuôn cho phản ứng PCR. Hai cặp mồi đặc hiệu cho gen CXCL1 được chúng tôi sử dụng để nhân toàn bộ đoạn gen có kích thước khoảng 1.6 kb (Hình 1A). Kết quả điện di được kiểm tra trên gel agarose 0,8% cho thấy sản phẩm PCR thu được đều rất đặc hiệu, băng hiện rõ ràng, không có dấu hiệu bị đứt gãy và có kích thước chính xác so với dự kiến ban đầu (Hình 1B).

Sản phẩm DNA sau khi thời gel và tinh sạch được đọc trình tự trực tiếp để tìm ra các điểm đột biến và đa hình. Kết quả giải trình tự gene được phân tích trên phần mềm tin học BioEdit. Trên phần mềm này, chúng tôi có thể so sánh trình tự DNA đã được đọc với trình tự gene CXCL1 chuẩn trên ngân hàng gene người.

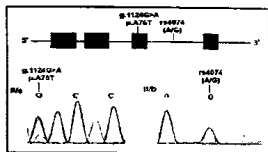
Khi nguồn nước ngầm bị nhiễm asen vô cơ ở nồng độ 50 µg/L, nguy cơ gây ung thư tăng lên đáng kể. Sự phát sinh bệnh tật phụ thuộc vào thời gian tích lũy asen trong cơ thể. Biểu hiện bên ngoài đầu tiên dễ thấy là các biến đổi sắc tố trên da và dây rốn, nguy cơ dẫn đến ung thư da là rất cao. Quá trình phơi nhiễm tiếp tục gây ảnh hưởng đến hệ tuần hoàn cũng như hệ thần kinh. Sau nhiều năm phơi nhiễm có thể xuất hiện các bệnh ung thư phổi, thận hoặc tiết niệu. Hội đồng Châu Âu và Tổ chức y tế thế giới (WHO) khuyến cáo mức tối đa asen trong nguồn nước ăn là 10 µg/L, đây cũng chính là tiêu chuẩn của Việt Nam hiện nay. Khi asen đi vào cơ thể sẽ được chuyển hóa thành các monomethyl asen (MMAs) và dimethyl asen (DMAs) và các hợp chất asen này cuối cùng được bài tiết chủ yếu qua nước tiểu. Vì vậy, nồng độ asen tổng số trong nước tiểu của các bà mẹ sống tại nơi mà nguồn nước ngầm bị nhiễm asen trong một khoảng thời gian dài đã được xác định (Bảng 2).

Bảng 2: Nồng độ asen trong nước sinh hoạt và nước tiểu của các bà mẹ mang thai

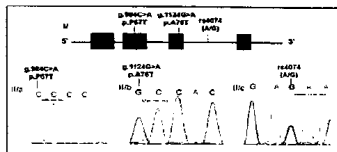
Mẫu	Nồng độ asen trong nước sinh hoạt (µg/L)	Nồng độ asen trong nước tiểu (µg/L)
HT03	276.8	169.71
HT09	225.2	114.71
HT22	120.7	114.12

Về mặt kiểu gen, 2 đột biến được tìm thấy trong đó 1 đột biến xuất hiện ở 2 trong tổng số 3 mẫu nghiên cứu tại exon 4 đột biến thay thế một nucleotide từ G thành A (g.1124G>A) ở vị trí codon 76 chuyển đổi amino

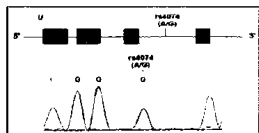
acid từ alanine thành threonine (A76T) (Hình 2 II/b và 3 II/d). Hai mẫu này có nồng độ asen trong nước sinh hoạt cao trên 200 µg/L và cao gấp đôi so với mẫu không có đột biến. Ở mẫu HT09 xuất hiện một đột biến khác ở exon 2, là đột biến thay thế nucleotide thứ 984 trên genome từ C thành A (g.984C>A) ở vị trí codon 67 chuyển đổi amino acid từ proline thành threonine (P67T) (Hình 3 II/b). Cả hai đột biến này đều hoàn toàn mới chưa từng được công bố. Ngoài ra sự sai khác nucleotide A thành G ở vị trí nucleotide thứ 1635, thuộc intron 3 cũng được tìm thấy ở cả ba mẫu HT03, HT09 và HT22. Từ hệ thống dữ liệu dbSNP trên ngân hàng gen, sự sai khác này được xác định là thuộc SNP rs4074 của gen CXCL1. Điểm đa hình này đã được chứng minh là ảnh hưởng đến biểu hiện của gen CXCL1 trong nghiên cứu về đa hình rs4074 và ảnh hưởng của SNP này đến bệnh xơ gan trên các bệnh nhân HCV type 1 (Nischalke, et al. 2012). Trong nghiên cứu này, đa hình tại vị trí SNP rs4074 đều xuất hiện thể đột biến ở cả 3 mẫu nghiên cứu. Vì vậy đa hình này rất có khả năng là chỉ thị xác định phơi nhiễm asen.



Hình 2. Kết quả phân tích đột biến ở mẫu bệnh HT 03. I/ Vị trí các đột biến ở mẫu bệnh HT 03 trên gene CXCL1. II/ Kết quả phân tích trình tự trên máy tính, IIa: Trình tự đột biến exon 3, IIb: Trình tự đa hình ở intron 3.



Hình 3. Kết quả phân tích đột biến ở mẫu bệnh HT 09. I/ Vị trí các đột biến ở mẫu bệnh HT 09 trên gene CXCL1. II/ Kết quả phân tích trình tự trên máy tính, IIa: Trình tự đột biến exon 2, IIb: Trình tự đột biến exon 3, IIc: Trình tự đa hình ở intron 3.



Hình 4. Kết quả phân tích đột biến ở mẫu bệnh HT 22. I/ Vị trí các đột biến ở mẫu bệnh HT 22 trên gene CXCL1. II/ Kết quả phân tích trình tự đa hình ở intron 3.

Một câu hỏi được đặt ra là các đột biến này có thực sự liên quan đến phơi nhiễm asen hay do phơi nhiễm các kim loại nặng khác hoặc do một tác nhân khác gây nên? Với một số lượng mẫu có hạn chưa thể có kết luận gì về vấn đề này, vì vậy nghiên cứu trên một cỡ mẫu lớn và các thí nghiệm về biểu hiện gen được đặt ra cho các nghiên cứu tiếp sau. Mặc dù chưa xác định chính xác cơ chế ảnh hưởng của nó lên cơ chế chuyển hóa As, nhưng sự thay đổi nucleotide này cũng có ảnh hưởng nào đó đến cơ thể. Phơi nhiễm asen hoạt hóa quá trình phiên mã thông qua phản ứng stress ở các loài động vật và cả con người (Liu, et al. 2001), (Wu, et al. 2003). Các phân tích mạng lưới sinh học đã chỉ ra rằng quá trình phiên mã dưới sự ảnh hưởng của asen có thể làm thay đổi một số các quá trình sinh học bao gồm chết theo chương trình (apoptosis), tín hiệu tế bào, phản ứng viêm, đáp ứng stress, và sau cùng là ảnh hưởng đến sức khỏe con người (Fry, et al. 2007). Mặt khác, CXCL1 kích thích sự hoạt hóa của các yếu tố phiên mã, NF-κB, AP-1 thông qua quá trình vận chuyển gốc phosphate Ras-MEKK1-4/6-p38 MAP ở tế bào biểu bì tạo hắc tố (Wang, et al. 2003). CXCL1 khi gắn với thụ thể CXCR2 sẽ tăng cường phiên mã, từ đó làm tăng khả năng miễn dịch của cơ thể. Theo Fry và cộng sự (2007), CXCL1 nằm trong một bộ gồm 11 gen có tiềm năng là biomarker trong xác định phơi nhiễm asen trước sinh. Nhóm nghiên cứu đã phân tích mối liên quan giữa phơi nhiễm asen và biểu hiện của 11 gen này, kết quả cho thấy đó chính xác trong tiên đoán về phơi nhiễm asen trước sinh lên đến 83%. Hi vọng rằng câu hỏi trên sẽ được chúng tôi giải đáp ở các nghiên cứu sâu hơn.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phát hiện được 2 điểm đột biến làm thay đổi axit amin trong đó điểm đột biến g.1124G>A được tìm thấy trên 2 mẫu bệnh có nồng độ asen trong nước sinh hoạt khá cao. Ngoài ra, allele đột biến tại điểm đa hình rs4074 cũng

được tìm thấy ở cả ba mẫu nghiên cứu. Các kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo ở trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm asen trước sinh.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ cho đề tài "Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật tiên tiến để giảm sự biến đổi về nhiễm sắc thể và gen ở trẻ sơ sinh bị phơi nhiễm asen trước sinh" mã số: KC.10.04/11-15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed S, et al. (2011). Arsenic-associated oxidative stress, inflammation, and immune disruption in human placenta and cord blood. *Environ Health Perspect* 119(2):258-64.
- Ferreccio C, et al. (2000). Lung cancer and arsenic concentrations in drinking water in Chile. *Epidemiology* 11(6) 673-9
- Fry R C, et al (2007). Activation of inflammation/NF-kappaB signaling in infants born to arsenic-exposed mothers. *PLoS One* 3(11):e207.
- Hernandez-Castro B, et al. (2009) Effect of arsenic on regulatory T cells. *J Clin Immunol* 29(4):461-70
- Hopenhayn-Rich C, M L Biggs, and A H Smith (1996). Lung and kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water: Cordoba, Argentina. *Int J Epidemiol* 27(4):561-9
- Hopenhayn-Rich C, et al. (2000). Chronic arsenic exposure and risk of infant mortality in two areas of Chile. *Environ Health Perspect* 108(7):667-73.
- Liu J, et al. (2001) Stress-related gene expression in mice treated with inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 61(2):314-20.
- Nischalke HD, et al (2012). The CXCL1 rs4074 A allele is associated with enhanced CXCL1 responses to TLR2 ligands and predisposes to cirrhosis in HCV genotype 1-infected Caucasian patients. *J Hepatol* 56(4):758-64.
- Vahter M, et al (2000). Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating women as well as in umbilical cord blood. *Environ Res* 84(2):186-94.
- Wang D, J Sai, and A Richmond (2003) Cell surface heparan sulfate participates in CXCL1-induced signaling. *Biochemistry* 42(4) 1071-7.
- Wu M M, et al. (2003). Gene expression of inflammatory molecules in circulating lymphocytes from arsenic-exposed human subjects. *Environ Health Perspect* 111(11):1429-38.
- Yih L H, K Peck, and T C Lee (2002). Changes in gene expression profiles of human fibroblasts in response to sodium arsenite treatment. *Carcinogenesis* 23(5):867-76.

MUTATIONS OF CXCL1 GENE IN PRENATAL ARSENIC EXPOSURE INFANTS

Tran Phuong Thao¹, Ta Thi Binh², Nguyen Huy Hoang¹

¹Institute of Genome Research

²National Institute of Occupational and Environmental Health

SUMMARY

Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) is a small cytokine belonging to CXC chemokine family that was previously called GRO1 oncogene, GRO α , KC, Neutrophil-activating protein 3 (NAP-3). The gene for CXCL1 locates on human chromosome 4 and produces malignant tumours. CXCL1 participates in transcription, leads to influence on immune systems. In addition, arsenic exposure is known to activate stress-related transcript in animal models and human subjects. CXCL1 is related to arsenic exposure and is potential biomarker in prenatal arsenic exposure. One missense mutation at nucleotide 1124 in genome, G replaces by C (g.1124G>C) was found by gene sequencing of infant's cord blood samples on two samples have high level of arsenic at more than 200 $\mu\text{g/L}$ arsenic groundwater concentration. At this mutation, alanine is substituted by threonine at codon 76. Besides, the mutation G in SNP rs4074 is detected in all three samples. These results might be proof of effect of arsenic exposure on CXCL1 gene expression.

Keywords: arsenic exposure, CXCL1, mutation, immunity, single nucleotide polymorphism