

MỐI LIÊN QUAN GIỮA TÍNH ĐA HÌNH GEN MÃ HOÁ THỤ THỂ VITAMIN D Apal VỚI BIỂU HIỆN VÀ TIẾN TRIỂN LÂM SÀNG Ở BỆNH NHÂN NHIỄM VIRUS VIÊM GAN B MẠN TÍNH

Nguyễn Khuyến^{1,2}, Lê Văn Nam¹

Đỗ Tuấn Anh¹, Đào Phương Giang³

Nguyễn Bình An³, Lê Hữu Song³, Nghiêm Xuân Hoàn³

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu mối liên quan của các biến thể của thụ thể vitamin D (VDR) với tính cảm nhiễm HBV và tiến triển bệnh ở bệnh nhân (BN) nhiễm HBV mạn tính. Ngoài ra, nghiên cứu này khảo sát mối tương quan giữa các biến thể VDR với nồng độ vitamin D huyết thanh ở BN nhiễm HBV mạn tính. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu bệnh chứng tiến hành trên 298 BN [viêm gan mạn tính, CHB (n = 104); xơ gan, LC (n = 89), ung thư gan, HCC (n = 105)] và 238 người khỏe mạnh (HC). Sử dụng kỹ thuật ARMS-PCR để định kiểu gen của các biến thể VDR. **Kết quả:** Kiểu gen VDR-Aapl rs7975232 TT liên quan có ý nghĩa với quá trình tiến triển của bệnh [HCC vs. CHB: OR = 3,7 (1,1 - 13,5), p = 0,04; CHB vs. HCC = LC: OR = 3,19 (1,03 - 9,88), p = 0,032]. Hai biến thể VDR Apal và FokI có liên quan với nồng độ vitamin D trong huyết thanh ở BN bị nhiễm HBV. **Kết luận:** Sự liên quan có ý nghĩa của biến thể VDR Apal (rs7975232) với biểu hiện và tiến triển lâm sàng ở BN nhiễm virus viêm gan B mạn tính. Ngoài ra, biến thể Apal và FokI có thể là một yếu tố di truyền vật chủ giúp đánh giá sự thiếu hụt nồng độ vitamin D ở BN nhiễm HBV mạn tính.

* Từ khóa: VDR; Thiếu hụt vitamin D; Nhiễm HBV; Bệnh gan mạn tính.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vitamin D đóng vai trò quan trọng trong việc điều phối hệ thống chuyển hóa xương, bên cạnh đó nó còn có ý nghĩa lớn trong việc điều biến cả đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích nghi thông qua VDR. VDR thuộc họ thụ thể nhân của các yếu tố phiên mã. Thụ thể này biểu hiện trên nhiều loại tế bào khác nhau bao gồm các tế bào miễn dịch (tế bào đơn nhân, đại thực bào, tế bào miễn

dịch hình sao, tế bào T và B) và hơn 36 loại nhu mô khác nhau [3]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy thiếu hụt vitamin D là một trong những yếu tố nguy cơ phát sinh ung thư, bệnh tim mạch, bệnh tự miễn và bệnh lý truyền nhiễm bao gồm viêm gan B mạn tính [4] và chức năng của vitamin D thông qua VDR liên quan đến nhiều quá trình sinh bệnh học bao gồm sự tăng sinh, biệt hoá tế bào, vì vậy có liên quan đến quá trình phát sinh ung thư bao gồm HCC.

¹Bộ môn Truyền nhiễm, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

²Bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức

³Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Người phản hồi: Nguyễn Khuyến (nguyengkhuynbvdg@gmail.com)

Ngày nhận bài: 9/6/2020

Ngày bài báo được đăng: 17/7/2020

Nhiễm HBV là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến các biến chứng nguy hiểm đe dọa đến cuộc sống và tính mạng người bị nhiễm bao gồm viêm gan cấp bùng phát, xơ gan và ung thư gan. HBV là virus không gây tổn thương trực tiếp tế bào gan. Nhiều nghiên cứu cho rằng, hậu quả và tiến triển lâm sàng ở BN nhiễm HBV được xác định là do mối tương tác giữa đáp ứng miễn dịch vật chủ và virus [1]. Trong đó, yếu tố di truyền vật chủ có vai trò quan trọng đối với sự tiến triển viêm gan mạn tính, bao gồm các biến thể di truyền của gen mã hoá VDR [1, 2].

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về biến thể VDR ở BN nhiễm HBV còn chưa thống nhất. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm:

- Khảo sát mối liên quan giữa tính đa hình gen mã hoá VDR và biểu hiện lâm sàng ở BN nhiễm virus viêm gan B mạn tính.
- Đánh giá mối liên quan của tính đa hình VDR và sự thiếu hụt vitamin D ở BN nhiễm HBV bao gồm CHB, LC và HCC.

ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng nghiên cứu

298 BN nhiễm HBV được phân thành 3 nhóm: CHB (n = 104), LC (n = 89), HCC

(n = 105). Ngoài ra, 238 người khỏe mạnh được đưa vào nghiên cứu làm nhóm chứng.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu bệnh-chứng.
- Thời gian và địa điểm: Tiến hành tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 10/2013 - 10/2018.
- Kỹ thuật ARMS-PCR được sử dụng để xác định kiểu gen của các biến thể VDR. Kết quả của phương pháp ARMS được kiểm tra bởi phương pháp sequencing. Nồng độ Vitamin D toàn bộ huyết thanh được định lượng bằng phương pháp ELISA.

3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm R. χ^2 -test để so sánh tỷ lệ giữa các nhóm. Kruskal-Wallis test và Mann-Whitney-Wilcoxon test được sử dụng để so sánh giữa các nhóm cho các biến liên tục. Phân tích hồi quy đơn biến và logistic điều chỉnh cho tuổi và giới được áp dụng để so sánh tần suất kiểu gen giữa các nhóm nghiên cứu. Tất cả các so sánh có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm chung tuổi và giới của các đối tượng nghiên cứu

Bảng 1: Phân bố đối tượng theo giới tính.

Nhóm nghiên cứu	Giới tính		
	Nam (n, %)	Nữ (n, %)	Tổng
Người khỏe mạnh	160 (67,2)	78 (32,8)	238 (100)
Nhiễm HBV	272 (91,3)	26 (8,7)	298 (100)
Tổng	423 (80,6)	104 (19,4)	536 (100)

Phần lớn đối tượng nghiên cứu là nam giới (80,6%). Tỷ lệ nam giới trong nhóm BN mắc viêm gan B là 91,3% và ở nhóm người khỏe mạnh là 67,2%.

Bảng 2: Phân bố đối tượng theo nhóm tuổi.

Nhóm tuổi	Người khỏe mạnh n (%)	BN viêm gan B n (%)
< 30	186 (78,1)	27 (9,1)
30 - 40	9 (3,8)	47 (15,8)
40 - 50	24 (10,1)	68 (22,8)
50 - 60	15 (6,3)	85 (28,5)
> 60	4 (1,7)	71 (23,8)
Tổng	238 (100,0)	298 (100,0)

Tuổi của BN mắc viêm gan B từ 19 - 85 tuổi. Đa số BN mắc viêm gan B có độ tuổi từ 40 - 60 (51,4%). Ở nhóm người khỏe mạnh, do được lấy từ nhóm người hiến máu tình nguyện nên độ tuổi của nhóm này trẻ hơn nhiều so với nhóm BN HBV và chủ yếu ở nhóm tuổi < 30 (78%).

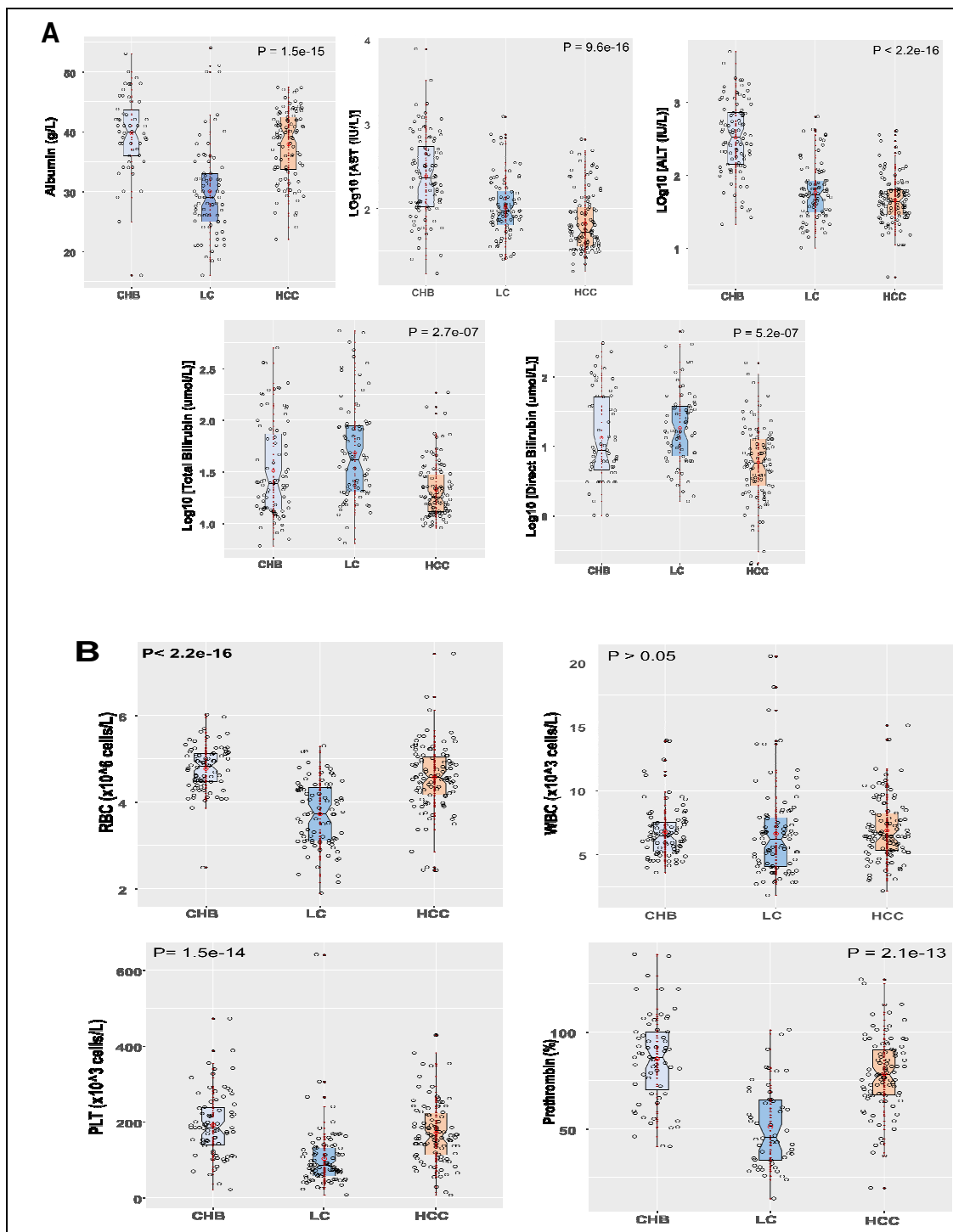
2. Đặc điểm cận lâm sàng của các đối tượng nghiên cứu

Bảng 3: Đặc điểm chung về cận lâm sàng của nhóm người khỏe mạnh và nhóm BN viêm gan B.

Chỉ số cận lâm sàng	Người khỏe mạnh	BN viêm gan B	p
Bạch cầu (G/l)	6,99 (3,9 - 13,3)	6,42 (1,81 - 20,5)	0,0022
Hồng cầu (T/l)	4,8 (3,9 - 6,7)	4,47 (1,9 - 7,4)	0,0001
Tiểu cầu (G/l)	260 (2,9 - 422)	144,5 (6,7 - 641)	0,0001
AST (U/l)	21 (10 - 59)	98 (17 - 7.700)	0,0001
ALT (U/l)	18 (4 - 113)	64 (4 - 4.908)	0,0001
Bilirubin toàn phần (μmol/l)	22 (9 - 230)	22,7 (6 - 733)	0,0001
Bilirubin trực tiếp (μmol/l)	2,2 (1,8 - 21)	8,8 (0 - 449,1)	0,0475
Albumin (g/l)	43,9 (11,8 - 47)	36 (16 - 54)	0,0001
Prothobin (%)		75,85 (14,1 - 140)	
HBV-DNA (copies/ml)		4,5e5 (212 - 1,1e10)	
AFP (UI/ml)	1,6 (0,6 - 8,9)	18,4 (0,9 - 400)	0,0001

Bệnh nhân viêm gan B có chỉ số hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu thấp hơn của người khỏe mạnh, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), nhưng chỉ số hoá sinh cao hơn so với người khỏe mạnh.

* Một số đặc điểm về cận lâm sàng của nhóm BN viêm gan B:



Hình 1: Đặc điểm về chỉ số sinh hóa (A) và huyết học (B) ở BN viêm gan B.

(A) Nồng độ men gan AST và ALT ở nhóm viêm gan B mạn tính cao hơn có ý nghĩa so với nhóm xơ gan và ung thư gan. Ở nhóm xơ gan, nồng độ albumin huyết thanh thấp so với 2 nhóm viêm gan B mạn tính và ung thư gan. Trong khi đó, nồng độ bilirubin thấp hơn có ý nghĩa ở nhóm ung thư gan so với 2 nhóm còn lại. (B) Ở nhóm BN xơ gan có chỉ số hồng cầu thấp hơn 2 nhóm BN viêm gan B mạn tính và ung thư gan. Chỉ số tiểu cầu ở nhóm BN viêm gan B có 258 quan sát, trong đó, nhóm BN xơ gan có chỉ số tiểu cầu thấp hơn so với nhóm BN viêm gan B mạn tính và ung thư gan, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,0001$). Không có sự khác biệt về chỉ số bạch cầu giữa các phân nhóm BN HBV ($p > 0,05$). Chỉ số hồng cầu và tiểu cầu thấp hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm xơ gan so với 2 nhóm còn lại ($p < 0,0001$).

3. Mối liên quan giữa SNP Apal và tiến triển bệnh ở BN viêm gan B mạn tính

Bảng 4: So sánh tần suất genotype và alen giữa nhóm người khỏe mạnh và HCC.

Phân nhóm	HCC		Người khỏe mạnh		OR (95%CI)	p
	n	%	n	%		
Đồng trội						
GG	39	47,7	114	48,7	1	
TG	36	41,4	106	45,3	1,0 (0,6 - 1,7)	0,978*
TT	12	13,9	14	6,0	2,5 (1,1 - 5,9)	0,035*
					3,17 (1,05 - 9,94)	0,042 [#]
Kiểu alen						
G	114	65,5	334	71,4	1	0,152
T	60	34,5	134	28,6	1,3 (0,9 - 1,9)	
Mô hình lặn						
GG + TG	75	86,2	220	94,0	1	
TT	12	13,8	14	6,0	2,76 (1,2 - 6,1)	0,013*
					3,5 (1,14 - 10,9)	0,024 [#]
Mô hình trội						
GG	39	44,8	114	48,7	1	
TG + TT	48	55,2	120	51,3	1,2 (0,7 - 1,9)	0,44

(*: Kiểm định χ^2 ; #: Phân tích hồi quy logistic đa biến)

Bảng 5: So sánh tần suất genotype và alen giữa nhóm viêm gan B mạn tính và ung thư gan.

Phân nhóm	HCC		CHB		OR (95%CI)	p
	n	%	n	%		
Kiểu gen						
GG	39	44,8	45	44,1	1	
TG	36	41,4	52	51,0	0,8 (0,4 - 1,5)	0,466*
TT	12	13,8	5	4,9	2,8 (0,9 - 8,6)	0,077*
Kiểu alen						
G	114	65,5	142	69,6	1	
T	60	34,5	62	30,4	1,2 (0,8 - 1,9)	0,397
Mô hình lặn						
GG + TG	75	86,2	97	95,1	1	
TT	12	13,8	5	4,9	3,1 (1,1 - 9,2)	0,033*
					4,3 (1,2 - 15)	0,017 [#]
Mô hình trội						
GG	39	44,8	45	44,1	1	
TG + TT	48	55,2	57	55,9	1 (0,5 - 1,7)	0,922 ^{\$}

(*: Kiểm định χ^2 ; #: Phân tích hồi quy logistic đa biến)

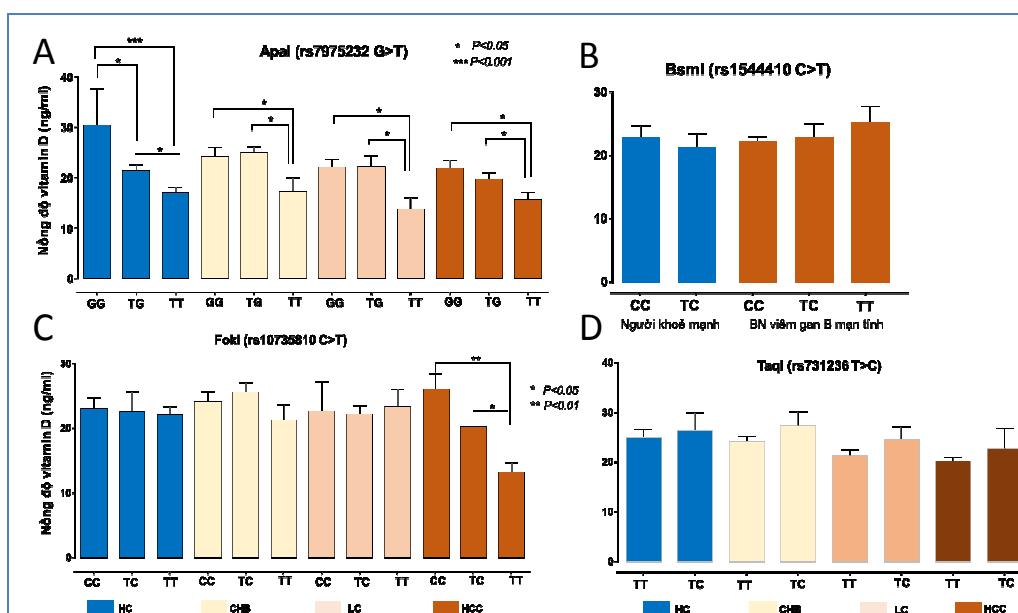
Bảng 6: Tần suất genotype và alen giữa nhóm CHB và nhóm bệnh gan giai đoạn cuối (HCC + LC).

Phân nhóm	CHB (n = 87)		LC + HCC (n = 183)		OR (95%CI)	p*
	n	%	n	%		
Kiểu gen						
GG	45	44,1	80	47,6	1	
TG	52	51,0	68	40,5	0,7 (0,4 - 1,2)	0,241
TT	5	4,9	20	11,9	2,3 (0,8 - 6,4)	0,129
Kiểu alen						
G	142	69,6	228	67,9	1	
T	62	30,4	108	32,1	1,1 (0,7 - 1,6)	0,67

Mô hình lặn						
GG + TG	97	95,1	148	88,1	1	
TT	5	4,9	20	11,9	2,62 (0,95 - 7,22)	0,054 ^{*, \$}
					3,19 (1,03 - 9,88)	0,032 [#]
Mô hình trội						
GG	45	44,12	79	47,02	1	
TG + TT	57	55,88	89	52,98	0,89 (0,54 - 1,46)	0,642

(*: Kiểm định χ^2 ; \$: Phân tích đơn biến; #: Phân tích hồi quy logistic đa biến)

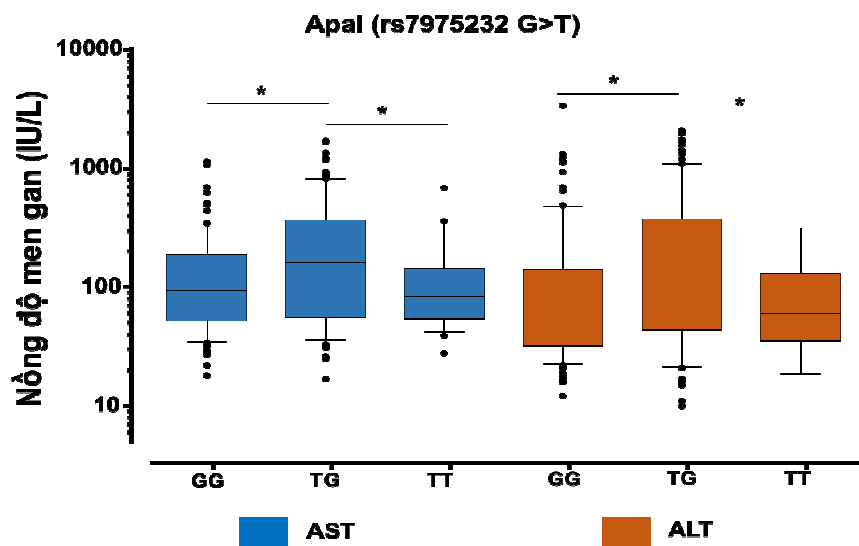
4. Mối tương quan giữa các biến thể VDR và nồng độ vitamin D ở BN viêm gan B và người khỏe mạnh



Hình 2: Sự phân bố nồng độ vitamin D và genotype của các biến thể VDR ở BN viêm gan B và người khỏe mạnh.

Biến thể VDR Apal (rs7975232) (hình A): Nồng độ vitamin D ở người mang genotype TT thấp hơn có ý nghĩa so với người mang genotype GG hay TG ở tất cả các nhóm nghiên cứu bao gồm HC, CHB, LC và HCC. Biến thể VDR FokI (rs10735810) (hình C): Nồng độ vitamin D ở người mang genotype TT thấp hơn có ý nghĩa so với người mang genotype CC và TC ở nhóm HCC. Không có sự khác biệt đối với các nhóm nghiên cứu khác, không có sự khác biệt về nồng độ vitamin D giữa các genotype ở các nhóm BN viêm gan B hoặc người khỏe mạnh ở 2 biến thể còn lại BsmI (rs1544410) và TaqI (rs731236) (hình B, D).

5. Mối tương quan giữa biến thể VDR Apal và các thông số cận lâm sàng.



Hình 3: Mối tương quan giữa kiểu gen Apal với các chỉ số cận lâm sàng.

Biến thể VDR Apal (rs7975232): Nồng độ men gan tăng hơn có ý nghĩa ở BN mang genotype TG so với genotype GG và TT.

BÀN LUẬN

Vitamin D được coi là một loại hormone đóng vai trò quan trọng không chỉ trong cơ chế trao đổi calcium và cơ chế điều hòa cân bằng chuyển hóa hệ thống xương mà còn có nhiều ảnh hưởng trong sự điều hòa của hệ miễn dịch trong cơ thể [3]. Vai trò sinh lý của vitamin D trong cơ thể được biểu hiện thông qua VDR. VDR đóng vai trò rất quan trọng trong nhiều bệnh lý truyền nhiễm, tự miễn, ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu mối liên quan giữa biến thể di truyền của thụ thể vitamin D và bệnh cảnh lâm sàng ở BN viêm gan B mạn tính. Hơn nữa, chúng tôi khảo sát mối liên quan giữa các biến thể VDR và sự thiếu hụt vitamin D trong mối liên quan đến tiến triển lâm sàng ở BN viêm gan B mạn tính.

Gen mã hoá thụ thể VDR nằm trên nhiễm sắc thể số 12 và bao gồm 11 exon. Exon 1A, 1B và 1C tạo nên vùng 5' không mã hoá. 8 exon (exon 2 - 9) mã hoá các thành phần cấu trúc của VDR. Biến thể TaqI nằm tại vùng exon 9, trong khi 2 biến thể Apal và BsmI nằm tại vị trí intron 8. Tính đa hình ở 3 vị trí này không ảnh hưởng đến chức năng tổng hợp và biểu hiện protein của gen VDR. Chỉ có biến thể FokI nằm tại vị trí exon 2 đầu cuối 5' được cho là có ảnh hưởng đến sự thay đổi cấu trúc và hoạt động phiên mã của VDR. Hoạt động phiên mã của VDR ở người mang alen T (biến thể: FokI rs10735810) thấp hơn so với dạng không mang alen đột biến (alen C) [5]. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy rằng, nồng độ vitamin D ở BN ung thư genotype FokI rs10735810 TT thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm BN ung thư gan mang genotype CC và CT.

Các nghiên cứu về mối tương quan giữa các biến thể VDR trên và nguy cơ nhiễm HBV cho kết quả không thống nhất [6, 7]. Gần đây, một phân tích tổng hợp phân tích 15 nghiên cứu về mối tương quan giữa các biến thể di truyền VDR đối với tính cảm nhiễm HBV và bệnh cảnh lâm sàng ở BN nhiễm HBV trên các quần thể khác nhau [7]. Trong nghiên cứu này, 4.218 BN nhiễm HBV và 2.298 người khỏe mạnh được phân tích cho thấy genotype FokI rs10735810 CC và allele C được cho là yếu tố nguy cơ đối với nhiễm HBV [OR = 1,54 (1,2 - 2,0), $p < 0,01$ và OR = 1,23 (1,04 - 1,45), $p = 0,02$]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, biến thể Apal (rs7975232) là biến thể duy nhất liên quan có ý nghĩa đến tính cảm nhiễm HBV và quá trình tiến triển bệnh cảnh lâm sàng ở BN viêm gan B mạn tính.

Đối với biến thể Apal, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, người mang genotype TT liên quan có ý nghĩa đến nguy cơ tiến triển ung thư gan ở BN viêm gan B mạn tính. Nghiên cứu của Li và CS [8] cho thấy có mối liên quan ý nghĩa của biến thể này đối với quá trình tiến triển xơ gan ở BN nhiễm HBV mạn tính. Suneetha và CS [9] cho thấy vai trò của biến thể Apal ở BN nhiễm HBV. Trong nghiên cứu này, VDR-Apal rs7975232 TT được cho là một yếu tố liên quan ý nghĩa đến tải lượng HBV DNA cao hơn có ý nghĩa so với các kiểu gen khác của Apal. Nghiên cứu trước đây của chúng tôi có mối tương quan nghịch đảo của nồng độ vitamin D với tải lượng HBV DNA ở BN nhiễm HBV mạn tính [4]. Điều này phù hợp với kết quả trong nghiên cứu vì người mang

VDR-Apal rs7975232TT có nồng độ vitamin D trong huyết thanh thấp hơn so với người mang kiểu gen VDR-Apal rs7975232GT và GG trong tất cả các nhóm BN bao gồm CHB, LC và HCC.

Liên quan đến quá trình tiến triển bệnh lý viêm gan B mạn tính, nhiều nghiên cứu cho thấy vitamin D liên quan đến ức chế quá trình viêm và tiến triển xơ gan. Những bằng chứng này đã được chứng minh trên chuột bị knockout các thụ cảm thể VDR. Những nghiên cứu khác cũng chứng minh sự thiếu hụt vitamin D là nguyên nhân của tình trạng tiến triển xơ hóa gan trên BN viêm gan thoái hóa mỡ không do rượu và BN nhiễm HBV [4], mặc dù các biến thể của VDR đóng vai trò đối với tính cảm nhiễm HBV và tiến triển bệnh vẫn còn chưa rõ ràng.

KẾT LUẬN

Chúng tôi báo cáo lần đầu tiên trên đối tượng BN tại Việt Nam về vai trò của các biến thể VDR đối với tính cảm nhiễm HBV và tiến triển bệnh ở BN viêm gan B mạn tính. VDR Apal là biến thể có liên quan ý nghĩa đến tính cảm nhiễm HBV, tiến triển của bệnh và mối liên quan có ý nghĩa của biến thể này đối với nồng độ vitamin D huyết thanh ở BN nhiễm HBV mạn tính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zeng Z. Human genes involved in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 7696-7706.
2. Karatayli SC, Ulger ZE, Ergul AA, et al. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with chronic hepatitis delta. *J Viral Hepat* 2014; 21:297-304.

3. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: Its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001; 15:2579-2585.
4. Hoan NX, Khuyen N, Binh MT, et al. Association of vitamin D deficiency with hepatitis B virus - related liver diseases. *BMC Infect Dis* 2016; 16:507.
5. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 177:145-159.
6. Zhu Q, Li N, Han Q, et al. Single-nucleotide polymorphism at CYP27B1-1260, but not VDR Taq I, is possibly associated with persistent hepatitis B virus infection. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16:1115-1121.
7. He Q, Huang Y, Zhang L, Yan Y, Liu J, Song X, Chen W. Association between vitamin D receptor polymorphisms and hepatitis B virus infection susceptibility: A meta-analysis study. *Gene* 2018; 645:105-112.
8. Li J Dong, PH Jin, YH Lu, MQ Pan, FF Wang, BS Chen, YP. The relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and liver fibrosis. *Zhejiang Med J* 2006; 28:426-434.
9. Suneetha PV, Sarin SK, Goyal A, Kumar GT, Shukla DK, Hissar S. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J Hepatol* 2006; 44:856-863.