

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ẢNH HƯỞNG
CỦA (-) EPIGALLOCATECHIN (EGC)
TRÊN CÁC DÒNG TẾ BÀO MANG TỔ HỢP GEN ETV6-NTRK3**

Bùi Thị Kim Lý⁽¹⁾, Trần Thị Yến Nhi⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 28/02/2022; Ngày phản biện 29/02/2022; Chấp nhận đăng 30/3/2022

Liên hệ Email: lybtk@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2022.02.298>

Tóm tắt

(-) - Epigallocatechin (EGC) là một trong những hợp chất trong nhóm catechin đóng vai trò quan trọng trong việc tạo nên hoạt tính sinh học của trà. Tuy đã có nhiều nghiên cứu trước đây báo cáo về tác dụng gây độc tế bào của EGC đối với một số loại ung thư cũng như đã làm rõ cơ chế tác động của nó; thế nhưng EGCG, một loại catechin khác mới là đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất, do đó vẫn rất cần những nghiên cứu thực hiện trên hợp chất EGC để cung cấp thêm nhiều bằng chứng khoa học hơn cho hợp chất này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện khảo sát tác động kháng tăng sinh tế bào ung thư bạch cầu cấp tính dòng tủy (AML) có chứa gen dung hợp ETV6-NTRK3. Kết quả cho thấy EGC có tác dụng ức chế sự tăng sinh trên các dòng tế bào khảo sát với giá trị IC₅₀ là 11,39 ± 0,99 μM đối với Ba/F3-AML; 14,42 ± 0,95 μM cho Ba/F3-CFS; 21,49 ± 0,98 μM cho MO-91 và 20,90 ± 1,52 μM cho IMS-M2.

Từ khóa: hợp chất, tác động, tăng sinh, tế bào

Abstract

A STUDY FOR DETERMINING THE EFFECT OF (-)-EPIGALLOCATECHIN (EGC) ON CELL LINES HARBORING THE ETV6-NTRK3 FUSION GENE

(-) - Epigallocatechin (EGC) is one of the catechin compounds that contributes significantly to tea's biological activity. Although many previous studies have reported the cytotoxic effects of EGC on some types of cancer as well as elucidating its mechanism of action; however, EGCG, another type of catechin, is the most studied subject, so more research on EGC compounds is still required to provide more scientific evidence for this compound. We investigated the antiproliferative effect of acute myeloid leukemia (AML) cells containing the ETV6-NTRK3 fusion gene in this study. EGC had a proliferation inhibitory effect on the survey cell lines, with an IC₅₀ value of 11,39 ± 0,99 μM for Ba/F3-AML, 14,42 ± 0,95 μM for Ba/F3-CFS, 21,49 ± 0,98 μM for MO-91, and 20,90 ± 1,52 μM for IMS-M2.

1. Đặt vấn đề

Ung thư là một trong những căn bệnh nguy hiểm đối với con người, có tác động xấu đến kinh tế và ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe con người. Bệnh ung thư là nguyên nhân gây tử vong cho hơn 10 triệu người trên toàn thế giới vào năm 2020, và số ca mắc bệnh dự kiến sẽ tăng gấp 3 lần vào năm 2040 (Sung và nnk., 2021). Bệnh bạch cầu là một trong 20 loại bệnh ung thư phổ biến nhất và nó có thể ảnh hưởng đến bất kỳ ai, bất kể tuổi tác hay giới tính (Li và nnk., 2017). Mặc dù thực tế hiện nay đã có nhiều phương pháp điều trị được đề xuất và đưa vào chữa trị nhưng các tác dụng phụ của việc sử dụng thuốc vẫn là một vấn đề rất đáng lo ngại. Do đó, nhiều phương pháp điều trị mới vẫn đang được tiếp tục nghiên cứu. Trong đó, liệu pháp sử dụng thuốc nhắm mục tiêu và liệu pháp miễn dịch đã được chú ý sử dụng trong điều trị ung thư, kể cả bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (AML) (Döhner và nnk., 2021; Pelster và nnk., 2019). Tel-TrkC thường gọi là ETV6-NTRK3 (viết tắt là EN) (A. Church và nnk., 2018; A. J. Church và nnk., 2018; De Braekeleer và nnk., 2012) là một tổ hợp gen được hình thành bởi sự dung hợp của vùng gen ETV6 (từ exon 1 đến exon 4 hoặc 5) với vùng NTRK3 (từ exon 13 đến exon 20), tổ hợp gen này được tìm thấy ở nhiều ca bệnh AML. Chính sự tổ hợp này làm cho protein dung hợp có khả năng tự hoạt hóa khi không có tín hiệu neurotrophin 3 ngoại bào (Amatu và nnk., 2016; Chi và nnk., 2012). Protein dung hợp Tel-TrkC được xác định là mục tiêu điều trị trong bệnh ung thư (Chi và nnk., 2012; Shukla và nnk., 2017). Do đó, mục đích của nghiên cứu này là xem xét tác động gây độc tế bào của EGC trên các dòng tế bào ung thư AML khác nhau chứa gen dung hợp EN.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. (-)-epigallocatechin (EGC)

Dung dịch EGC được chuẩn bị như mô tả trong báo cáo trước (Ly và nnk., 2013)

2.2. Tế bào

Hai dòng tế bào AML có chứa tổ hợp gen EN được sử dụng để đánh giá là IMS-M2 và MO-91. Dòng tế bào IMS-M2 được thu nhận từ một bệnh nhân AML 59 tuổi với nhiễm sắc thể bất thường số 48, XX, thêm (6) (q27), + 8, der (12) t (12; 15) (p13; q25) inv (12) (p13; q15), der (15) t (12; 15) (p13; q25), + der (15) t (12; 15) (p13; q25) và có hiện diện tổ hợp gen ETV6 – NTRK3 (M. Eguchi và nnk., 1999); Dòng MO-91 được phân lập từ bệnh nhân nam với t (12; 15) (p13; q25) có chứa gen dung hợp ETV6 – NTRK3 (Eguchi và nnk., 2001; Gu và nnk., 2007). Ngoài ra nghiên cứu còn sử dụng hai dòng tế bào chuột Ba/F3 có chuyển nạp ổn định tổ hợp gen EN. Trong đó, dòng Ba/F3-CFS được tạo ra bằng cách chuyển biến thể của “CFS” ETV6 – NTRK3 trong u xơ bẩm sinh và dòng Ba/F3-AML được tạo ra bằng cách chuyển biến thể hiếm gặp “L” của ETV6 – NTRK3 trong AML (Mariko Eguchi và nnk., 2005).

2.3. Cell culture conditions

Các dòng tế bào được nuôi cấy trong môi trường Roswell Park Memorial Institute

1640 (RPMI 1640, Sigma-Aldrich) có bổ sung 10% huyết thanh nhau thai bò (Thermofisher Scientific), 100IU/mL penicilin và 0,1mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich) sau đó ủ trong tủ ẩm 5% CO₂ ở 37°C.

2.4. Thử nghiệm đánh giá độc tính tế bào

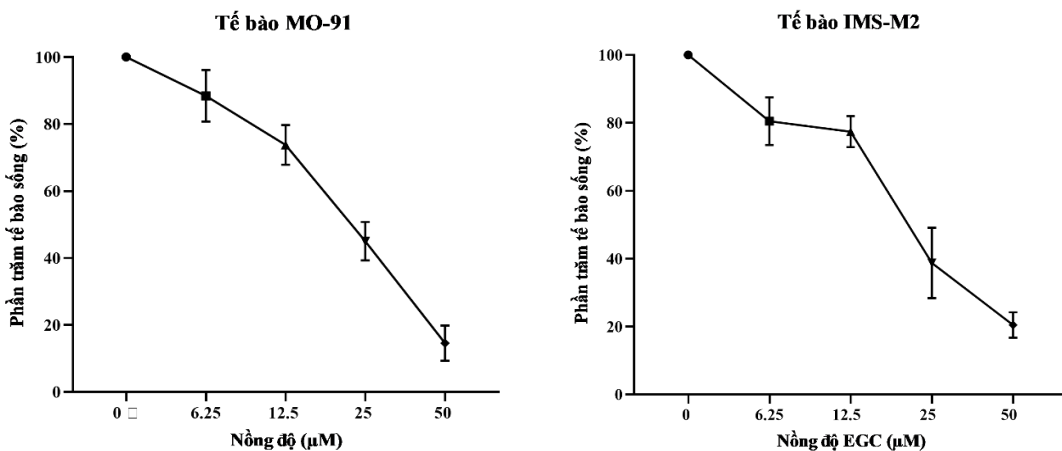
Tế bào huyền phù được phân phối vào trong các đĩa 6 giếng ở mật độ 105 tế bào/mL có hoặc không có sự hiện diện của EGC ở nồng độ từ 6,25μM đến 50μM. Sau 3 ngày xử lý, phương pháp nhuộm trypan blue được sử dụng để đánh giá tác động của EGC lên sự tăng sinh của tế bào (Chi và nnk., 2012).

2.5. Phương pháp phân tích số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện ít nhất ba lần và được phân tích bằng phần mềm Graphpad prism phiên bản 9.0.0. Phân tích hồi quy phi tuyến được thực hiện để xác định nồng độ EGC mà tại đó ức chế 50% quần thể tế bào (IC₅₀). Sự khác biệt đáng kể được xác định bằng giá trị p là 0,05. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± sai số chuẩn của giá trị trung bình.

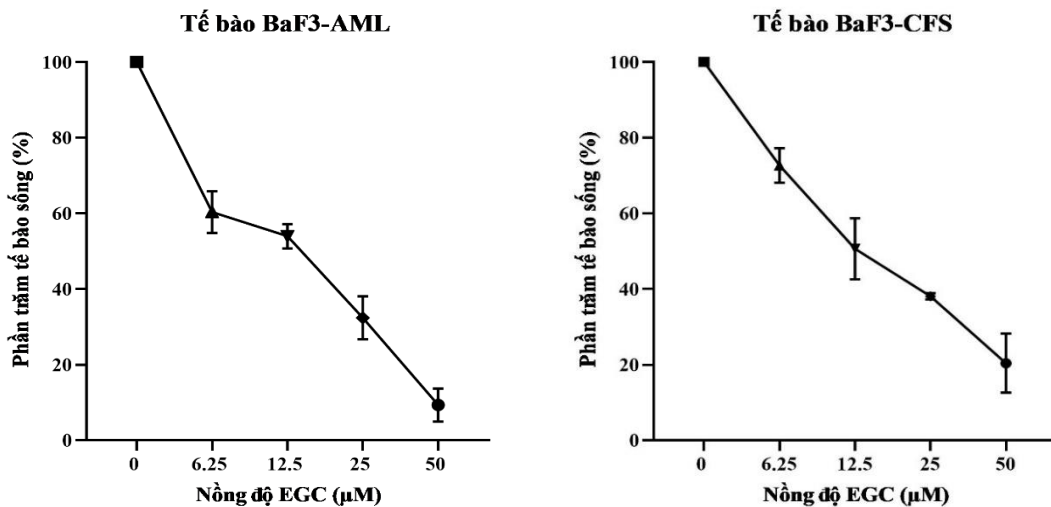
3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Mục đích của thí nghiệm là khảo sát tác động của EGC lên sự tăng trưởng của các dòng tế bào AML có chứa tổ hợp gen EN. Theo đó, tế bào MO-91 và IMS-M2 được nuôi có bổ sung EGC ở nhiều nồng độ khác nhau. Khả năng sống sót của tế bào sau thời gian xử lý được tính toán dựa vào tỷ lệ phần trăm tế bào sống sót giữa nhóm được xử lý và nhóm không được xử lý. Kết quả thí nghiệm cho thấy tỷ lệ tế bào sống giảm dần khi nồng độ EGC tăng dần (hình 1). Sự ức chế tăng trưởng tế bào bạch cầu do EGC gây ra có thể phụ thuộc vào liều lượng. Quan sát biểu đồ có thể nhận thấy tác động của EGC được thể hiện tương tự nhau đối với cả hai dòng tế bào IMS-M2 và MO-91. Kết quả phân tích hồi quy phi tuyến cho thấy giá trị IC₅₀ của EGC là 21,49 ± 0,98μM đối với dòng tế bào MO-91 và 20,90 ± 1,52μM đối với dòng tế bào IMS-M2.



Hình 1. Tác động của EGC đến sự sinh trưởng của tế bào MO-91 và IMS-M2

Như đã đề cập ở trên các dòng tế bào AML được dùng trong thử nghiệm là được phân lập từ bệnh nhân có tổ hợp gen EN và có một số bất thường nhiễm sắc thể khác (Chi và nnk., 2010; Eguchi và nnk., 1999; Okabe và nnk., 1995). Bên cạnh đó thí nghiệm cũng sử dụng các dòng tế bào chuột có chuyển gen EN. Hai dòng tế bào Ba/F3-AML và Ba/F3-CFS sinh trưởng ổn định nhờ vào tín hiệu hoạt hóa của protein dung hợp Tel-TrkC (Mariko Eguchi và nnk., 2005). Thử nghiệm gây độc tế bào Ba/F3-AML và Ba/F3-CFS được thực hiện theo cách tương tự như thử nghiệm gây độc tế bào cho các dòng MO-91 và IMS-M2. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong hình 2. Tác động gây chết của EGC trên Ba/F3-AML và Ba/F3-CFS được xác định phụ thuộc vào liều lượng. Các tác động ức chế của EGC trên tế bào Ba/F3-AML có xu hướng hiệu quả hơn các tác động của tế bào Ba/F3-CFS dựa trên biểu đồ. IC50 được xác định ở $11,39 \pm 0,99\mu\text{M}$ đối với Ba/F3-AML và $14,42 \pm 0,95\mu\text{M}$ đối với Ba/F3-CFS.



Hình 2. Tác động của EGC đến sự sinh trưởng của tế bào Ba/F3-AML và Ba/F3-CFS

Các giá trị IC50 của EGC trên các dòng tế bào EN được tóm tắt trong Bảng 1. Phân tích phương sai một chiều (ANOVA) được thực hiện để kiểm tra xem có sự khác biệt đáng kể nào giữa các giá trị IC50 của EGC trên bốn dòng tế bào được thử nghiệm hay không. Kết quả cho thấy có ít nhất hai nhóm khác nhau có ý nghĩa thống kê với giá trị p nhỏ hơn $0,001 < \alpha = 0,05$. Thử nghiệm Turkey đã xác nhận rằng EGC gây ra ảnh hưởng lớn nhất đến các tế bào Ba/F3-CFS và thấp nhất trên các tế bào Ba/F3 -AML và không có sự khác biệt thống kê nào được ghi nhận giữa tác động của EGC trên dòng tế bào MO-91 và IMS -M2.

Bảng 1. Giá trị IC50 của EGC trên các dòng tế bào thử nghiệm

Tên dòng tế bào	Giá trị IC50 (µM)
MO-91	21.49 ± 0.98
IMS-M2	20.90 ± 1.52
BaF3-AML	11.39 ± 0.99
BaF3-CFS	14.42 ± 0.95

EGC là một trong bốn loại catechin có hàm lượng nhiều nhất trong trà, và EGC được chứng minh là thúc đẩy quá trình chết theo chu trình của tế bào ung thư, sự hình thành mạch, phát triển khối u và ức chế di căn (Cheng và nnk., 2017; Cheng và nnk., 2020). Kết quả IC₅₀ của EGC trên tế bào AML nằm trong khoảng từ 11,39 μ M đến 21,49 μ M sau 72 giờ xử lý, đây là kết quả rất đáng chú ý đặc biệt khi so sánh với thuốc hiện đang sử dụng điều trị trong lâm sàng OTX015 có giá trị IC₅₀ lần lượt là 13,06 μ M và 11,34 μ M cho tế bào HL-60 và K562 (Coudé và nnk., 2015). Các báo cáo trước đã phát hiện ra rằng các catechin trong trà tương tác với nhiều loại thụ thể tyrosine kinase khiến các con đường dẫn truyền tín hiệu liên quan đến tăng trưởng trong tế bào bị gián đoạn (Larsen và nnk., 2010). Nghiên cứu trước đây của nhóm chúng tôi cũng đã chỉ ra rằng EGC ức chế sự sinh trưởng của các dòng tế bào AML bằng cách gây ra quá trình chết theo chu trình bằng con đường ngăn chặn sự biểu hiện của protein FLT3 thông qua Hsp90, kết quả dẫn đến sự ức chế các con đường tín hiệu bên dưới như con đường PI3K/AKT, con đường STAT5 và con đường Ras/MAPK (Cauchy và nnk., 2015; Ly và nnk., 2013). Hsp90 đã được xác định là chất cộng tác đi kèm với protein ETV6/FLT3 được phiên mã từ tổ hợp gen ETV6/FLT3, được tìm thấy trong các khối u ác tính huyết học (Ly và nnk., 2018). Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi cũng dự đoán rằng protein tổ hợp Tel / Trk sẽ bị tác động bởi EGC.

Trong thí nghiệm này, các tế bào được chia thành hai nhóm: nhóm A bao gồm hai dòng tế bào thu được từ bệnh nhân AML và nhóm B bao gồm hai dòng tế bào B chuột chuyển gen được mô tả ở trên. Khả năng gây chết của EGC trên cả hai dòng tế bào AML mang gen dung hợp EN được chứng minh bằng biểu hiện ức chế tương đồng trên MO-91 và IMS-M2. Ở nhóm A, có nhiều bất thường về nhiễm sắc thể ở cả hai dòng tế bào (Chi và nnk., 2010; Eguchi và nnk., 2001; Eguchi và nnk., 1999). Do đó, nó cản trở việc dự đoán mục tiêu tác động của EGC đối với quá trình ức chế tăng sinh tế bào. Trong nhóm B, ảnh hưởng của EGC trên dòng tế bào Ba/F3-CSF thấp hơn theo thống kê so với dòng tế bào Ba/F3-AML và so với cả hai dòng tế bào trong nhóm A. Do cùng một tế bào chủ, có thể suy đoán rằng sự khác biệt về hiệu quả của EGC trong nhóm B là do gen dung hợp được chuyển nạp. Khi so sánh kiểu hình và sinh lý của chuột chuyển gen CFS và L biến thể EN, người ta thấy rằng gen chuyển kiểu CFS có hại hơn, dẫn đến không có con. Trong khi đó, các phôi được biến nạp từ biến thể L hình thành mạng lưới mạch máu bình thường, và con cái phát triển khỏe mạnh và không có các triệu chứng ung thư trong tối đa 17 tháng (Mariko Eguchi và nnk., 2005). Hơn nữa, sự hiện diện của ETV6 exon 5 trong gen tổ hợp và sự chèn 14 axit amin trong miền kinase xúc tác của trkC chỉ được tìm thấy trong biến thể CFS mà không có trong biến thể L (De Braekeleer và nnk., 2012; Eguchi và nnk., 1999). Vùng exon 5 của Tel được phát hiện để điều hòa hoạt tính gắn vào DNA của vùng domain nội bào (Green và nnk., 2010). Có thể sự hiện diện của exon 5 trong biến thể CFS sẽ hoạt động như một mục tiêu ức chế. Tuy nhiên cần có thêm nhiều nghiên cứu để xác định xem mục tiêu của EGC có tác động lên protein EN hay không và nếu có thì cơ chế cụ thể như thế nào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Amatu, A., Sartore-Bianchi, A., & Siena, S. (2016). NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open*, 1(2), e000023. doi: 10.1136/esmoopen-2015-000023
- [2] Cauchy, P., James, Sally R., Zacarias-Cabeza, J., Ptasinska, A., Imperato, Maria R., Assi, Salam A., . . . Cockerill, Peter N. (2015). Chronic FLT3-ITD Signaling in Acute Myeloid Leukemia Is Connected to a Specific Chromatin Signature. *Cell Reports*, 12(5), 821-836. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.069>
- [3] Cheng, M., Zhang, X., Guo, X.-J., Wu, Z.-F., & Weng, P.-F. (2017). The interaction effect and mechanism between tea polyphenols and intestinal microbiota: Role in human health. *Journal of Food Biochemistry*, 41(6), e12415. doi: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12415>
- [4] Cheng, Z., Zhang, Z., Han, Y., Wang, J., Wang, Y., Chen, X., . . . Wu, Z. (2020). A review on anti-cancer effect of green tea catechins. *Journal of Functional Foods*, 74, 104172. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104172>
- [5] Chi, H. T., Ly, B. T., Kano, Y., Tojo, A., Watanabe, T., & Sato, Y. (2012). ETV6-NTRK3 as a therapeutic target of small molecule inhibitor PKC412. *Biochem Biophys Res Commun*, 429(1-2), 87-92. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.087
- [6] Chi, H. T., Vu, H. A., Iwasaki, R., Nagamura, F., Tojo, A., Watanabe, T., & Sato, Y. (2010). Detection of exon 12 type A mutation of NPM1 gene in IMS-M2 cell line. *Leuk Res*, 34(2), 261-262. doi: 10.1016/j.leukres.2009.09.019
- [7] Church, A. J., Calicchio, M. L., Nardi, V., Skalova, A., Pinto, A., Dillon, D. A., . . . Harris, M. H. (2018). Recurrent EML4–NTRK3 fusions in infantile fibrosarcoma and congenital mesoblastic nephroma suggest a revised testing strategy. *Modern Pathology*, 31(3), 463-473. doi: 10.1038/modpathol.2017.127
- [8] Church, A., Calicchio, M., Nardi, V., Skálová, A., Pinto, A., Dillon, D., . . . Harris, M. (2018). Recurrent EML4 NTRK3 fusions in infantile fibrosarcoma and congenital mesoblastic nephroma suggest a revised testing strategy. *Modern Pathology*, 31, 463-473.
- [9] Coudé, M.-M., Braun, T., Berrou, J., Dupont, M., Bertrand, S., Masse, A., . . . Gardin, C. (2015). BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells. *Oncotarget*, 6(19), 17698-17712. doi: 10.18632/oncotarget.4131
- [10] De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Le Bris, M. J., Basinko, A., & De Braekeleer, M. (2012). ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review. *Leuk Res*, 36(8), 945-961. doi: 10.1016/j.leukres.2012.04.010
- [11] Döhner, H., Wei, A. H., & Löwenberg, B. (2021). Towards precision medicine for AML. *Nature Reviews Clinical Oncology*. doi: 10.1038/s41571-021-00509-w
- [12] Eguchi, M., & Eguchi-Ishimae, M. (2001). Absence of t(12;15) associated ETV6-NTRK3 fusion transcripts in pediatric acute leukemias. *Med Pediatr Oncol*, 37(4), 417. doi: 10.1002/mpo.1223
- [13] Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M., Green, A., Enver, T., & Greaves, M. (2005). Directing oncogenic fusion genes into stem cells via an SCL enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), 1133-1138. doi: 10.1073/pnas.0405318102

- [14] Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M., Tojo, A., Morishita, K., Suzuki, K., Sato, Y., . . . Kamada, N. (1999). Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood*, 93(4), 1355-1363.
- [15] Green, S. M., Coyne, H. J., 3rd, McIntosh, L. P., & Graves, B. J. (2010). DNA binding by the ETS protein TEL (ETV6) is regulated by autoinhibition and self-association. *The Journal of biological chemistry*, 285(24), 18496-18504. doi: 10.1074/jbc.M109.096958
- [16] Gu, T. L., Popova, L., Reeves, C., Nardone, J., Macneill, J., Rush, J., . . . Polakiewicz, R. D. (2007). Phosphoproteomic analysis identifies the M0-91 cell line as a cellular model for the study of TEL-TRKC fusion-associated leukemia. *Leukemia*, 21(3), 563-566. doi: 10.1038/sj.leu.2404555
- [17] Larsen, C. A., Dashwood, R. H., & Bisson, W. H. (2010). Tea catechins as inhibitors of receptor tyrosine kinases: mechanistic insights and human relevance. *Pharmacological research*, 62(6), 457-464. doi: 10.1016/j.phrs.2010.07.010
- [18] Li, F.-s., & Weng, J.-K. (2017). Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nature Plants*, 3, nplants2017109. doi: 10.1038/nplants.2017.109
- [19] Ly, B. T. K., & Chi, H. T. (2018). ETV6/FLT3 Fusion Is a Novel Client Protein of Hsp90. *Oncology research*, 26(8), 1201-1205. doi: 10.3727/096504018X15154104709325
- [20] Ly, B. T. K., Chi, H. T., Yamagishi, M., Kano, Y., Hara, Y., Nakano, K., . . . Watanabe, T. (2013). Inhibition of FLT3 expression by green tea catechins in FLT3 mutated-AML cells. *PloS one*, 8(6), e66378-e66378. doi: 10.1371/journal.pone.0066378
- [21] Okabe, M., Kunieda, Y., Shoji, M., Nakane, S., Kurosawa, M., Tanaka, J., . . . Asaka, M. (1995). Megakaryocytic differentiation of a leukemic cell line, MC3, by phorbol ester: induction of glycoprotein IIb/IIIa and effects on expression of IL-6, IL-6 receptor, mpl and GATA genes. *Leuk Res*, 19(12), 933-943. doi: 10.1016/0145-2126(95)00039-9
- [22] Pelster, M. S., & Amaria, R. N. (2019). Combined targeted therapy and immunotherapy in melanoma: a review of the impact on the tumor microenvironment and outcomes of early clinical trials. *Ther Adv Med Oncol*, 11, 1758835919830826. doi: 10.1177/1758835919830826
- [23] Shukla, N., Roberts, S., Baki, M., Mushtaq, Q., Goss, P., Park, B., . . . Hyman, D. (2017). Successful Targeted Therapy of Refractory Pediatric ETV6-NTRK3 Fusion-Positive Secretory Breast Carcinoma. *JCO precision oncology*, doi: 10.1200/PO.17.00034
- [24] Sung, H., Ferlay, J., & Siegel, R. L. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *71(3)*, 209-249. doi: 10.3322/caac.21660