

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN LAO ĐỘNG CA KÍP ĐẾN MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN GEN ĐIỀU HÒA NHỊP SINH HỌC VÀ MỘT SỐ CHỈ SỐ HÓA SINH MÁU CỦA BỘ ĐỘI TRINH SÁT KỸ THUẬT

Nguyễn Minh Phương; Lê Văn Sơn*; Nguyễn Tùng Linh**

TÓM TẮT

Lao động ca kíp (LĐCK) làm rối loạn nhịp sinh học (NSH) và mức độ biểu hiện của các gen điều khiển NSH, đồng thời liên quan đến các rối loạn chức năng của cơ thể. Tiến hành nghiên cứu trên 58 bộ đội trinh sát kỹ thuật (BĐTSTK) (thuộc đơn vị X), chia làm 2 nhóm: nhóm 1: 31 người làm việc chuyên môn trực tiếp (phải làm việc theo ca kíp), nhóm 2: 27 người làm các công việc phục vụ khác (chỉ làm theo giờ hành chính) nhằm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện LĐCK đến mức độ biểu hiện một số gen điều hòa NSH và một số chỉ số hóa sinh máu ở BĐTSTK. Cả 2 nhóm được lấy máu xét nghiệm mức độ biểu hiện gen, bao gồm: gen Clock, Bmal1, Per1, Per2 và xét nghiệm hàm lượng glucose, cholesterol và triglycerid trong máu. Kết quả: mức độ biểu hiện gen Clock và Per2 giảm ở nhóm 1 so với nhóm 2. Hàm lượng glucose, cholesterol và triglycerid trong máu ở nhóm 1 tăng cao hơn so với nhóm 2, đồng thời, hàm lượng cholesterol và triglycerid tăng cao liên quan đến giảm mức độ biểu hiện gen Clock và Per2.

* Từ khóa: Lao động ca kíp; Nhịp sinh học; Gen điều hòa nhịp sinh học; Mức độ biểu hiện gen.

STUDY ON THE EFFECT OF WORKSHIFT CONDITION ON THE GENE EXPRESSION OF SOME CLOCK GENES AND SOME BLOOD BIOCHEMISTRY INDICES AMONG TECHNICAL SCOUT SOLDIERS

SUMMARY

Workshift results in circadian rhythm disorder, change of Clock gene expression and relates to some functional disorders of body. The aim of this study was to investigate the effect of workshift condition on gene expression of some Clock genes and some blood biochemistry indices. This study was carried out in 58 technical scout soldiers (unit X). The subjects were divided into two groups: group 1 included 31 soldiers who were professional soldiers and have to work with workshift schedule (professional soldiers), group 2 included 27 soldiers doing as office serviceman or administrative work and work in day time (non-professional soldiers). All subjects were done blood test to evaluate gene expression of Clock, Bmal1, Per1 and Per2 and blood levels of glucose, cholesterol and triglycerid as well. The results showed that the professional soldiers displayed significant decreases in gene expression of Clock and Per2 compared with those of non-professional soldiers. The blood levels of glucose, cholesterol and triglycerid in professional soldiers were higher than that in non-professional soldiers and the increase in blood levels of cholesterol and triglycerid had relation to decrease in gene expression of Clock and Per2.

* Key words: Workshift; Circadian rhythm; Clock genes; Gene expression.

* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Phạm Ngọc Châu

PGS. TS. Trần Văn Khoa

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, LĐCK khá phổ biến và là một trong những nguyên nhân gây ra nhiều bệnh mạn tính. LĐCK là đặc thù của nhiều ngành nghề khác nhau như: y tế, quân đội, an ninh... Một trong những cơ chế ảnh hưởng đến sức khỏe và gây ra bệnh tật của LĐCK là do rối loạn NSH ngày đêm, hay mất đồng bộ NSH. Mất đồng bộ NSH xảy ra là do không phù hợp giữa nhịp bên ngoài môi trường với NSH bên trong cơ thể, gây ra mất ổn định các chức năng sinh lý. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh mất đồng bộ NSH cơ thể trong LĐCK liên quan đến nhiều bệnh lý như: rối loạn tâm sinh lý, các hội chứng rối loạn chuyển hóa, bệnh đái tháo đường, ung thư và bệnh tim mạch [5, 7].

Ở cấp độ phân tử, NSH được điều khiển bởi một số gen như: Clock, Bmal1, Per1, Per2, Per3, Cry. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh sự hiện diện của các gen tham gia điều khiển NSH này cũng diễn ra theo chu kỳ ngày đêm và liên quan đến nhiều quá trình, chức năng khác nhau của mô và tế bào. Vì vậy, khi mất đồng bộ NSH, mức độ biểu hiện của gen tham gia điều hòa NSH cũng bị biến đổi và mất đi chu kỳ sinh học bình thường, nhiều chức năng khác nhau ở tế bào và ở mô sẽ bị ảnh hưởng và rối loạn, đó là nguyên nhân gây ra các bệnh lý trong cơ thể [1, 9].

BĐTSKT là một lực lượng đặc biệt của quân đội, do tính chất yêu cầu nhiệm vụ, phải làm việc theo ca kíp, do vậy, có thể có những ảnh hưởng nhất định đến chức năng trong cơ thể.

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: *Đánh giá ảnh hưởng của LĐCK đến mức độ biểu hiện một số gen điều khiển NSH và một số chỉ số hóa sinh máu của BĐTSKT.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**1. Đối tượng nghiên cứu.**

58 BĐTSKT khỏe mạnh, công tác tại đơn vị X, không có các bệnh lý tim mạch, thần kinh và bệnh lý mạn tính khác. Hiện tại, không có bệnh lý cấp tính phải dùng thuốc.

Chia đối tượng nghiên cứu thành 2 nhóm:

- Nhóm 1: 31 người, làm chuyên môn kỹ thuật nghiệp vụ trực tiếp (phải làm việc theo ca kíp).

- Nhóm 2: 27 người, làm các công việc phục vụ khác như hành chính, văn phòng, hậu cần (làm việc theo giờ hành chính).

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Các chỉ số nghiên cứu:*

- Mức độ biểu hiện gen tham gia điều hòa NSH trong tế bào máu ngoại vi bao gồm: gen Clock, Bmal1, Per1, Per2.

- Các chỉ số hóa sinh máu: glucose, cholesterol, triglycerid.

** Phương pháp lấy mẫu máu:*

Tất cả nhịn ăn sáng, lấy 5 ml máu tại thời điểm 7 giờ 30 phút sáng, chia vào 2 ống có chống đông bằng heparin, 1 ống 3 ml và 1 ống 2 ml. Bảo quản mẫu máu trong hộp đá ở 4°C, vận chuyển ngay trong thời gian 1 tiếng về labo xét nghiệm của Trung tâm Nghiên cứu Sinh-Y-Dược học quân sự, Học viện Quân y.

Ống chứa 3 ml máu được tách huyết tương và làm ngay xét nghiệm xác định các chỉ số hóa sinh.

Ống chứa 2 ml được bảo quản ở -80°C để làm xét nghiệm xác định mức độ biểu hiện gen điều hòa NSH ở tế bào máu ngoại vi.

* Phương pháp xét nghiệm mức độ biểu hiện gen điều hòa NSH:

Sau khi rã đông, lấy 600 µl mỗi mẫu máu để tách chiết ARN tổng số, sử dụng MasterPure™ RNA Purification Kit (hãng Epicentre).

Lấy 1 µg ARN tổng số cho phản ứng phiên mã ngược tổng hợp cADN sử dụng MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Epicentre), thể tích cho mỗi phản ứng của mỗi mẫu là 20 µl. Thực hiện phản ứng RT-PCR với các mẫu cADN thu được để xác định mức độ biểu hiện gen, trong đó gen β-actin được sử dụng làm gen để chuẩn hóa.

Bảng 1: Trình tự cặp mồi của các gen điều hòa NSH cho phản ứng RT-PCR.

TÊN GEN	CẶP MỒI CHO PHẢN ỨNG RT-PCR
Clock	Mồi xuôi: 5'-TCCTCAACACCAACCAAG-3' Mồi ngược: 5'-TCCAGAAGAAAGTTGAACGG-3'
Bmal1	Mồi xuôi: 5'-CGTCGGGATAAAAATGAACAg-3' Mồi ngược: 5'-GGAAGTCCAGTTTTTGCATC-3'
Per1	Mồi xuôi: 5'-AGCAGCAGCCTCGGTTTT-3' Mồi ngược: 5'-CTCCTCCTCCATAGCCAAGT-3'
Per2	Mồi xuôi: 5'-CTTCTTTTGCCGTGTCAGT-3' Mồi ngược: 5'-ATGGGAGAATAGTCGAAAGG-3'
β-actin	Mồi xuôi: 5'-CGCGTCCGCCCGCGAGC-3' Mồi ngược: 5'-CGTCCCAGTTGGTGACGATGCCGTGCT-3'

Thực hiện phản ứng RT-PCR trên máy RT-PCR Chromo 4 - P500 (hãng Bio-Rad), sử dụng SsoFast EvaGreen (hãng Bio-Rad) làm chất đánh dấu phát huỳnh quang, với 40 chu kỳ nhiệt, mỗi chu kỳ 10 giây ở 90°C và 1 phút ở 60°C. Đọc tín hiệu huỳnh quang ở 60°C. Máy tính sẽ tự động xác định giá trị Ct (Threshold cycle) của từng gen để tính toán mức độ biểu hiện gen. Ở đây, Ct là số chu kỳ mà tại đó sản phẩm khuếch đại có thể được

phát hiện bởi thay đổi của tín hiệu huỳnh quang.

Mức độ biểu hiện của các gen được biểu thị bằng số lượng tương đối của mRNA tương ứng, tính toán theo phương pháp $2^{-\Delta Ct}$ với gen β-actin làm gen chuẩn hóa. Trong đó:

ΔCt = giá trị Ct của gen β-actin - giá trị Ct của gen nghiên cứu

Số lượng mRNA tương đối được chuẩn hóa với gen β-actin là $2^{-\Delta Ct}$.

* Phương pháp xét nghiệm các chỉ số hóa sinh máu:

Ông chứa 3 ml máu được tách huyết tương, làm ngay xét nghiệm xác định các chỉ số hóa sinh, bao gồm: hàm lượng glucose, cholesterol và triglycerid trên máy xét nghiệm hóa sinh tự động Sysmec Chemix 180.

Đơn vị hàm lượng glucose, cholesterol và triglycerid là mmol/l.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 2: Mức độ biểu hiện một số gen điều khiển NSH ở tế bào máu ngoại vi của BÐTSKT nhóm trực tiếp và gián tiếp ($\bar{X} \pm SD$).

CÁC GEN ĐIỀU KHIỂN NSH	MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN (số lượng tương đối của mRNA)		p
	Nhóm 1 (n = 31)	Nhóm 2 (n = 27)	
Clock	0,87 ± 0,14	1,20 ± 0,22	< 0,05
Bmal1	1,09 ± 0,15	1,07 ± 0,19	> 0,05
Per1	1,14 ± 0,16	1,07 ± 0,24	> 0,05
Per2	0,89 ± 0,16	1,15 ± 0,18	< 0,05

Mức độ biểu hiện của gen Clock và Per2 ở nhóm 1 (0,87 và 0,89) thấp hơn so với nhóm 2 (1,02 và 1,15) có ý nghĩa (p < 0,05).

Mức độ biểu hiện của gen Bmal1 và gen Per1 ở 2 nhóm không khác biệt có ý nghĩa.

Bảng 3: Hàm lượng glucose, cholesterol và triglycerid trong máu của BÐTSKT ($\bar{X} \pm SD$).

CHỈ TIÊU	NHÓM 1 (n = 31)	NHÓM 2 (n = 27)	p
Glucose (mmol/l)	5,20 ± 0,49	4,48 ± 0,60	< 0,05
Cholesterol (mmol/l)	5,24 ± 0,83	4,79 ± 0,28	< 0,05
Triglycerid (mmol/l)	2,12 ± 0,87	1,54 ± 0,24	< 0,05

Hàm lượng glucose, cholesterol và triglycerid trong máu ở nhóm 1 (5,2 mmol/l, 5,24 mmol/l và 2,12 mmol/l) cao hơn so với nhóm 2 (4,48 mmol/l, 4,79 mmol/l và 1,54 mmol/l) ($p < 0,05$).

Bảng 4: Mức độ biểu hiện gen tham gia điều hòa NSH theo phân loại cholesterol và triglycerid máu của BÐTSKT nhóm 1 ($\bar{X} \pm SD$).

CÁC GEN ĐIỀU KHIỂN NSH	MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN (số lượng tương đối của mRNA)			
	Phân loại cholesterol		Phân loại triglycerid	
	< 5,2 mmol/l (n = 18)	≥ 5,2 mmol/l (n = 13)	< 2,1 mmol/l (n = 20)	≥ 2,1 mmol/l (n = 11)
Clock	0,93 ± 0,15	0,81 ± 0,14	0,92 ± 0,16	0,80 ± 0,11
	p < 0,05		p < 0,05	
Bmal1	1,07 ± 0,15	1,11 ± 0,13	1,08 ± 0,12	1,10 ± 0,13
	p > 0,05		p > 0,05	
Per1	1,16 ± 0,17	1,12 ± 0,13	1,16 ± 0,16	1,11 ± 0,14
	p > 0,05		p > 0,05	
Per2	0,96 ± 0,16	0,76 ± 0,12	0,94 ± 0,17	0,76 ± 0,13
	p < 0,05		p < 0,05	

Mức độ biểu hiện gen Clock và Per2 ở nhóm có hàm lượng cholesterol > 5,2 mmol/l thấp hơn so với nhóm có hàm lượng cholesterol < 5,2 mmol/l có ý nghĩa ($p < 0,05$). Tương tự, mức độ biểu hiện gen Clock và Per2 ở nhóm có hàm lượng triglycerid > 2,1 mmol/l thấp

hơn so với nhóm có hàm lượng triglycerid < 2,1 mmol/l có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Mức độ biểu hiện các gen Bmal1 và Per1 không khác biệt giữa 2 nhóm có cholesterol cao hơn và thấp hơn 5,2 mmol/l, cũng như giữa 2 nhóm có triglycerid cao hơn và thấp hơn 2,1 mmol/l.

BÀN LUẬN

Trong những năm gần đây, nhiều tác giả đã chứng minh LĐCK ảnh hưởng đến chu kỳ biến đổi của mức độ biểu hiện gen điều khiển NSH. Nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy LĐCK làm tăng nguy cơ mắc các bệnh chuyển hóa như: rối loạn chuyển hóa lipid, đái tháo đường; các bệnh tim mạch như huyết áp cao. Các tác giả cho rằng, những biểu hiện này có liên quan đến mất chu kỳ biểu hiện bình thường của các gen điều hòa NSH do phải LĐCK [9, 10].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, đối tượng là BÐTSKT, được xác định mức độ biểu hiện của các gen điều hòa NSH tại một thời điểm, do đó, chưa thể xác định chính xác nhất chu kỳ biểu hiện của những gen này. Tuy nhiên, trên thực tế, mức độ biểu hiện của gen điều hòa NSH ở tế bào máu ngoại vi tại một thời điểm đã được nhiều tác giả sử dụng để xác định mất chu kỳ biểu hiện bình thường của các gen đó, đồng thời chứng minh mối liên quan đến một số bệnh lý như: đái tháo đường, rối loạn giấc ngủ và biến đổi các chỉ số của hội chứng chuyển hóa [1, 2]. Kết quả nghiên cứu bảng 2 cho thấy mức độ biểu hiện của gen Clock và Per2 giảm ở tế bào máu ngoại vi của nhóm 1 (LĐCK) so với ở nhóm 2 (chỉ làm việc theo giờ hành chính). Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Ando H [3], theo

tác giả, ở những người LĐCK biểu hiện của gen Clock giảm hơn so với những người lao động theo giờ hành chính. Theo chúng tôi, có lẽ LĐCK ở BĐTSKT đã làm mất đi chu kỳ sinh học bình thường của cơ thể, làm rối loạn chu kỳ biểu hiện bình thường của gen điều khiển NSH, thể hiện bằng giảm biểu hiện của một số gen điều hòa NSH như Clock và Per2 trong máu ngoại vi.

Kết quả xét nghiệm hàm lượng glucose, cholesterol và triglycerid trong máu của BĐTSKT (bảng 3) cho thấy, hàm lượng glucose, cholesterol và triglycerid ở nhóm 1 cao hơn so với ở nhóm 2 có ý nghĩa ($p < 0,05$). Theo chúng tôi, nhóm 1 phải làm việc theo ca kíp nên đã gây ra sự mất đồng bộ NSH, đồng thời có trạng thái căng thẳng cảm xúc cao hơn so với nhóm 2, điều này dẫn đến tăng tiết các hormon như cortisol, catecholamin nhiều hơn so với nhóm gián tiếp, làm hàm lượng glucose, cholesterol và triglycerid ở họ cao hơn so với ở nhóm 2. Như vậy, BĐTSKT nhóm trực tiếp lao động theo ca kíp có nguy cơ bị các bệnh rối loạn chuyển hóa cao hơn so với nhóm gián tiếp. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của các tác giả: Kobayashi Y và CS nghiên cứu trên nhân viên bán hàng thấy, trạng thái căng thẳng nghề nghiệp càng cao liên quan tới tăng cao hàm lượng cholesterol trong máu [8]; Hedberg GE và CS thấy hàm lượng cholesterol và triglycerid ở những lái xe đường dài cao hơn so với nhóm lao động khác ít căng thẳng hơn [6].

Về mối liên quan giữa mức độ biểu hiện gen với hàm lượng cholesterol và triglycerid máu, kết quả bảng 4 cho thấy, mức độ biểu hiện của các gen Clock và Per2 thay đổi ngược hướng với biến đổi hàm lượng

cholesterol và triglycerid máu. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của [Gómez-Abellán P](#) và CS [4], tác giả đã chỉ ra giảm biểu hiện gen Clock ở những người có hàm lượng cholesterol máu tăng, đồng thời có mối liên quan giữa giảm mức độ biểu hiện gen Per2 với tăng số đo vòng bụng, nhưng chưa thấy rõ được mối liên quan giữa giảm biểu hiện gen Per2 với tăng các chỉ số cholesterol và triglycerid máu. Theo chúng tôi, có lẽ LĐCK ở BĐTSKT đã làm mất đi chu kỳ sinh học bình thường của cơ thể, làm rối loạn chu kỳ biểu hiện bình thường của các gen điều khiển NSH, thể hiện bằng giảm biểu hiện của một số gen điều hòa NSH như Clock và Per2 trong máu ngoại vi, đây là một yếu tố nguy cơ gây ra các biểu hiện hội chứng chuyển hóa ở BĐTSKT như tăng cao hàm lượng cholesterol và triglycerid máu.

KẾT LUẬN

- Tính chất LĐCK của BĐTSKT đã làm giảm mức độ biểu hiện gen tham gia điều hòa NSH Clock và Per2 trong tế bào máu ngoại vi.
- Hàm lượng glucose, cholesterol và triglycerid trong máu của BĐTSKT nhóm phải làm việc theo ca kíp cao hơn so với nhóm làm việc theo giờ hành chính, trong đó, hàm lượng cholesterol và triglycerid trong máu tăng cao liên quan đến giảm biểu hiện gen Clock và Per2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Eto T, Misu H, Shiramoto M, Tsuru T, Irie S, Fujimura A, Kaneko S. Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009, 52, pp.329-335.

2. Ando H, Ushijima K, Kumazaki M et al. Associations of metabolic parameters and ethanol consumption with messenger RNA expression of clock genes in healthy men. *Chronobiol Int*. 2010, 27 (1), pp.194-203.
3. Ando H, Ushijima K, Kumazaki M, Takamura T, Yokota N, Saito T, Irie S, Kaneko S, Fujimura A. Influence of age on clock gene expression in peripheral blood cells of healthy women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010, 65 (1), pp.9-13.
4. [Gómez-Abellán P](#), [Hernández-Morante JJ](#), [Luján JA](#), [Madrid JA](#), [Garaulet M](#). Clock genes are implicated in the human metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)*. 2008, 32 (1), pp.121-128.
5. Haines VY, Marchand A, Rousseau V, Demers A. The mediating role of work-to-family conflict in the relationship between shiftwork and depression. *Work & Stress*. 2008, 22 (4), pp.341-356.
6. Hedberg GE, Jacobsson KA, Janlert U, Langendoen S. Risk indicators of ischemic heart disease among male professional drivers in Sweden. *Scand J Work Environ Health*. 1993, 19, pp.326-333.
7. Jamal MB. Stress and health of employees on non-standard work schedules: a study of Canadian workers. *Stress and Health*. 2004, 20, pp.113-119.
8. Kobayashi Y, Hirose T, Tada Y, Tsutsumi A, Kawakami N. Relationship between two job stress models and coronary risk factors among Japanese part-time female employees of retail company. *J Occup Health*. 2005, 47, pp.201-210.
9. Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)*. 2008, 32, pp.658-662.
10. Sookoian S, Gemma C, Gianotti TF, Burgueno A, Castano G, Pirolo CJ. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *Am J Clin Nutr*. 2008, 87, pp.1606-1615.