

BÀI BÁO NGHIÊN CỨU GỐC

Nghiên cứu xác định đa hình đơn Nucleotide RS2596542 của gen mica ở bệnh nhân ung thư vòm họng

Nguyễn Phương Thoa^{1,2}, Vũ Hải Linh^{1,3}, Nguyễn Văn Chủ^{1,3}, Nguyễn Hữu Quốc¹, Nguyễn Kim Đồng¹, Lương Viết Hưng³, Nguyễn Thị Tình¹, Nguyễn Hoàng Việt^{1*}

TÓM TẮT

Mục tiêu: MICA được biết đến là một kháng nguyên thường được biểu hiện trên các khối u thể rắn trong đó có khối u gan. MICA có mức độ biểu hiện thấp ở các tế bào bình thường nhưng tăng cao ở các tế bào bệnh lý/ung thư. Nghiên cứu với mục tiêu là xác định mối liên quan của SNP RS2596542 với nguy cơ mắc ung thư vòm họng (Nasopharyngeal cancer - NPC) đã chứng minh được đa hình đơn nucleotide (SNPs) RS2596542 của gen MICA làm thay đổi nguy cơ mắc NPC.

Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu bệnh chứng, chọn mẫu thuận tiện với 144 mẫu sinh thiết được chẩn đoán NPC và 135 mẫu máu của người khỏe mạnh được thu thập.

Kết quả: Kiểu gen và alen của RS2596542 MICA được xác định bởi kỹ thuật Realtime PCR. Tỷ lệ kiểu gen của MICA tại RS2596542 trên bệnh nhân NPC lần lượt là: 34,72% CC; 44,44% CT; 20,84% TT. Kiểu gen TT và alen T của nhóm bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng với lần lượt ($p=0,01^*$; OR=2,47; 95%CI: 1,22-4,97) và ($p=0,01^*$; OR=1,51; 95%CI: 1,07-2,13).

Kết luận: Alen T của RS2596542 trên gen MICA làm tăng đáng kể nguy cơ mắc NPC và có thể được sử dụng như một dấu ấn sinh học để sàng lọc NPC ở Việt Nam.

Từ khóa: MICA, RS2596542, Ung thư vòm họng, NPC, Đa hình gen, SNPs, Realtime PCR

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư vòm họng (Nasopharyngeal cancer - NPC) là loại ung thư ác tính với sự xâm lấn tại chỗ, di căn sớm và có tính chất địa lý (1,2). NPC gặp phổ biến ở khu vực Nam Trung Quốc, Đông Nam Á, Bắc Cực và Trung Đông (2). Năm 2018 trên thế giới có khoảng 129.079 trường hợp mới mắc và 72.897 trường hợp tử vong do NPC. Việt Nam nằm trong nhóm các nước có tỉ lệ mắc NPC cao, thống kê năm 2018 cho thấy có 6.212 trường hợp mắc mới, 4.232 trường hợp tử vong do NPC (3).

MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) là một kháng nguyên thường được biểu hiện trong khối u biểu mô, đặc biệt là biểu mô đường tiêu hóa. Một thụ thể cho MICA đã được phát hiện trên hầu hết các tế bào $\gamma\delta$ T, CD8+, tế bào $\alpha\beta$ T và tế bào diệt tự nhiên NK là NKG2D (Natural killer group 2 D receptor). Ở các tế bào bình thường, MICA có mức độ biểu hiện thấp nhưng trong các tế bào bệnh lý/ung thư mức độ biểu hiện tăng cao (4–7).

Gen MICA là một gen đa hình, với hơn 100 alen và 87 biến thể protein được xác định ở người (8). MICA RS2596542 là biến thể SNPs thay thế C→T ở vùng



*Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Hoàng Việt

Email: hoangviet@hmu.edu.vn

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Trường Đại học Y Tế công cộng

³Bệnh viện K, Hà Nội

Ngày nhận bài: 15/3/2021

Ngày phản biện: 18/5/2021

Ngày đăng bài: 30/5/2021

5' promoter của MICA và có ảnh hưởng đến biểu hiện của protein MICA trên bề mặt tế bào (9). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng SNPs RS2596542 có liên quan chặt chẽ với ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) nhưng chưa có nghiên cứu nào về mối liên quan giữa SNPs với -NPC cả trên thế giới và Việt Nam (9–11).

Do đó nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu: Xác định mối liên quan của SNP RS2596542 trên gen MICA đối với nguy cơ mắc ung thư vòm họng tại Việt Nam.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu bệnh chứng, chọn mẫu thuận tiện.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu thực hiện từ tháng 02/2020 - 03/2021 tại Khoa Kỹ thuật Y học và Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, trường Đại học Y Hà Nội.

Cỡ mẫu và chọn mẫu

Nhóm chứng là 135 mẫu máu ngoại vi của những người khỏe mạnh bình thường, không có tiền sử bị bệnh NPC, không tiềm ẩn nguy cơ các bệnh mãn tính hoặc bệnh ác tính, chọn ghép cặp xấp xỉ tuổi (± 5 tuổi, cùng giới) so với nhóm bệnh và được thu thập ngẫu nhiên từ bệnh viện trường Đại học Y Hà Nội. Nhóm bệnh là 144 mẫu mô sinh thiết của bệnh nhân NPC chưa được tiến hành phác đồ điều trị và được chẩn đoán xác định bằng xét nghiệm mô bệnh học tại Trung tâm giải phẫu bệnh và sinh học phân tử, bệnh viện K cơ sở Tân Triều.

Phương pháp thu thập số liệu

+ Thu thập 2ml máu ngoại vi từ 135 người khỏe mạnh vào ống chống đông EDTA. 144 mẫu mô sinh thiết NPC được chẩn đoán xác định bằng xét nghiệm mô bệnh học tại Trung tâm giải phẫu bệnh và sinh học phân tử, bệnh viện K cơ sở Tân Triều, được cắt thành những mảnh có kích thước 3-5 μm , lấy 8-10 mảnh cắt bảo quản trong ống eppendorf để tiến hành tách chiết DNA.

+ Kỹ thuật tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ các mẫu mô theo QIAamp DNA FFPE

Tissue Kit (Qiagen, 56404), từ các mẫu máu toàn phần theo QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Cat No.51104). Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được xác định bằng máy Nano-Drop, những mẫu DNA có giá trị $A_{260/280}$ nằm trong khoảng 1,8 – 2,0 thì đảm bảo độ tinh sạch của DNA.

+ Kỹ thuật Realtime PCR để xác định kiểu gen: Toàn bộ mẫu DNA thu thập được trong nghiên cứu đều được pha loãng đến nồng độ khoảng 20 ng/ μl . Thành phần phản ứng Realtime PCR (thể tích 10 μl) bao gồm: 5 μl Taqman Genotyping Master Mix (Thermoscientific, 4371353), 0,5 μl 20x Probe primeRS (Thermoscientific, C_27301153_10) và 4,5 μl DNA đã pha loãng. Sau đó thực hiện phản ứng Realtime PCR trên hệ thống QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster city, USA) với chu trình nhiệt: 60°C trong 30 giây; 95°C trong 10 phút; (95°C: 15 giây và 60°C: 1 phút) trong 40 chu kỳ; và kết thúc ở 60°C trong 30 giây.

Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm thống kê IBM SPSS Statistics, tính toán tỉ suất chênh OR, 95% CI, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được chấp thuận bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học của Trường Đại học Y Hà Nội với mã số 26/HMUIRB. Bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia nghiên cứu. Các thông tin cá nhân được đảm bảo bí mật.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Để tiến hành lựa chọn đối tượng phù hợp, nghiên cứu được thực hiện trên 2 nhóm đối tượng: nhóm chứng bao gồm 135 mẫu máu từ người khỏe mạnh (86 nam - 49 nữ), không có tiền sử bị bệnh NPC, không tiềm ẩn nguy cơ các bệnh mãn tính hoặc bệnh ác tính và nhóm bệnh bao gồm 144 mẫu mô sinh thiết từ bệnh nhân được chẩn đoán mắc NPC (99 nam – 45 nữ) bằng phương pháp chẩn đoán mô bệnh học. Nhóm bệnh, nhóm chứng được chọn ghép cặp xấp xỉ tuổi (± 5 tuổi) và cùng giới.

Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

		Nhóm bệnh (n=144)		Nhóm chứng (n=135)		p
		n	%	n	%	
Giới tính						
	Nam	99	67,75	86	63,7	p>0,05
	Nữ	45	32,25	49	36,3	
Tuổi trung bình		Trung bình	SD	Trung bình	SD	p>0,05
		53,28	12,87	51,73	12,85	

Bảng 1 mô tả các đặc điểm chung của 2 nhóm đối tượng nghiên cứu: độ tuổi tham gia nghiên cứu trung bình của nhóm bệnh là 53,28 tuổi, nhóm chứng là 51,73, tỷ lệ giới tính nam – nữ của nhóm bệnh và nhóm chứng lần lượt là 67,75-32,25; 63,7 -36,3, p>0,05. Như vậy không có sự khác biệt về giới tính và tuổi trung bình giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng.

Mối liên quan giữa RS2596542 với nguy cơ gây ung thư vòm họng

Sau khi tiến hành kỹ thuật Realtime PCR nhằm xác định mối liên quan của SNP RS2596542 trên gen MICA đối với nguy cơ mắc ung thư vòm họng tại Việt Nam. Kết quả phân tích kiểu gen MICA tại vị trí RS2596542 bằng phương pháp Realtime PCR thu được cụ thể như sau

Bảng 2. Đặc điểm kiểu gen và alen của MICA tại SNPs RS2596542

		Nhóm bệnh (n=144)		Nhóm chứng (n=135)		p	OR (95%CI)
		n	%	n	%		
Kiểu gen							
CC	50	34,72	58	42,96		ns	
CT	64	44,44	64	47,41		ns	
TT	30	20,84	13	9,23	0,01*	2,47 (1,22 – 4,97)	
Alen							
C	164	56,94	180	66,67	0,01*	1,51 (1,07-2,13)	
T	124	43,06	90	33,33			

ns: không có ý nghĩa thống kê

Bảng 2 miêu tả tỷ lệ phân bố kiểu gen và alen của MICA RS2596542 giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Tỷ lệ phân bố kiểu gen của MICA RS2596542 trên bệnh nhân NPC lần lượt là 34,72% CC; 44,44% CT; 20,84%TT trong khi

đó trên nhóm chứng là 42,96% CC; 47,41% CT; 9,23%TT. Kiểu gen TT và T của nhóm bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng lần lượt (p=0,01*; OR=2,47; 95%CI: 1,22-4,97) và (p=0,01*; OR=1,51; 95%CI: 1,07-2,13).

BÀN LUẬN

Năm 2018, theo Global cancer statistics, NPC là loại ung thư phổ biến thứ 24 trên toàn thế giới (3). Cho đến nay, nguyên nhân gây ra NPC được biết đến là do sự kết hợp của nhiều yếu tố, bao gồm cả yếu tố môi trường, virus và các biến đổi di truyền tuy nhiên nguyên nhân chính xác lại không thực sự rõ ràng (2,5,12). Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu được tiến hành nhằm xác định mối liên quan giữa các đa hình đơn SNPs với NPC. Các kết quả thu được cho thấy các SNPs: miR-146a (RS2910164, C> G), HCG9 (RS3869062, A> G), HCG9 (RS16896923, T> C), MMP2 (RS243865, C> T), GAB1 (RS2076483, T> C) và TP53 (RS1042522, C> G) thì có liên quan đến việc giảm nguy cơ mắc NPC, trong khi các SNPs: GSTM1 (+ / DEL), IL-10 (RS1800896, A> G), MDM2 (RS2279744, T> G), MDS1-EVI1 (RS6774494, G> A), XPC (RS2228000, C> T), HLA-F (RS3129055, T> C), SPLUNC1 (RS2752903, T> C; và RS750064, A> G) RS29232, G> A) thì có liên quan đến việc tăng nguy cơ mắc NPC (13).

MICA là 1 gen đa hình có kích thước 4,7 kb, có đến hơn 100 alen và 87 biến thể protein được xác định ở người (8). Đa hình đơn RS2596542 C/T nằm trên vùng đầu 5' promoter, không nằm trên vùng gen mã hóa nên không làm thay đổi cấu trúc MICA tuy nhiên nó có vai trò trong việc thúc đẩy biểu hiện của gen MICA (9). Đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra mối liên quan giữa RS2596542 (C→T) trong HCC do virus mà ít thấy các nghiên cứu liên quan đến các bệnh lý ác tính khác (9). Trên bệnh nhân HCC, một phân tích tổng hợp năm 2019 dựa vào ba cơ sở dữ liệu công bố khoa học điện tử (MEDLINE, Web of Science và Embase) đã chỉ ra alen MICA RS2596542C có liên quan đáng kể đến việc giảm nguy cơ HCC dựa trên độ tương phản của alen ($P < 0,001$, OR = 0,76, 95% CI = 0,69–0,83), so sánh đồng hợp tử ($P < 0,001$, OR = 0,57, 95% CI = 0,48–0,69) và mô hình di truyền lặn ($P < 0,001$, OR = 0,77, 95% CI = 0,65–0,91) trong khi bệnh nhân mang kiểu gen MICA RS2596542TT có nguy cơ mắc HCC cao hơn đáng kể so với những người có CT hoặc CC kiểu gen (TT so với CT + CC, $P < 0,001$, OR = 1,57, 95% CI = 1,36–1,81) (11). Trong nghiên

cứ này, sự liên quan của SNPs RS2596542 (C→T) trong gen MICA và nguy cơ mắc NPC cũng cho ra được kết quả tương tự. Tỷ lệ kiểu gen của MICA tại RS2596542 trên bệnh nhân NPC lần lượt là: 34,72% CC; 44,44% CT; 20,84% TT. Kiểu gen TT và T của nhóm bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p=0,01^*$; OR=2,47; 95%CI: 1,22–4,97) và ($p=0,01^*$; OR=1,51; 95%CI: 1,07–2,13). Kết quả này cho thấy giống như trong bệnh HCC, alen C của MICA RS2596542 làm giảm nguy cơ NPC. Alen T của của MICA RS2596542 làm tăng nguy cơ mắc NPC. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam đã chứng minh được mối liên quan di truyền giữa MICA RS2596542 với NPC, xác nhận giả thiết ban đầu của nhóm nghiên cứu chúng tôi là những cá thể mang kiểu gen khác nhau (CC, CT hay TT) ở vị trí đa hình đơn nucleotide RS2596542 của gen MICA sẽ có nguy cơ mắc NPC khác nhau. Tuy nhiên nghiên cứu mới bước đầu đánh giá mối liên quan giữa SNP RS2596542 và NPC, vẫn rất cần các nghiên cứu với số lượng mẫu lớn hơn để đánh giá được tỷ lệ kiểu gen và alen ở giai đoạn sớm (I,II) và giai đoạn muộn (III, IV) nhằm xác định chính xác mức độ ảnh hưởng của SNP RS2596542 với NPC.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chỉ ra mối liên quan giữa alen T tại SNP RS2596542 của gen MICA trong việc làm tăng nguy cơ mắc NPC. Kết quả cho thấy rằng SNP này có thể được sử dụng như một dấu ấn sinh học tiềm năng để sàng lọc NPC ở Việt Nam.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi quỹ NAFOSTED với mã số 108.02-2018.312. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn: Bệnh viện K cơ sở Tân Triều và Trường Đại học Y Hà Nội đã giúp đỡ trong suốt quá thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. He ML, Luo MXM, Lin MC, Kung H. MicroRNAs: potential diagnostic markers and therapeutic targets for EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1825(1):1–10.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-

- Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015Mar;65(2):87–108.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancer types in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394–424.
4. Bensouda Y, Kaikani W, Ahbeddou N, Rahhali R, Jabri M, Mrabti H, et al. Treatment for metastatic nasopharyngeal carcinoma. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis. 2011 Apr 1;128(2):79–85.
5. Fu ZT, Guo XL, Zhang SW, Zeng HM, Sun KX, Chen WQ, He J. Incidence and mortality of nasopharyngeal carcinoma in China, 2014. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2018 Aug 23;40(8):566–571.
6. Cao Y. EBV based cancer prevention and therapy in nasopharyngeal carcinoma. NPJ Precis Oncol. 2017 May 15;1(1):1–5.
7. Gross E, Sunwoo JB, Bui JD. Cancer immunosurveillance and immunoediting by natural killer cells. Cancer J. 2013 Dec;19(6):483–9.
8. Yang X, Kuang S, Wang L, Wei Y. MHC class I chain-related A: Polymorphism, regulation and therapeutic value in cancer. Biomed Pharmacother. 2018 Jul;103:111–7.
9. Wang H, Cao H, Xu Z, Wang D, Zeng Y. SNP RS2596542G>A in MICA is associated with risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. Biosci Rep. 2019 May 31;39(5):BSR20181400.
10. Tong HV, Toan NL, Song LH, Bock CT, Kremsner PG, Velavan TP. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: functional roles of MICA variants. J Viral Hepat. 2013Oct;20(10):687–98.
11. Kuang X-J, Mo D-C, Qin Y, Ahir BK, Wang J-J, Peng Z, et al. Single nucleotide polymorphism of RS2596542 and the risk of hepatocellular carcinoma development: A meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2019 Mar;98(11):e14767.
12. Mahdavi N, Ghoncheh M, Mohammadian-Hafshejani A, Khosravi B, Salehiniya H. Epidemiology and Inequality in the Incidence and Mortality of Nasopharynx Cancer in Asia. Osong Public Health Res Perspect. 2016 Dec;7(6):360–72.
13. Wu MY, Huang SJ, Yang F, Qin XT, Liu D, Ding Y, et al. Detection of nasopharyngeal carcinoma susceptibility with single nucleotide polymorphism analysis using next-generation sequencing technology. Oncotarget. 2017 Aug 8;8(32):52708–23.

Assessment of single nucleotide polymorphism RS2596542 of MICA gene among nasopharyngeal cancer patients

Nguyễn Phương Thoa^{1,2}, Vu Hai Linh^{1,3}, Nguyễn Văn Chu^{1,3}, Nguyễn Hữu Quốc¹, Nguyễn Kim Đông¹, Lương Việt Hưng³, Nguyễn Thị Tinh¹, Nguyễn Hoàng Việt¹

¹Hanoi Medical University

²Hanoi University of Public Health

³National Cancer hospital, Ha Noi

MICA is an antigen that is commonly expressed on cell surface of tumor cells. MICA had a low expression level in normal cells but increased in pathological/cancer cells. The goal of the study was to determine the association of SNP RS2596542 with the risk of nasopharyngeal cancer (NPC). 144 biopsy samples diagnosed with NPC and 135 blood samples from healthy people were collected. Genotypes and alleles of RS2596542 MICA were determined by Realtime PCR genotyping. The genotype rate of MICA at RS2596542 in patients with NPC was 34.72% CC; 44.44% CT and 20.84% TT. The genotype of TT and T allele in the disease group was significantly higher than the control group ($p=0.01^*$; OR=2.47; 95%CI: 1.22-4.97) and ($p=0.01^*$; OR=1.51; 95%CI: 1.07-2.13). The T-allele at SNP RS2596542 of the MICA gene increases the risk of NPC and suggests that this could be used as a biomarker for NPC screening in Viet Nam.

Keywords: MICA, RS2596542, nasopharyngeal cancer, NPC, Single Nucleotide Polymorphism, SNPs, Realtime PCR