

Biểu hiện giảm của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ

Nguyễn Thị Tú Linh^{1,2}, Vũ Thị Trinh¹, Lê Lan Phương¹, Lê Trung Thọ³, Trịnh Hồng Thái^{1,2*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

³Bệnh viện Phổi Trung ương, 463 Hoàng Hoa Thám, phường Vĩnh Phúc, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 4/8/2022; ngày chuyển phản biện 8/8/2022; ngày nhận phản biện 10/9/2022; ngày chấp nhận đăng 17/9/2022

Tóm tắt:

Các phân tử RNA dài không ghi mã (lncRNA) có chủ yếu trong nhân của tế bào và tham gia vào nhiều quá trình điều hoà biểu hiện gen khác nhau. Mức độ biểu hiện bất thường của các phân tử lncRNA được cho là có vai trò đối với hoạt động di căn, xâm lấn và tăng sinh của khối u, trong đó có ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN). Các lncRNA cũng được phát hiện thấy có biểu hiện tăng hoặc giảm trong các exosome do tế bào ung thư tiết ra, do đó chúng có tiềm năng được sử dụng như một chỉ thị sinh học ung thư không xâm lấn. Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương được xác định trên 29 mẫu bệnh nhân được chẩn đoán mắc UTPKTBN và 29 mẫu huyết tương đối chứng được lấy từ người không mắc bệnh UTPKTBN và các bệnh liên quan đến phổi bằng phương pháp PCR định lượng (qPCR) sử dụng SYBR Green. Sau đó, các phương pháp phân tích thống kê được sử dụng để đánh giá mối liên quan giữa mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 với các đặc điểm bệnh học của UTPKTBN. Kết quả cho thấy, lncRNA UCA1 có biểu hiện giảm trong exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN so với nhóm đối chứng ($p=0,05$), đặc biệt là giảm ở giai đoạn sớm (giai đoạn I + II). Tuy nhiên, biểu hiện của lncRNA UCA1 không có mối liên quan với các đặc điểm bệnh học của UTPKTBN như độ tuổi, giới tính, tình trạng hút thuốc lá và uống rượu, kích thước khối u, giai đoạn bệnh, mức độ xâm lấn, mức độ hạch và mức độ di căn của khối u. Nghiên cứu đã cung cấp các số liệu ban đầu về biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN người Việt Nam làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về lncRNA trên nhóm bệnh nhân này.

Từ khoá: các phân tử RNA dài không ghi mã, các phân tử RNA dài không ghi mã UCA1, exosome, ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Chỉ số phân loại: 1.6, 3.1

*Tác giả liên hệ: Email: thaith@vnu.edu.vn

Downregulated expression of exosomal long non-coding RNA UCA1 in plasma of patients with non-small cell lung cancer

Thi Tu Linh Nguyen^{1,2}, Thi Trinh Vu¹, Lan Phuong Le¹, Trung Tho Le³, Hong Thai Trinh^{1,2*}

¹Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

³National Lung Hospital, 463 Hoang Hoa Tham Street, Vinh Phuc Ward, Ba Dinh District, Hanoi, Vietnam

Received 4 August 2022; revised 10 September 2022; accepted 17 September 2022

Abstract:

Long non-coding RNAs (lncRNAs), mainly found in the nucleus of cells, are involved in different gene expression and regulation processes. Growing evidence has shown that abnormalities in the expression levels of lncRNAs play an important role in tumour metastasis, invasion, and proliferation, especially in non-small cell lung cancer (NSCLC). lncRNAs were also found to be upregulated or downregulated in exosomes secreted by cancer cells, thus they have the potential to be used as a non-invasive cancer biomarker. In this study, the expression of exosomal lncRNA UCA1 was determined on 29 plasma samples of patients with NSCLC and 29 controls who did not have NSCLC or related lung diseases by quantitative PCR using SYBR Green. Then, statistical analyses were used to evaluate the association between the expression of lncRNA UCA1 and some pathological features of NSCLC. The results showed that lncRNA UCA1 was downregulated in the exosomes of NSCLC patients compared with the control group ($p=0.050$), especially in the early stage (stage I + II). However, there was no association between the expression of lncRNA UCA1 and some pathological features of NSCLC, such as age, sex, smoking, alcohol consumption, tumour size, disease stage, lymph nodes, or tumour metastasis. This study provided the initial data on the expression of exosomal lncRNA UCA1 in the plasma of Vietnamese patients with NSCLC and further studies on the larger samples are needed to be continued.

Keywords: exosome, long non-coding RNA, long non-coding RNA UCA1, non-small cell lung cancer.

Classification numbers: 1.6, 3.1

1. Đặt vấn đề

Các RNA dài không ghi mã là một họ các phân tử RNA không mã hóa cho protein, có chiều dài >200 nucleotide (thường có kích thước 1.000-10.000 nucleotide), tham gia vào điều hòa biểu hiện gen ở mức độ sau phiên mã và các quá trình sinh học khác của tế bào như cải biến sợi nhiễm sắc, dịch mã, cải biến protein... [1, 2]. Các lncRNA có thể tạo thành cấu trúc bậc 2 hoặc 3 nên có thể đóng vai trò vừa như RNA, vừa như protein. Không giống như mRNA, các lncRNA có chủ yếu trong nhân của tế bào với mức độ biểu hiện thấp và đặc hiệu cho loại tế bào [3]. Bất thường trong mức độ biểu hiện của các phân tử lncRNA có thể gây ra nhiều bệnh, trong đó có ung thư [4]. lncRNA được chia thành 2 loại: lncRNA gây ung thư và lncRNA ức chế khối u. Các lncRNA có thể kích hoạt hoặc ức chế biểu hiện gen thông qua nhiều cơ chế khác nhau, hoạt động đơn lẻ hoặc kết hợp với các phân tử microRNA (miRNA) và các phân tử khác như một phần của các con đường trao đổi chất khác nhau. Trong những năm gần đây, một số lượng lớn các lncRNA đã được tìm thấy trong UTPKTBN và được cho là có vai trò trong di căn, xâm lấn và tăng sinh khối u [5, 6].

Biểu hiện của các lncRNA cũng được phát hiện thấy trong huyết thanh của bệnh nhân ung thư và trong các exosome được tiết ra từ tế bào ung thư [7]. Exosome là các bóng ngoại bào có đường kính 30-100 nm và có tỷ khối 1,10-1,18 g/ml [8]. Vỏ ngoài của exosome là màng lipid kép có cấu trúc tương tự như màng tế bào, bên trong có chứa nhiều thành phần bao gồm các protein bề mặt, lipid, các chất chuyển hóa và vật liệu di truyền (DNA, mRNA, lncRNA, miRNA...) đặc trưng cho loại tế bào tiết ra, do đó có thể phản ánh nguồn gốc và trạng thái sinh lý của tế bào giải phóng ra exosome [9, 10]. lncRNA trong exosome có thể do tế bào ung thư tiết ra và nhập với tế bào nhận. Giải trình tự RNA cho thấy các RNA trong exosome phản ánh các thành phần RNA nội bào và có sự khác biệt giữa tế bào bình thường và tế bào ung thư [11]. Các nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng, một số lncRNA có mức độ biểu hiện thấp trong tế bào nhưng lại được làm giàu trong exosome được tiết ra. Hoặc ngược lại, một số lncRNA được thấy có biểu hiện tăng trong mô ung thư nhưng lại có biểu hiện giảm trong exosome tách từ huyết tương [12]. Điều này cho thấy, các lncRNA được đóng gói chọn lọc vào trong exosome và có thể tác động hiệu quả đến các tế bào nhận cũng như quá trình phát sinh ung thư. Do đó, các phân tử lncRNA trong exosome có tiềm năng được sử dụng như một chỉ thị sinh học ung thư không xâm lấn [13].

lncRNA UCA1 nằm ở vị trí 19p13.12 trên nhiễm sắc thể số 19 của người, có kích thước 1,4 kb bao gồm 3 exon và 2 intron với nhiều mã bộ ba kết thúc và không có khung đọc mở [14]. lncRNA UCA1 được báo cáo có vai trò thúc đẩy quá trình tăng sinh tế bào, xâm lấn và di căn xa [15]. Trong các nghiên cứu trước đây, lncRNA UCA1 đã được xác định là một chỉ thị tiên lượng cho sự di căn của ung thư bàng quang và có mối liên quan với một số dạng ung thư khác ở người như ung thư vú, đại trực tràng và ung thư phổi [16]. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, biểu hiện cao quá mức của lncRNA UCA1 trong mẫu mô UTPKTBN so với các mô không ung thư lân cận làm tăng nguy cơ có tiên lượng xấu ở bệnh nhân và có mối liên quan với một số đặc điểm bệnh học của bệnh UTPKTBN [17-19]. Mặc dù vậy, vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN. Do vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN, từ đó xác định mối liên quan giữa biểu hiện của lncRNA UCA1 với một số đặc điểm bệnh học của bệnh UTPKTBN.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Mẫu nghiên cứu gồm huyết tương của 29 bệnh nhân được chẩn đoán mắc UTPKTBN chưa trải qua điều trị, trong đó có 15 nam và 14 nữ với độ tuổi trung bình là 61,62 tuổi do Bệnh viện Phổi Trung ương cung cấp kèm các thông tin về đặc điểm bệnh học. Dựa trên chẩn đoán mô bệnh học về kích thước khối u và mức độ di căn theo phân loại khối u, hạch, di căn (TNM, trong đó: T - Tumour là khối u, N - Nodes là mức độ lan của khối u đến các hạch bạch huyết gần đó, M - Metastasis là di căn), nhóm bệnh nhân UTPKTBN được chia thành 2 nhóm: 16 bệnh nhân ở giai đoạn sớm I + II và 13 bệnh nhân ở giai đoạn muộn III + IV. Bệnh nhân đã trải qua hóa trị, xạ trị hoặc dùng thuốc điều trị không được lấy mẫu sử dụng cho nghiên cứu.

Mẫu đối chứng gồm 29 mẫu huyết tương được lấy từ người khoẻ mạnh, không mắc bệnh UTPKTBN và các bệnh liên quan đến phổi (có cùng thành phần về tuổi và giới tính với bệnh nhân UTPKTBN) do Bệnh viện Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp.

Tất cả bệnh nhân đều được biết về mục đích và đồng ý tham gia nghiên cứu. Việc lấy mẫu được tuân theo các quy định hiện hành về đạo đức trong nghiên cứu y học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phân tách exosome từ huyết tương: 300 µl mẫu huyết tương của mỗi bệnh nhân được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C và lọc qua màng lọc 0,22 µm (Satorius, Đức). Bổ sung 300 µl đệm PBS pH 7,4 (đã được lọc qua màng lọc 0,22 µm), trộn đều và tiến hành siêu ly tâm lần thứ nhất ở 120.000 vòng/phút, 4°C trong 70 phút bằng máy Optima TLX Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Hoa Kỳ) sử dụng rotor góc cố định MLA-130. Lặp lại bước này lần thứ hai và loại bỏ dịch nổi, thu cặn exosome cho các bước tiếp theo.

- Tách chiết RNA tổng số: RNA tổng số trong exosome huyết tương được tách chiết bằng Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) theo quy trình của nhà sản xuất. Dịch sau tách chiết được cô đặc bằng máy cô chân không (Speedvac - Thermo Scientific, Hoa Kỳ) từ thể tích 100 xuống còn 20 µl. Nồng độ RNA tổng số được định lượng bằng đo mật độ hấp thụ ánh sáng tử ngoại của acid nucleic ở bước sóng 260 nm (A260) sử dụng máy NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Độ tinh sạch của RNA tách chiết được xác định bằng tỷ số A260/A280 trong khoảng 1,8-2,0. RNA tổng số được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

- Chuyển RNA thành cDNA: RNA được phiên mã ngược thành cDNA bằng bộ kit GoScript (Promega, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trộn 10 µl dung dịch chứa RNA với các môi ngẫu nhiên và ủ ở 70°C trong 5 phút. Đệm phản ứng có tổng thể tích 15 µl, bao gồm 2 µl đệm GoScript™ x5; 0,6 µl MgCl₂ (25 mM); 0,5 µl PCR hỗn hợp nucleotide; 0,25 µl chất ức chế ribonuclease tái tổ hợp; 0,5 µl enzyme phiên mã ngược GoScript™ và nước. Chu trình nhiệt gồm gắn môi ở 25°C, 5 phút; kéo dài chuỗi ở 42°C, 60 phút; bất hoạt enzyme ở 70°C, 15 phút trước khi đưa về 20°C, 1 phút.

- Phương pháp PCR định lượng: Biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương được so sánh với biểu hiện của gen nội chuẩn β-ACTIN và được xác định bằng phương pháp PCR định lượng (qPCR) sử dụng SYBR Green làm chất phát huỳnh quang. Các cặp môi dùng cho phản ứng qPCR được thiết kế nằm giữa vị trí nối của 2 exon tương ứng với lncRNA UCA1 hoặc β-ACTIN. Trình tự các cặp môi sử dụng (IDT, Singapore) được trình bày ở bảng 1. Phản ứng khuếch đại sử dụng kit iTaq™ Universal SYBR® Green Super mix (Bio-Rad, Hoa Kỳ) với thành phần bao gồm: 5 µl SYBR Green; 0,5 µl môi xuôi; 0,5 µl

môi ngược; 1 µl cDNA (pha loãng 100 lần đối với khuôn cDNA tổng hợp từ RNA tổng số của exosome) và H₂O trong tổng thể tích 10 µl phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều và chu trình nhiệt được thực hiện trên máy Realtime PCR 7500 fast (Applied Biosystems, Hoa Kỳ) với điều kiện: 95°C, 2 phút và 40 chu kỳ (95°C, 15 giây; 60°C, 30 giây). Đường cong nóng chảy được phân tích sau mỗi lần chạy để xác định độ đặc hiệu của sản phẩm. Sau khi hoàn thành phản ứng, mức độ biểu hiện của UCA1 so với β-ACTIN được xác định bằng công thức $2^{-\Delta C_t}$, trong đó $\Delta C_t = C_{t\text{UCA1}} - C_{t\beta\text{-ACTIN}}$. Mức độ biểu hiện của UCA1 trong tế bào ung thư so với tế bào bình thường được tính bằng công thức $2^{-\Delta\Delta C_t}$ theo K.J. Livak và cs (2001) [20], trong đó $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (mẫu ung thư) - ΔC_t (mẫu đối chứng).

Bảng 1. Trình tự các cặp môi sử dụng trong phản ứng qPCR.

| Tên môi | Trình tự môi (5'-3') | Kích thước sản phẩm |
|---------|-------------------------------|---------------------|
| β-ACTIN | F - CTTAGTTGCGTTACACCCITTCCTG | 156 bp |
| | R - CTGTCACCTTCACCGTTCACAGTTT | |
| UCA1 | F - ACGCTAACTGGCACCTTGTT | 153 bp |
| | R - TGGGGATTACTGGGGTAGGG | |

- Xử lý số liệu và phân tích thống kê: Sử dụng các phần mềm Excel 2010, SPSS 20 và GraphPad Prism 8.4.2 để phân tích và biểu diễn số liệu theo các kiểm định thống kê thường dùng. Các biến định lượng được biểu diễn bằng trung vị kèm theo khoảng tứ phân vị 25-75%. So sánh thống kê với các biến định lượng độc lập được thực hiện bằng kiểm định Mann-Whitney U, với các biến định tính được thực hiện bằng kiểm định χ^2 hoặc Fisher. Tất cả các kiểm định thống kê được ghi nhận theo 2 chiều và được coi là khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm nghiên cứu của nhóm bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ và nhóm đối chứng

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê nào được ghi nhận về độ tuổi, giới tính, thói quen hút thuốc lá hoặc uống rượu giữa nhóm bệnh nhân UTPKTBN và nhóm đối chứng ($p > 0,05$). Bên cạnh đó, không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh nhân UTPKTBN ở giai đoạn sớm (I + II) và giai đoạn muộn (III + IV) về một số đặc điểm bệnh học của ung thư phổi như kích thước khối u, giai đoạn bệnh, giai đoạn T và mức độ di căn (giai đoạn M). Chi tiết về dữ liệu của các nhóm nghiên cứu và đặc điểm lâm sàng của nhóm bệnh và đối chứng được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm nghiên cứu của nhóm bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ và nhóm đối chứng.

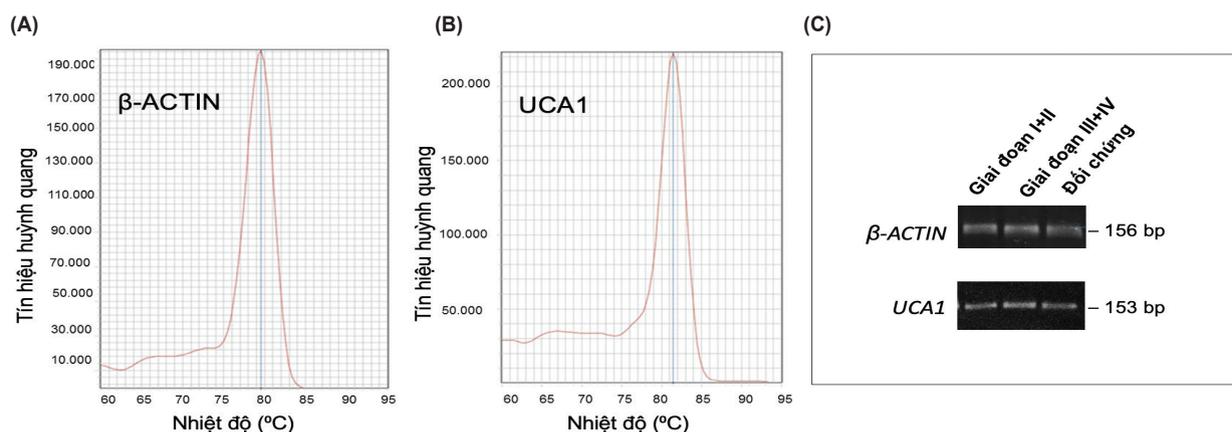
| Đặc điểm | Bệnh nhân UTPKTBN (n=29) | | Đối chứng (n=29) | | P |
|-----------------------|--------------------------|---------|------------------|---------|--------|
| | Số mẫu (n) | Tỷ lệ % | Số mẫu (n) | Tỷ lệ % | |
| Độ tuổi | | | | | |
| ≤60 tuổi | 12 | 41,38 | 14 | 48,28 | 0,5975 |
| >60 tuổi | 17 | 58,62 | 15 | 51,72 | |
| Giới tính | | | | | |
| Nam | 15 | 51,72 | 15 | 51,72 | >0,999 |
| Nữ | 14 | 48,28 | 14 | 48,28 | |
| Hút thuốc lá | | | | | |
| Có | 12 | 41,38 | 8 | 27,59 | 0,2692 |
| Không | 17 | 58,62 | 21 | 72,41 | |
| Uống rượu | | | | | |
| Có | 10 | 34,48 | 9 | 31,03 | 0,7797 |
| Không | 19 | 65,52 | 20 | 68,97 | |
| Kích thước u | | | | | |
| ≤3 cm | 13 | 44,83 | | | |
| >3 cm | 16 | 55,17 | | | |
| Giai đoạn bệnh | | | | | |
| I + II | 16 | 55,17 | | | |
| III + IV | 13 | 44,83 | | | |
| Giai đoạn T | | | | | |
| I + II | 16 | 55,17 | | | |
| III + IV | 13 | 44,83 | | | |
| Giai đoạn N | | | | | |
| N ₀ | 14 | 48,28 | | | |
| N _{1,3} | 15 | 51,72 | | | |
| Giai đoạn M | | | | | |
| M ₀ | 20 | 68,97 | | | |
| M ₁ | 9 | 31,03 | | | |

3.2. Biểu hiện của các RNA dài không ghi mã UCA1 trong exosome huyết tương của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ

Mức độ biểu hiện của UCA1 trong exosome huyết tương được xác định bằng phương pháp qPCR sử dụng SYBR Green. Để xác định vùng tuyến tính và giới hạn phát hiện của mẫu, phân tích qPCR được thực hiện với các nồng độ khác nhau của cDNA (mẫu gốc không pha loãng, pha loãng 10 và 100 lần). Kết quả cho thấy, nồng độ cDNA từ exosome huyết tương thích hợp cho phản ứng qPCR là 1 µl mẫu được pha loãng 100 lần.

Phân tích đường cong nóng chảy đã xác định được nhiệt độ nóng chảy của β-ACTIN và lncRNA UCA1 tương ứng là 79,29 và 81,16 (hình 1A, 1B). Bên cạnh đó, kết quả điện di các sản phẩm PCR trên gel agarose 3% cũng cho thấy các băng thu được sáng rõ nét, đặc hiệu, không có sản phẩm phụ (hình 1C). Điều này chứng tỏ các cặp mồi đã nhân bản đặc hiệu và có thể sử dụng trong PCR định lượng với SYBR Green.

Mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 so với β-ACTIN trong mẫu nghiên cứu được phân tích thống kê dựa vào các giá trị C_t thu được (bảng 3). Kết quả cho thấy, lncRNA UCA1 có biểu hiện giảm trong exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN so với nhóm đối chứng (p=0,05). Phân tích theo giai đoạn của bệnh cho thấy, lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn sớm (giai đoạn I + II) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng (p=0,052) trong khi ở giai đoạn muộn (III + IV) thì không có sự khác biệt (hình 2).

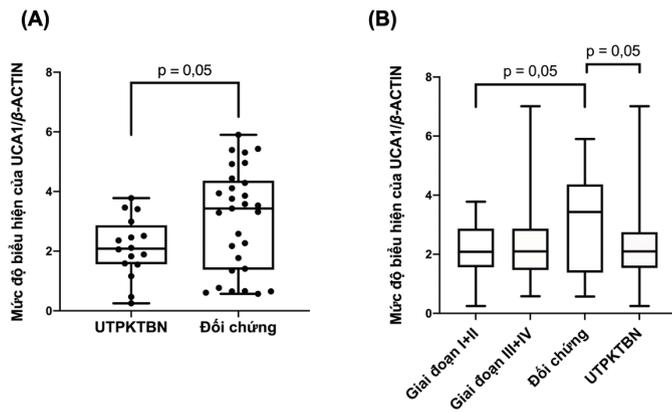


Hình 1. Đường biểu diễn nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm khuếch đại β-ACTIN (A) và các phân tử RNA dài không ghi mã UCA1 (B) bằng qPCR trong mẫu exosome huyết tương và kết quả điện di sản phẩm qPCR trên gel agarose 3% (C).

Bảng 3. Mức độ biểu hiện của các RNA dài không ghi mã UCA1 trong exosome huyết tương của các nhóm nghiên cứu.

| Nhóm nghiên cứu | Số lượng (n) | lncRNA UCA1 Me (25-75%) | P |
|------------------------|--------------------|-------------------------|-------|
| Nhóm đối chứng | 29 | 3,430 (1,380-4,365) | |
| Nhóm bệnh nhân UTPKTBN | Giai đoạn I + II | 2,085 (1,560-2,870) | 0,052 |
| | Giai đoạn III + IV | 2,100 (1,470-2,870) | 0,237 |
| | Giai đoạn I - IV | 2,100 (1,540-2,750) | 0,050 |

Trung vị (Me) và khoảng tứ phân vị 25-75%; p nhận được từ kiểm định Mann-Whitney U; giá trị p có ý nghĩa thống kê được in đậm.



Hình 2. Mức độ biểu hiện của các phân tử RNA dài không ghi mã UCA1 trong exosome huyết tương. (A) Biểu hiện của các phân tử RNA dài không ghi mã UCA1 của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ và đối chứng; (B) Biểu hiện của các phân tử RNA dài không ghi mã UCA1 của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn I + II, giai đoạn III + IV và nhóm đối chứng.

3.3. Mọi liên quan giữa biểu hiện của các phân tử RNA dài không ghi mã UCA1 trong exosome huyết tương với một số đặc điểm bệnh học của bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ

Mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN được phân tích theo các nhóm khác nhau về độ tuổi (≤ 60 và > 60 tuổi), giới tính (nam/nữ), tình trạng hút thuốc lá (có/không), tình trạng uống rượu (có/không), kích thước u (≤ 3 cm và > 3 cm), giai đoạn bệnh (giai đoạn I + II và III + IV), mức độ xâm lấn (giai đoạn $T_1 + T_2$ so với $T_3 + T_4$), mức độ hạch (giai đoạn N_0 so với N_{1-3}) và mức độ di căn của khối u (giai đoạn M_0 so với M_1). Sử dụng giá trị trung vị mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 để chia thành 2 nhóm: nhóm có mức độ biểu hiện thấp (có giá trị thấp hơn trung vị) và nhóm có mức độ biểu hiện cao (có giá trị cao hơn trung vị). Kết quả phân tích cho thấy, mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN không phụ thuộc vào các đặc điểm bệnh học của bệnh UTPKTBN (bảng 4).

Bảng 4. Mọi liên quan giữa mức độ biểu hiện của các RNA dài không ghi mã UCA1 trong exosome huyết tương với một số đặc điểm bệnh học của bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ.

| Đặc điểm | Số mẫu (n, %) | Biểu hiện thấp (dưới trung vị) | Biểu hiện cao (trên trung vị) | P | |
|----------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|------------|
| Tuổi | ≤ 60 tuổi | 12 (41,4%) | 6 (50%) | 0,876 ^a | |
| | > 60 tuổi | 17 (58,6%) | 8 (47,1%) | | 9 (52,9%) |
| Giới | Nam | 15 (51,7%) | 7 (46,7%) | 0,858 ^a | |
| | Nữ | 14 (48,3%) | 7 (50%) | | 7 (50%) |
| Hút thuốc lá | Có | 12 (41,4%) | 5 (41,7%) | 0,55 ^a | |
| | Không | 17 (58,6%) | 9 (52,9%) | | 8 (47,1%) |
| Uống rượu | Có | 10 (34,5%) | 5 (50%) | 1 ^b | |
| | Không | 19 (65,5%) | 9 (47,4%) | | 10 (52,6%) |
| Kích thước u | ≤ 3 cm | 13 (46,4%) | 5 (38,5%) | 0,256 ^a | |
| | > 3 cm | 15 (53,6%) | 9 (60%) | | 6 (40%) |
| Giai đoạn bệnh | I + II | 16 (55,2%) | 8 (50%) | 0,837 ^a | |
| | III + IV | 13 (44,8%) | 6 (46,2%) | | 7 (53,8%) |
| | T ₁ + T ₂ | 15 (51,7%) | 8 (53,3%) | | 7 (46,7%) |
| Giai đoạn T | T ₃ + T ₄ | 14 (48,3%) | 6 (42,9%) | 0,573 ^a | |
| | T ₁ + T ₂ | 15 (51,7%) | 8 (53,3%) | | 7 (46,7%) |
| Giai đoạn N | N ₀ | 14 (48,3%) | 8 (57,1%) | 0,356 ^a | |
| | N ₁₋₃ | 15 (51,7%) | 6 (40,0%) | | 9 (60%) |
| | M ₀ | 20 (69%) | 9 (45%) | | 11 (55%) |
| Giai đoạn M | M ₁ | 9 (31%) | 5 (55,6%) | 0,7 ^b | |
| | M ₀ | 20 (69%) | 9 (45%) | | 11 (55%) |

p nhận được từ kiểm định Chi bình phương (a) và kiểm định Fisher (b).

Tế bào ung thư sử dụng nhiều cơ chế giao tiếp giữa các tế bào khác nhau để có thể thích nghi với điều kiện môi trường nội bào, kiểm soát hệ thống miễn dịch và tạo điều kiện thuận lợi cho tế bào ung thư di căn. Việc giải phóng ra các exosome là một cơ chế giao tiếp tế bào mới đã được công bố trong những năm gần đây [21]. Exosome có thể chứa nhiều dạng phân tử khác nhau như các protein, DNA, mRNA, miRNA và các lncRNA đặc trưng của tế bào tiết ra và nhập với tế bào nhận, do đó có thể trao đổi được thông tin di truyền và ngoại di truyền giữa các tế bào nằm cách xa nhau. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng, các phân tử lncRNA do tế bào ung thư tiết ra có vai trò quan trọng và có thể truyền đến các tế bào lân cận khả năng kháng thuốc hoặc thúc đẩy sự tạo thành mạch mới, kích thích sự phát triển của khối u [21, 22].

LncRNA UCA1 là phân tử RNA dài không ghi mã được phát hiện đầu tiên năm 2006 ở ung thư bàng quang và được coi là chỉ thị cho quá trình xâm lấn và di căn xa của tế bào ung thư [23]. Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy lncRNA UCA1 bị rối loạn điều hòa trong mô ung thư, trong hầu hết các trường hợp UCA1 có biểu hiện tăng trong mô ung thư so với mô lành liền kề của bệnh nhân, do đó tham gia vào tiến triển ác tính của nhiều dạng ung thư như ung thư bàng quang, ung thư vú, ung thư đại trực tràng, ung thư phổi... [15]. Đối với UTPKTBN, lncRNA UCA1 được cho là có vai trò thúc đẩy di căn và là một yếu tố tiên lượng cho sự sống cho bệnh nhân ở giai đoạn I [15]. Mặc dù vậy, biểu hiện và mối liên quan của lncRNA UCA1 với các đặc điểm bệnh học của UTPKTBN, cũng như biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương do tế bào ung thư tiết ra vẫn chưa được hiểu biết đầy đủ và cần phải tiếp tục được nghiên cứu.

Trong nghiên cứu của H.M. Wang và cs (2015) [18] trên 60 cặp mô UTPKTBN và mô liền kề không ung thư trên đối tượng bệnh nhân Trung Quốc cho thấy sự biểu hiện của lncRNA UCA1 trong các mô ung thư cao hơn so với các mô không ung thư lân cận ($p < 0,001$) và mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 có liên quan với độ mô học của khối u ($p < 0,001$) và giai đoạn TNM ($p < 0,001$). Kết quả cho thấy, không có mối liên quan giữa biểu hiện của lncRNA UCA1 với độ tuổi, giới tính hoặc kích thước khối u. Các bệnh nhân có biểu hiện lncRNA UCA1 cao hơn thì có tiên lượng sống kém hơn so với các bệnh nhân có lncRNA UCA1 biểu hiện ở mức độ thấp. lncRNA UCA1 cũng được biểu hiện tăng trong mẫu huyết tương của bệnh nhân và có mối tương quan chặt với biểu hiện của lncRNA UCA1 trong mẫu mô ung thư. Tương tự, nghiên cứu của W. Nie và cs (2016) [19] trên 112 cặp mẫu mô ung thư và mô liền kề nhóm bệnh nhân Trung Quốc cũng cho thấy biểu hiện tăng cao của lncRNA UCA1 ở mô u so với các mô bình thường liền kề ($p < 0,001$). Khác với nghiên cứu của H.M. Wang và cs (2015) [18], nghiên cứu này cho thấy biểu hiện cao của lncRNA UCA1 tương quan đáng kể với kích thước khối u ($p = 0,011$) và giai đoạn TNM ($p = 0,042$). Bên cạnh đó, X. Chen và cs (2020) [24] khi nghiên cứu trên 86 cặp mẫu mô ung thư, mô bình thường liền kề và 86 mẫu huyết tương của cùng bệnh nhân UTPKTBN người Trung Quốc cũng cho thấy lncRNA UCA1 được biểu hiện tăng trong mô ung thư so với mô bình thường liền kề. Biểu hiện tăng của lncRNA UCA1 có liên quan với kích thước khối u ($p = 0,001$) và giai đoạn TNM ($p = 0,003$) và cho tiên lượng xấu đối với bệnh nhân UTPKTBN. Nghiên cứu này chỉ ra rằng, lncRNA UCA1 là một đích tác động điều trị có tiềm năng đối với UTPKTBN.

Liên quan đến biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương của bệnh UTPKTBN, cho đến nay mới chỉ có một số ít nghiên cứu đã được công bố. Nghiên cứu của X. Chen và cs (2020) [24] phát hiện thấy lncRNA UCA1 tăng biểu hiện trong nhóm bệnh nhân UTPKTBN được chẩn đoán kháng gefitinib so với nhóm dung nạp gefitinib ($p < 0,001$) và biểu hiện tăng trong cả exosome do các dòng tế bào kháng gefitinib tiết ra. lncRNA UCA1 được chứng minh ức chế biểu hiện của miR-143, do đó có thể thúc đẩy tăng sinh và chống lại chết theo chu trình của tế bào cảm ứng bởi gefitinib [24, 25]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, lncRNA UCA1 biểu hiện giảm trong exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN, đặc biệt là bệnh nhân giai đoạn sớm I + II. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của C. Barbagallo và cs (2018) [12] trên đối tượng bệnh nhân ung thư đại trực tràng cũng cho thấy lncRNA UCA1 có biểu hiện giảm trong exosome tách từ huyết tương của bệnh nhân.

Lý giải cho biểu hiện giảm của các lncRNA trong exosome của bệnh nhân so với nhóm đối chứng mặc dù được coi là có vai trò quan trọng trong thúc đẩy di căn và tiến triển của khối u, nghiên cứu của G.M.G.E. Din và cs (2022) [26] về biểu hiện của lncRNA RP11-510M2.10 trong exosome cũng thấy có biểu hiện giảm trong nhóm bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, lại có sự tăng có ý nghĩa thống kê về mức độ biểu hiện của phân tử mRNA RAB27A trên nhóm bệnh nhân này. Điều này cho thấy tác động âm của phân tử lncRNA đến biểu hiện của mRNA đích, thông qua bắt cặp với mRNA đích, hoặc có thể hoạt động như một RNA cạnh tranh nội sinh và tương tác nội sinh với các phân tử miRNA. Giả thuyết khác là lncRNA này có thể ức chế biểu hiện của mRNA bằng cách gắn với các yếu tố phiên mã và RNA polymerase, hoặc hoạt động như tiền chất của miRNA và gây phân hủy mRNA. Do đó, biểu hiện tăng của lncRNA RP11-510M2.10 trong nhóm đối chứng có thể liên quan đến vai trò ức chế biểu hiện của mRNA RAB27A, do đó thúc đẩy quá trình tiết của exosome [26]. Điều này cho thấy các lncRNA được đóng gói chọn lọc vào trong exosome và có thể tác động hiệu quả đến các tế bào nhận cũng như quá trình phát sinh ung thư [13]. Tuy nhiên, các cơ chế sinh học chính xác và các con đường liên quan đến giải phóng lncRNA từ các tế bào ung thư vào tuần hoàn và trong exosome vẫn còn chưa được làm sáng tỏ.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương của bệnh nhân UTPKTBN giảm so với đối chứng ($p = 0,05$), đặc biệt là giảm ở giai đoạn sớm I + II so với nhóm đối chứng. Không có mối liên quan giữa mức độ biểu hiện của lncRNA UCA1 trong

exosome huyết tương với tuổi và một số đặc điểm bệnh học như kích thước u, độ mô học, mức độ xâm lấn, mức độ hạch ở bệnh nhân UTPKTBN. Nghiên cứu đã cung cấp các số liệu ban đầu về biểu hiện của lncRNA UCA1 trong exosome huyết tương ở bệnh nhân UTPKTBN người Việt Nam làm tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về lncRNA trên nhóm bệnh nhân này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Đại học Quốc gia Hà Nội mã số QG.22.02. Các tác giả trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.E. Kornienko, P.M. Guenzl, D.P. Barlow, et al. (2013), "Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription", *BMC Biol.*, **11**, DOI: 10.1186/1741-7007-11-59.
- [2] J. Cao (2014), "The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics", *Biol. Proced. Online*, **16**, DOI: 10.1186/1480-9222-16-11.
- [3] I.V. Novikova, S.P. Hennelly, K.Y. Sanbonmatsu (2013), "Tackling structures of long noncoding RNAs", *Int. J. Mol. Sci.*, **14**(12), pp.23672-23684, DOI: 10.3390/ijms141223672.
- [4] S.W. Cheatham, F. Gruhl, J.S. Mattick, et al. (2013), "Long noncoding RNAs and the genetics of cancer", *Br. J. Cancer*, **108**(12), pp.2419-2425, DOI: 10.1038/bjc.2013.233.
- [5] H. Yu, Q. Xu, F. Liu, et al. (2015), "Identification and validation of long noncoding RNA biomarkers in human non-small-cell lung carcinomas", *J. Thorac. Oncol.*, **10**(4), pp.645-654, DOI: 10.1097/JTO.0000000000000470.
- [6] L.H. Schmidt, T. Spieker, S. Koschmieder, et al. (2011), "The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth", *J. Thorac. Oncol.*, **6**(12), pp.1984-1992, DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182307eac.
- [7] F. Wu, Z. Yin, L. Yang, et al. (2019), "Smoking induced extracellular vesicles release and their distinct properties in non-small cell lung cancer", *J. Cancer*, **10**(15), pp.3435-3443, DOI: 10.7150/jca.30425.
- [8] G. Raposo, W. Stoorvogel (2013), "Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends", *J. Cell Biol.*, **200**(4), pp.373-383, DOI: 10.1083/jcb.201211138.
- [9] S. Keerthikumar, D. Chisanga, D. Ariyaratne, et al. (2016), "ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo", *J. Mol. Biol.*, **428**(4), pp.688-692, DOI: 10.1016/j.jmb.2015.09.019.
- [10] M. Pathan, P. Fonseka, S.V. Chitti, et al. (2019), "Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles", *Nucleic Acids Res.*, **47**(D1), pp.D516-D519, DOI: 10.1093/nar/gky1029.
- [11] U. Gezer, E. Özgür, M. Cetinkaya, et al. (2014), "Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes", *Cell Biol. Int.*, **38**(9), pp.1076-1079, DOI: 10.1002/cbin.10301.
- [12] C. Barbagallo, D. Brex, A. Caponnetto, et al. (2018), "LncRNA UCA1, upregulated in CRC biopsies and downregulated in serum exosomes, controls mRNA expression by RNA-RNA interactions", *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **12**, pp.229-241, DOI: 10.1016/j.omtn.2018.05.009.
- [13] W. Zhao, Y. Liu, C. Zhang, et al. (2019), "Multiple roles of exosomal long noncoding RNAs in cancers", *Biomed Res. Int.*, **2019**, DOI: 10.1155/2019/1460572.
- [14] H. Wang, Z. Guan, K. He, et al. (2017), "LncRNA UCA1 in anti-cancer drug resistance", *Oncotarget*, **8**(38), pp.64638-64650, DOI: 10.18632/oncotarget.18344.
- [15] F. Li, C.P. Hu (2015), "Long non-coding RNA urothelial carcinoma associated 1 (UCA1): Insight into its role in human diseases", *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **25**(3), pp.191-197, DOI: 10.1615/critrev-eukaryotgeneexpr.2015013770.
- [16] M. Xue, W. Chen, X. Li (2016), "Urothelial cancer associated 1: A long noncoding RNA with a crucial role in cancer", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **142**(7), pp.1407-1419, DOI: 10.1007/s00432-015-2042-y.
- [17] X. Wang, F. Peng, L. Cheng, et al. (2017), "Prognostic and clinicopathological role of long non-coding RNA UCA1 in various carcinomas", *Oncotarget*, **8**(17), pp.28373-28384, DOI: 10.18632/oncotarget.16059.
- [18] H.M. Wang, J.H. Lu, W.Y. Chen, et al. (2015), "Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of lung cancer and is closely related to clinical diagnosis as a predictive biomarker in plasma", *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **8**(7), pp.11824-11830.
- [19] W. Nie, H.J. Ge, X.Q. Yang, et al. (2016), "LncRNA-UCA1 exerts oncogenic functions in non-small cell lung cancer by targeting miR-193a-3p", *Cancer Lett.*, **371**(1), pp.99-106, DOI: 10.1016/j.canlet.2015.11.024.
- [20] K.J. Livak, T.D. Schmittgen (2001), "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(delta delta C(T)) method", *Methods*, **25**(4), pp.402-408, DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [21] M. Dragomir, B. Chen, G.A. Calin (2018), "Exosomal lncRNAs as new players in cell-to-cell communication", *Transl. Cancer Res.*, **7**, Suppl 2, pp.S243-S252, DOI: 10.21037/tcr.2017.10.46.
- [22] D. Kołat, R. Hammouz, A.K. Bednarek, et al. (2019), "Exosomes as carriers transporting long non-coding RNAs: Molecular characteristics and their function in cancer", *Mol. Med. Rep.*, **20**(2), pp.851-862, DOI: 10.3892/mmr.2019.10340.
- [23] X.S. Wang, Z. Zhang, H.C. Wang, et al. (2006), "Rapid identification of UCA1 as a very sensitive and specific unique marker for human bladder carcinoma", *Clin. Cancer Res.*, **12**(16), pp.4851-4858, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0134.
- [24] X. Chen, Z. Wang, F. Tong, et al. (2020), "LncRNA UCA1 promotes gefitinib resistance as a ceRNA to target FOSL2 by sponging miR-143 in non-small cell lung cancer", *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **19**, pp.643-653, DOI: 10.1016/j.omtn.2019.10.047.
- [25] C. Poulet, M.S. Njock, C. Moermans, et al. (2020), "Exosomal long non-coding RNAs in lung diseases", *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(10), DOI: 10.3390/ijms21103580.
- [26] G.M.G.E. Din, F.K. Ibrahim, H.H. Shehata, et al. (2022), "Exosomal expression of RAB27A and its related lncRNA lnc-RNA-RP11-510M2 in lung cancer", *Arch. Physiol. Biochem.*, **128**(6), pp.1479-1485, DOI: 10.1080/13813455.2020.1778036.