ĐA HÌNH THÁI ĐƠN NUCLEOTIDE RS1049174 CỦA GEN NKG2D TRÊN BỆNH NHÂN U LYMPHO

Nguyễn Thị Hồng Minh[1], Vũ Thị Lan[1], Vũ Hồng Nhung[2], Nguyễn Tuấn Tùng[3] và Nguyễn Hoàng Việt[1,✉]

[1]Trường Đại học Y Hà Nội, [2]Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQGHN, [3]Trung tâm Huyết học và Truyền máu – Bệnh viện Bạch Mai.

NKG2D là một thụ thể quan trọng nhất trên bề mặt tế bào NK, đóng vai trò trong việc tiêu diệt tế bào nhiễm virus và ung thư nhờ sự tiếp hợp với những phối tử đặc hiệu trên bề mặt tế bào đích. Nghiên cứu trước đã chứng minh vai trò của đa hình đơn rs1049174 tại vị trí 3'UTR của gen NKG2D trong các dạng ung thư nhiễm HPV. Mục tiêu nghiên cứu nhằm xác định sự phân bố của đa hình đơn này trong nhóm u lympho so với đối tượng khỏe mạnh. 129 bệnh nhân mắc u lympho và 178 người khỏe mạnh được thu thập mẫu máu. Sử dụng kỹ thuật PCR – RFLP và Real – time PCR để phân tích sự biến đổi đa hình này. Dạng alen G so với alen C: OR = 0,67; 95% CI: 0,48 – 0,93. Kiểu gen GG so với GC + CC: OR = 0,56; 95% CI: 0,34 – 0,94. Alen G và kiểu gen GG của SNP rs1049174 liên quan đến sự giảm nguy cơ u lympho nhưng không liên quan đến nguy cơ NHL và DLBCL.

Từ khóa: U lympho, đa hình đơn rs1049174G, gen NKG2D

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Năm 2018, có khoảng 590 nghìn ca u lympho mắc mới (chiếm 3,2% tổng các trường hợp ung thư). Trong đó tỷ lệ mới mắc u lympho không Hodgkin (NHL) cao gấp 6,4 lần u lympho Hodgkin (HL), là nguyên nhân thứ mười một gây tử vong do ung thư và là bệnh ung thư phổ biến thứ chín trên toàn thế giới.[1] U lympho thường phổ biến hơn ở các nước phát triển và ít phổ biến hơn ở các nước đang phát triển. Tỷ lệ mắc bệnh u lympho nói chung ở các nước châu Á là tương đối thấp.[2,3,4] U lympho Hodgkin đã được báo cáo là hiếm ở các nước châu Á.[4] Tuy nhiên, tỷ lệ mắc u lympho không Hodgkin trên toàn thế giới đang tăng lên. Các nước Đông Á hiện nay cũng có tỷ lệ mắc ngày càng tăng.[3] Ở Việt Nam, theo thống kê của Tổ chức Ung thư toàn cầu GLOBOCAN năm 2018 có 4239 ca mới mắc u lympho, 2476 người tử vong do bệnh này và con số này đang có xu hướng gia tăng. Nguyên nhân của u lympho bao gồm các tác nhân truyền nhiễm, suy giảm miễn dịch, bệnh tự miễn, yếu tố di truyền, tiếp xúc với một số hóa chất hữu cơ và dược phẩm.

Phân tử NKG2D là một protein xuyên màng typ II họ lectin, mang cả hai chức năng là thụ thể hoạt hoá của tế bào NK và đồng kích thích của tế bào T CD8+, được biểu hiện trên tế bào NK và tế bào γδT cũng như tế bào T CD8+.[5] Liên kết của thụ thể NKG2D trên tế bào NK với phối tử của nó sẽ kích hoạt quá trình sản xuất các yếu tố gây độc qua trung gian tế bào và đồng thời kích thích sản xuất các cytokine dù cho tế bào đích có biểu hiện HLA lớp I bình thường hay không, từ đó tiêu diệt tế bào nhiễm vi rút và các khối u.[6] Đa hình rs1049174 G > C nằm ở vùng 3′ không mã hóa (3′UTR) của gen NKG2D, các haplotype của nó có liên quan đến hoạt động cao của tế bào NK (HNK) hoặc hoạt động thấp (LNK). Kiểu hình HNK được thấy

Tác giả liên hệ: Nguyễn Hoàng Việt,
Trường Đại học Y Hà Nội
Email: hoangviet@hmu.edu.vn
Ngày nhận: 14/12/2019
Ngày được chấp nhận: 17/03/2020

trong các cá thể mang alen rs1049174 G, trong khi đó LNK được thấy trong các cá thể mang alen C.[7] Do đó, biểu hiện của NKG2D có thể có những tác động khác biệt trong sự nhạy cảm đối với các dạng ung thư dòng lympho.

Mục đích của nghiên cứu này là tìm hiểu mối liên quan giữa đa hình rs1049174 của gen NKG2D và nguy cơ mắc u lympho ở bệnh nhân Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu gồm 129 bệnh nhân đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn được chẩn đoán xác định giải phẫu bệnh là u lympho chung bao gồm u lympho Hodgkin và u lympho không Hodgkin (NHL) tại Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương và Bệnh viện Bạch Mai. Trong đó có 112 bệnh nhân mắc NHL, trong số này lại có 42 bệnh nhân mắc u lympho dạng tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL). Nhóm chứng gồm 178 người khỏe mạnh không có các yếu tố nguy cơ mắc u lympho khác. Nhóm chứng được lựa chọn có sự tương đồng về tuổi và giới với nhóm bệnh. Nhóm chứng là những người khỏe mạnh tình nguyện tham gia nghiên cứu, được thu thập mẫu tại Khoa Kỹ thuật Y học – Trường Đại học Y Hà Nội. Loại trừ những người không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2. Phương pháp

Nghiên cứu bệnh chứng chọn mẫu thuận tiện. Nghiên cứu này quan tâm đến tuổi, giới, kiểu gen, kiểu alen của đối tượng nghiên cứu, được tiến hành từ tháng 4/2019 đến tháng 11/2019 ở Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương và Trung tâm Huyết học – Truyền máu, Bệnh viện Bạch Mai.

Quy trình kỹ thuật bắt đầu từ thu thập 2ml máu ngoại vi của các đối tượng nghiên cứu vào ống chống đông EDTA. DNA tổng số được tách chiết từ 300 µl máu toàn phần theo kit của QIAGEN, sau đó xác định kiểu gen sử dụng kỹ thuật Real – time PCR Genotyping: Pha loãng DNA để được nồng độ khoảng 20 ng/µl. Thành phần phản ứng Real – time PCR (thể tích 10 µl) bao gồm: 5 µl Taqman Genotyping Master Mix (cung cấp bởi Thermoscientific, 4371353); 0,5 µl 20x Probe primers (cung cấp bởi Thermoscientific, C_9345347_10); 4,5 µl DNA đã pha loãng. Sau đó thực hiện phản ứng Real – time PCR trên máy QuantStudio3 được cung cấp bởi Applied Biosystems với chu trình nhiệt bao gồm: 60ºC/30 giây, 95 ºC/10 phút, [95ºC/15 giây, 60ºC/ 1 phút] x 40 chu kỳ và dừng phản ứng tại 60 ºC/30 giây. Phản ứng sử dụng 2 kênh tín hiệu là VIC/FAM tương ứng với 2 nucleotide C và G. Khi thu được chỉ tín hiệu VIC – kiểu gen tương ứng là CC, chỉ tín hiệu FAM - GG, cả 2 tín hiệu VIC/FAM – GC. Toàn bộ quá trình thực hiện và phân tích kết quả được giám sát bởi các kỹ thuật viên giàu kinh nghiệm trong phòng thí nghiệm.

Kỹ thuật PCR – RFLP (PCR – Restrict Fragment Length Polymophism) để kiểm tra, đối chứng với kết quả kiểu gen từ kỹ thuật Real – time PCR: Vùng gen rs1049174 của gen NKG2D được khuếch đại sử dụng cặp mồi đặc hiệu:

Mồi xuôi:

5’ – TTAAGGCTGGAGAATAATGC – 3’

Mồi ngược:

5’ – TCAGTGAAGGAAGAGAAGG – 3’

Thành phần phản ứng PCR (thể tích 10 µl) bao gồm: 0,5 µl mồi xuôi (10 pmol/µl), 0,5 µl mồi ngược (10 pmol/µl), 5 µl GoldTaq mastermix 2X, 1 µl DNA, 3 µl DW. Chu trình nhiệt của phản ứng: [95ºC/30 giây, 57ºC/45 giây, 72ºC/45 giây] × 37 chu kỳ. Điện di trên gel agarose 1,5%, 120V/25 phút. Xác định đa hình rs1049174 của gen NKG2D bằng kỹ thuật enzyme cắt giới hạn sử dụng enzyme Dde1. Phản ứng cắt được ủ ở 37°C/12 giờ, sau đó điện di trên gel agarose

3% với điện thế 80V/60 phút và chụp ảnh bằng hệ thống máy BioRad. Enzyme cắt giới hạn đã cắt các đoạn gen đã được khuếch đại thành các đoạn DNA có kích thước: 230 bp, 191 bp, 39 bp.

Xử lý số liệu sử dụng phần mềm GraphPad Prism v8. Kiểm định χ^2 để so sánh tỉ lệ giới,kiểu gen, alen của nhóm bệnh và nhóm chứng, student's t-test để so sánh tuổi của các nhóm trên. Để ước tính mối liên quan giữa các kiểu gen, alen và khả năng mắc u lympho dùng tỉ suất OR với khoảng tin cậy 95%.

3. Đạo đức nghiên cứu

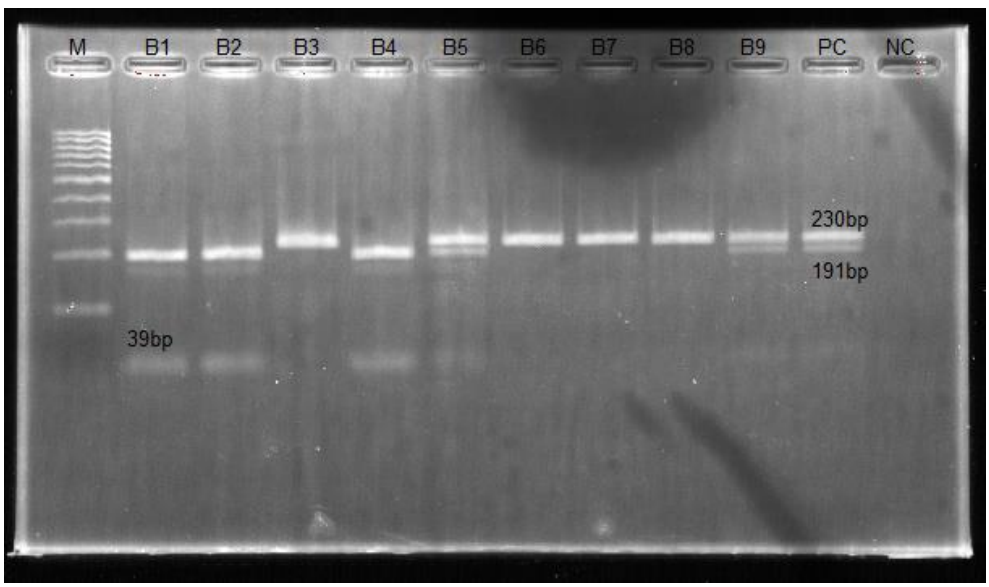
Nghiên cứu này đã được chấp thuận bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học của Trường Đại học Y Hà Nội số 26/HMUIRB ngày 01/07/2019.

III. KẾT QUẢ

Bảng 1. Đặc điểm chung của các nhóm đối tượng tham gia nghiên cứu

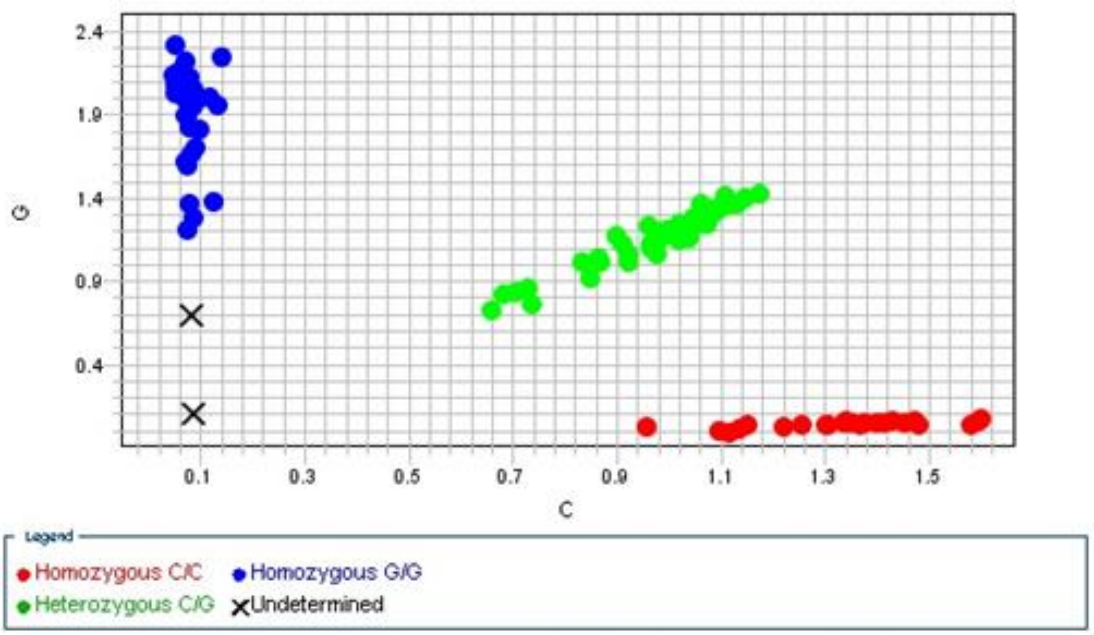
		Nhóm bệnh (n = 129)		Nhóm chứng (n = 178)		p
		n	%	n	%	
Giới	Nam	82	63,57	112	62,92	0,91
	Nữ	47	36,43	66	37,8	
Tuổi		51,2 ± 16,0		49,8 ± 15,4		0,44

Kết quả cho thấy sự tương đồng về giới tính (p = 0,91) và tuổi (p = 0,44) giữa nhóm bệnh và nhóm chứng.



Hình 1. Điện di sản phẩm cắt bởi enzyme Dde I

M: Thang DNA chuẩn 100bp, B1 đến B9: Mẫu bệnh nhân u lympho, PC: chứng dương, NC: chứng âm. Mẫu B3, B6, B7, B8 có kiểu gen CC (đoạn DNA kích thước 230 bp). Mẫu B1, B2, B4 có kiểu gen GG (các đoạn DNA có kích thước 191 bp và 39 bp). Mẫu B5, B9 có kiểu gen GC (các đoạn DNA có kích thước 230 bp, 191 bp, 39 bp).



Hình 2. Kiểu gen của gen NKG2D tại vị trí rs1049174 ở nhóm bệnh nhân u lympho xác định bằng phương pháp Real – time PCR

Các mẫu nghiên cứu được thực hiện bởi phản ứng Real-time PCR. Kết quả những mẫu có kiểu gen đồng hợp GG được hiển thị bằng những điểm có màu đen , những mẫu có kiểu gen đồng hợp CC được biểu thị những điểm có màu ghi đậm, còn những mẫu có kiểu gen dị hợp GC được biểu diễn bởi những điểm màu ghi nhạt như trên hình.

Bảng 2. Phân bố kiểu gen và alen rs1049174 của đối tượng nghiên cứu

	Nhóm bệnh n (%)	**Nhóm NHL n (%)**	**Nhóm DLBCL n (%)**	**Nhóm chứng n (%)**	**Nhóm bệnh với nhóm chứng**		**Nhóm NHL với nhóm chứng**		**Nhóm DLBCL với nhóm chứng**	
					p	**OR (95% CI)**	**p**	**OR (95% CI)**	**p**	**OR (95% CI)**
GG	31 (24,03)	29 (25,89)	10 (23,81)	64 (35,96)	**0,033**	**0,56 (0,34 – 0,94)**	0,09	0,62 (0,37 – 1,04)	0,15	0,55 (0,27 – 1,19)
CC	36 (27,91)	27 (24,11)	12 (28,57)	36 (20,22)	0,13		0,47		0,29	
GC	62 (48,06)	56 (50,00)	20 (47,62)	78 (43,82)	0,49		0,33		0,73	

	Nhóm bệnh n (%)	Nhóm NHL n (%)	Nhóm DLBCL n (%)	Nhóm chứng n (%)	Nhóm bệnh với nhóm chứng		Nhóm NHL với nhóm chứng		Nhóm DLBCL với nhóm chứng	
					p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)
Alen										
G	124 (48,06)	114 (50,89)	40 (47,62)	206 (57,87)	**0,016**	**0,67 (0,48 – 0,93)**	0,10	0,75 (0,54 – 1,06)	0,09	0,66 (0,41 – 1,07)
C	134 (51,94)	110 (49,11)	44 (52,38)	150 (42,13)						

NHL: u lympho không Hodgkin

DLBCL: u lympho dạng tế bào B lớn lan tỏa

Bảng 2 cho thấy so sánh nhóm u lympho với nhóm chứng, kiểu gen GG so với CC + GC có OR = 0,56; 95% CI: 0,34 – 0,94; alen G so với C có OR = 0,67; 95% CI: 0,48 – 0,93. So sánh nhóm NHL với nhóm chứng thì GG so với CC + GC có OR = 0,62; 95% CI: 0,37 – 1,04; G so với C có OR = 0,75; 95% CI: 0,54 – 1,06 còn so sánh nhóm DLBCL với nhóm chứng, kiểu gen GG so với CC + GC có OR = 0,55; 95% CI: 0,27 – 1,19; G so với C có OR = 0,66; 95% CI: 0,41 – 1,07. Phân tích cho thấy giữa nhóm bệnh và nhóm chứng có sự khác biệt về kiểu gen GG và sự khác biệt về alen. Nhóm NHL và nhóm chứng, nhóm DLBCL và nhóm chứng không có khác biệt về kiểu gen, alen. Kiểu gen GG cũng như alen G liên quan đến sự giảm nguy cơ u lympho nhưng không thấy có mối liên quan với nguy cơ mắc NHL, DLBCL.

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này nam giới mắc bệnh nhiều hơn nữ giới với tỉ lệ 1,7/1. Chưa có nghiên cứu nào về mối liên quan giữa đa hình rs1049174 và u lympho trước đó. Trong nghiên cứu này không có sự khác biệt các kiểu gen giữa từng nhóm bệnh, nhóm NHL, nhóm DLBCL so với nhóm chứng. So sánh khả năng mắc bệnh của kiểu gen GG và các kiểu gen còn lại đã phát hiện được mối liên quan giữa kiểu gen GG với giảm nguy cơ mắc u lympho (kiểu gen GG so với CC + GC có OR = 0,56; 95% CI: 0,34 – 0,94; p = 0,033), alen G liên quan đến sự giảm nguy cơ u lympho (G so với C có OR = 0,67; 95% CI: 0,48 – 0,93; p = 0,016), tuy nhiên không có mối liên quan giữa đa hình rs1049174 và nguy cơ mắc NHL, DLBCL.

Đã có những nghiên cứu về mối liên quan giữa các đa hình thái đơn với u lympho. Người mang kiểu gen r*s1042752CC* của gen *POU2AF1* có nguy cơ mắc u lympho cao hơn so với kiểu gen TT, ngay cả trong phân tích phân loại cho u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào T, u lympho tế bào B, u lympho Hodgkin thì kiểu gen CC vẫn có nguy cơ mắc cao hơn kiểu gen TT.[8] Một số SNP có liên quan đến việc tăng nguy cơ NHL chung: IL-10 (rs1800893 T > C), IL-1RN (rs4251961 C > T), TNF- α (rs1800630 A > C) và TNF- α (rs 2229094 G>A). Những SNP này cũng có liên quan đến việc tăng nguy cơ DLBCL.[9]

Đa hình thái rs1049174 của gen *NKG2D* cũng có liên quan đến một số bệnh ung thư. Theo nghiên cứu của Furue và cộng sự trên người Nhật cho thấy: người có kiểu gen GG làm giảm nguy cơ ung thư đại trực tràng (OR = 0,48; 95% CI: 0,32 – 0,72).[10] Tuy nhiên kết quả của chúng tôi khác với một nghiên cứu tại Xianyou – Trung Quốc. Nghiên cứu này chỉ ra những người mang kiểu gen rs1049174 GG có tỷ lệ mắc ung thư dạ dày cao hơn (OR = 1,85; 95% CI: 1,02 – 3,38).[11] Điều này có thể được giải thích là do sự nhạy cảm khác nhau của gen với các bệnh khác nhau.

Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy rằng alen G SNP rs1049174 của NKG2D liên quan với giảm nguy cơ u lympho. Điều này gợi ý rằng đa hình đơn rs1049174 có thể xem như một dấu ấn cho việc chẩn đoán và sàng lọc cho bệnh nhân với nguy cơ u lympho.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được đa hình đơn nucleotide rs1049174 của gen NKG2D ở hai nhóm bệnh nhân u lympho và nhóm chứng. Các phân tích dữ liệu chỉ ra mối liên quan giữa alen G đa hình đơn rs1049174 của gen NKG2D với giảm nguy cơ mắc u lympho.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Bệnh viện Bạch Mai, Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương, Trường Đại học Y Hà Nội. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ NAFOSTED trong đề tài mã số 108.02 – 2018.312.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492.

2. Huh J. Epidemiologic overview of malignant lymphoma. *Korean J Hematol.* 2012;47(2):92-104. doi:10.5045/kjh.2012.47.2.92.

3. Tan D, Tan SY, Lim ST, et al. Management of B-cell non-Hodgkin lymphoma in Asia: resource-stratified guidelines.*Lancet Oncol.* 2013;14(12):548-561. doi:10.1016/s1470-2045(13)70450-9.

4. Mozaheb Z. Epidemiology of hodgkin's lymphoma. *Health.* 2013;5:17-22. doi:10.4236/health.2013.55A003.

5. Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, et al. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res.* 2008;40(1):18-34. doi:10.1007/s12026-007-0060-9.

6. Gonzalez S, Lopez-Soto A, Suarez-Alvarez B, et al. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol.* 2008;29(8):397-403. doi:10.1016/j.it.2008.04.007.

7. Asadi-Saghandi A, Shams A, Eslami G, et al. Peginterferon Alfa-2a/Ribavirin treatment efficacy in chronic hepatitis C patients is related to natural killer group 2D gene rs1049174 GC polymorphism. *Virusdisease.* 2016;27(4):369-374. doi:10.1007/s13337-016-0349-1.

8. Zhai K, Chang J, Hu J, et al. Germline variation in the 3'-untranslated region of the POU2AF1 gene is associated with susceptibility to lymphoma. *Mol Carcinog.* 2017;56(8):1945-1952. doi:10.1002/mc.22652.

9. Ye X, Zhao K, Wu C, et al. Associations between genetic variants in immunoregulatory genes and risk of non-Hodgkin lymphoma in a Chinese population. *Oncotarget.* 2017;8(6):10450-10457. doi:10.18632/oncotarget.14426.

10. Furue H, Matsuo K, Kumimoto H, et al. Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype

in Japanese. *Carcinogenesis.* 2008;29(2):316-320. doi:10.1093/carcin/bgm260.

11. Zheng W, Li H, Liu B, et al. Association between the SNPs in trace element-related metabolic genes and the risk of gastric cancer: a case-control study in Xianyou of China. *J Genet*. 2019;98:67. doi:10.1007/s12041-019-1110-5.

Summary

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM RS1049174 OF NKG2D GENE IN LYMPHOMA PATIENTS

NKG2D receptor, on NK cell, plays the most important role in the conjugation with specific ligands present on the surface of the target cell that initiates cellular mediated immunity and promotes destruction of both virus injected cell and cancer cell. Previously, we found the single polymorphism (SNP) rs1049174 at 3'-UTR location of *NKG2D* gene were associated with the formation and development of cancer related HPV. The aim of this study was to detect the prevalence of this variant in lymphoma group and to compare with the healthy group. 129 lymphoma patients and 178 healthy individuals were recruited in the study. PCR – RFLP and Real – time PCR were used to study the Genotype polymorphism rs1049174. Two types of SNP were found as the allele type (G vs C: OR = 0.67, 95% CI: 0.48 – 0.93), the homogenous gene type (GG vs GC + CC: OR = 0.56, 95% CI: 0.34 – 0.94). Allele G and GG genotype of SNP rs1049174 are related to a significantly reduction of lymphoma risk but there is no correlation with NHL and DLBCL risk.

Keywords: Lymphoma, single polymorphism rs1049174 G, *NKG2D* gene