

# XÁC ĐỊNH ĐA HÌNH THÁI ĐƠN RS1049174 CỦA GEN NKG2D TRÊN BỆNH NHÂN UNG THƯ VÒM HỌNG

Nguyễn Thị Tinh<sup>1</sup>, Đào Hoàng Yến<sup>1</sup>, Lê Mạnh Quân<sup>1</sup>,  
Nguyễn Văn Hùng<sup>2</sup> và Nguyễn Hoàng Việt<sup>1</sup>,✉

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Hà Nội, <sup>2</sup>Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

*NKG2D là một thụ thể đóng vai trò quan trọng trong việc giúp các tế bào miễn dịch tiêu diệt tế bào ung thư. Đa hình thái nucleotid đơn (SNP) rs1049174 của gen NKG2D làm biến đổi độc tính của tế bào NK có ảnh hưởng tới nguy cơ mắc ung thư. Mục tiêu nghiên cứu là xác định mối liên quan của SNP rs1049174 với nguy cơ mắc ung thư vòm họng. 100 mẫu sinh thiết được chẩn đoán ung thư vòm họng và 100 mẫu máu người khỏe mạnh được thu thập. Kiểu gen NKG2D được xác định bởi kỹ thuật giải trình tự và realtime PCR. Tỷ lệ kiểu gen NKG2D tại rs1049174 trên bệnh nhân ung thư vòm là: 27% GG, 35% CC, 38% GC. Kiểu gen CC và alen C ở nhóm bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng, lần lượt là  $p = 0,04$ ;  $OR = 1,909$ ;  $95\%CI: 1,020-3,573$  và  $p = 0,03$ ;  $OR = 0,6559$ ;  $95\%CI: 0,4421-0,9729$ . Alen C tại SNP rs1049174 của gen NKG2D làm tăng nguy cơ mắc ung thư vòm họng và gợi ý đây có thể là một dấu ấn sinh học để sàng lọc ung thư vòm họng tại Việt Nam.*

**Từ khóa:** NKG2D, rs1049174, Ung thư vòm họng.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong năm 2012, ước tính có khoảng 86.700 trường hợp mới mắc và 50.800 trường hợp tử vong do ung thư vòm họng (NPC).<sup>1</sup> Ung thư vòm họng là một loại ung thư ác tính cao với sự xâm lấn tại chỗ và di căn sớm. NPC rất phổ biến ở miền Nam Trung Quốc và Đông Nam Á.<sup>2</sup>

Tế bào diệt tự nhiên (NK) là một tế bào miễn dịch đóng vai trò quan trọng trong việc chống lại sự nhiễm virus và tế bào ung thư. Tế bào NK được hoạt hóa dựa trên sự kiểm soát bởi cân cân hoạt động giữa các thụ thể hoạt hóa và thụ thể ức chế. Khi thiếu hụt các tín hiệu ức chế thì các thụ thể hoạt hóa của tế bào NK (bao gồm NKp46, NKp30, NKG2D và phân tử liên kết DNAX-1) thông qua tương tác với các phối tử đặc hiệu sẽ khởi phát quá trình tiêu diệt và ly giải tế bào đích.<sup>3</sup> Trong các phối tử được nhận diện hiện nay, vượt trội nhất phải kể đến phối

tử NKG2D.<sup>4</sup>

Phân tử NKG2D là một protein xuyên màngтип II họ lectin, mang cả hai chức năng của thụ thể hoạt hóa và đồng kích thích, được biểu hiện trên tế bào NK và tế bào ۆ T cũng như tế bào T CD8+.<sup>5</sup> Đa hình thái nucleotide đơn (SNPs) rs1049174 G > C SNP của NKG2D được chú ý vì vai trò của nó trong việc kích hoạt các tế bào T.<sup>6</sup> Một nghiên cứu được đăng trên tạp chí Scientific Reports năm 2016 đã làm sáng tỏ sự biến đổi của gen *NKG2D* tại vị trí đa hình thái đơn SNP rs1049174 có khả năng làm biến đổi độc tính của tế bào diệt tự nhiên NK ảnh hưởng tới những dạng ung thư liên quan tới virus HPV trên những bệnh nhân ở Việt Nam.<sup>7</sup> Từ ý nghĩa của tế bào diệt tự nhiên NK, trong các yếu tố miễn dịch chống lại các tế bào ung thư và vai trò quan trọng trong quá trình tiêu diệt các tế bào chuyển dạng, cá thể mang alen G mang độc tính của tế bào NK cao hơn những cá thể mang alen C, chúng tôi đặt ra giả thiết rằng những cá thể mang alen G sẽ có nguy cơ bị ung thư vòm họng thấp hơn những cá thể

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: 26/02/2020

mang alen C.

Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: 1) Xác định tỉ lệ kiểu gen *NKG2D* tại SNP rs1049174 trên đối tượng ung thư vòm họng; 2) Khảo sát mối liên quan của SNP rs1049174 đối với nguy cơ mắc ung thư vòm họng.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

Nhóm bệnh là 100 mẫu mô sinh thiết của bệnh nhân ung thư vòm họng thể ung thư biểu mô không biệt hóa, chưa được điều trị bằng bất kỳ phương pháp nào tại Bệnh viện K cơ sở Quán Sứ và được chẩn đoán xác định bằng mô bệnh học tại Bộ môn Giải phẫu bệnh, Trường Đại học Y Hà Nội. Nhóm chứng là 100 mẫu máu ngoại vi của những người khỏe mạnh, không tiềm ẩn nguy cơ bệnh khác, cũng như không có các yếu tố nguy cơ khác của ung thư vòm họng.

### 2. Phương pháp

- *Thiết kế nghiên cứu:* 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.

- *Địa điểm nghiên cứu:* Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

- *Quy trình tiến hành nghiên cứu:*

Thu thập 2ml máu ngoại vi từ 100 người khỏe mạnh vào ống chống đông EDTA. Mẫu mô sinh thiết ung thư vòm họng được chẩn đoán xác định mô bệnh học tại Bộ môn Giải phẫu Bệnh trường Đại học Y Hà Nội, được cắt thành những mảnh có kích thước 5-10  $\mu\text{m}$ , lấy 8-10 mảnh cất bảo quản trong ống eppendorf để tiến hành tách chiết DNA.

- *Kĩ 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). Tất cả mẫu DNA tách chiết trong nghiên cứu đều được thực hiện và kiểm tra dưới sự giám sát kỹ thuật viên phòng thí nghiệm có lâu năm kinh nghiệm. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được xác định bằng máy Nano-Drop, những mẫu DNA có độ tinh sạch A 260/280 nằm trong khoảng 1,8 – 2,0 với nồng độ DNA thu được lớn hơn hoặc bằng 100ng/ $\mu\text{l}$  được sử dụng để phân tích rs1049174 của gen *NKG2D*.

- *Kỹ thuật giải trình tự gen:* sau khi khuếch đại gen *NKG2D* vùng 3' UTR bằng kỹ thuật PCR, sản phẩm được tinh sạch từ gel agarose, sử dụng Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, 28704) và đưa vào giải trình tự bằng phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA). Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự Genebank của gen *NKG2D*.

- *Kỹ thuật Real – time PCR Genotyping:* Toàn bộ mẫu DNA thu thập được trong nghiên cứu đều được pha loãng đến nồng độ khoảng 20 ng/ $\mu\text{l}$ . Thành phần phản ứng Real – time PCR (thể tích 10  $\mu\text{l}$ ) bao gồm: 5  $\mu\text{l}$  Taqman Genotyping Master Mix (Thermoscientific, 4371353), 0.5  $\mu\text{l}$  20x Probe primers (Thermoscientific, C\_9345347\_10), 4.5  $\mu\text{l}$  DNA đã pha loãng. Sau đó thực hiện phản ứng Real – time PCR (QuantStudio 3, Applied Biosystems, Foster city, USA) với chu trình nhiệt: 600C trong 30 giây; 95°C trong 10 phút; (95° C: 15 giây và 60°C: 1 phút) trong 40 chu kì ; và kết thúc ở 60°C trong 30 giây.

- *Xử lý số liệu:* Sử dụng phần mềm Graph Prism v5, tính toán tỉ suất chênh OR, 95% CI, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p \leq 0,05$ .

### 4. Đạo đức trong 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. Bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện

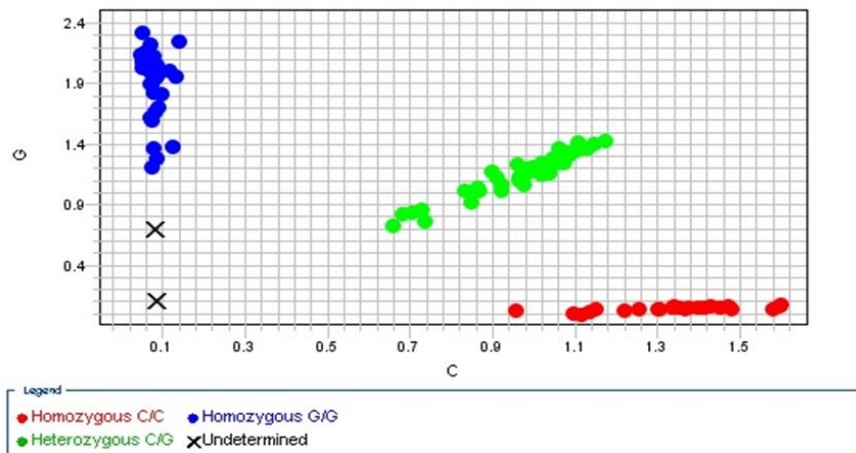
tham gia nghiên cứu. Các thông tin cá nhân được đảm bảo bí mật.

### III. KẾT QUẢ

**Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu**

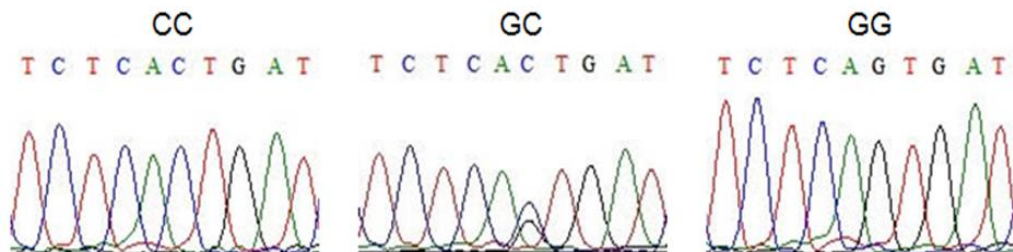
	Nhóm bệnh (n = 100)		Nhóm chứng (n = 100)		p
	n	%	n	%	
<b>Giới tính</b>					
Nam	74	74	75	75	p > 0,05
Nữ	26	26	25	25	
<b>Tuổi trung bình</b>	Trung bình	SD	Trung bình	SD	p > 0,05
	52,91	13,37	51,73	12,85	

Bảng 1 mô tả các đặc điểm chung của 2 nhóm đối tượng nghiên cứu. Không có sự khác biệt về giới tính và tuổi trung bình giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng.



**Hình 1. Kiểu gen *NKG2D* ở nhóm bệnh nhân ung thư vòm họng**

Kết quả phân tích kiểu gen *NKG2D* tại vị trí rs1049174 bằng phương pháp Realtime PCR được thể hiện trong hình 1. Chấm ghi xám, ghi nhạt, đen lần lượt minh họa cho kiểu gen CC, GC, GG.



**Hình 2. Kết quả giải trình tự gen *NKG2D* tại rs1049174 trên bệnh nhân ung thư vòm họng**

Kết quả xác định kiểu gen của gen *NKG2D* bằng Realtime PCR được kiểm tra lại bằng phương pháp giải trình tự. Hình 2 biểu diễn kết quả giải trình tự của mẫu DNA thuộc nhóm đối chứng có số

thứ tự lần lượt là N3, N4, N5 sau khi PCR. Kết quả hoàn toàn trùng khớp với kết quả xác định kiểu gen bằng kỹ thuật Realtime PCR.

**Bảng 2. Đặc điểm kiểu gen và alen của NKG2D tại SNP rs1049174**

	Nhóm bệnh (n = 100)		Nhóm chứng (n = 100)		p	OR (95%CI)
	n	%	n	%		
<b>Kiểu gen</b>						
GG	27	27	35	35	ns	
CC	35	35	22	22	0,04*	1,909 (1,020 - 3,573)
GC	38	38	43	43	ns	
<b>Alen</b>						
G	92	46	113	56,5	0,03*	0,6559 (0,4421 - 0,9729)
C	108	54	87	30,5		

Bảng 2 miêu tả tỷ lệ kiểu gen và alen của NKG2D rs1049174 giữa nhóm bệnh và nhóm chứng. Tỷ lệ phân bố kiểu gen của NKG2D rs1049174 trên bệnh nhân ung thư vòm họng lần lượt là 27% GG, 35% CC, 38% GC. Kiểu gen CC và alen C của nhóm bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng với lần lượt ( $p = 0,04^*$ ; OR = 1,909; 95%CI: 1,020 - 3,575) và ( $p = 0,03^*$ ; OR = 0,6559; 95%CI: 0,4421 - 0,9729).

#### IV. BÀN LUẬN

Ung thư vòm họng được xếp hạng là dạng ung thư được chuẩn đoán thường xuyên thứ 24 trên toàn thế giới.<sup>8</sup> Nguyên nhân trong hầu hết các trường hợp mắc ung thư vòm họng thường không rõ ràng, trong đó yếu tố môi trường, chế độ ăn uống, hút thuốc lá và nhiễm virus Epstein-Barr (EBV) được biết là có liên quan chặt chẽ với sự phát triển của ung thư. Ngoài ra, yếu tố di truyền cũng là yếu tố quan trọng quyết định nguy cơ mắc ung thư vòm họng.<sup>9-11</sup> Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu về mối liên quan giữa các đa hình thái đơn SNPs với ung thư vòm họng. Mười lăm SNP được phát hiện có liên quan đáng kể đến nguy cơ mắc NPC: TP53 (rs1042522, C > G), GSTM1 (+/DEL), IL-10 (rs1800896, A > G), GABBR1 (rs2076483, T > C; rs29232, G > A), MDM2 (rs2279744, T > G), miR-146a (rs2910164, C > G), MDS1-EV11

(rs6774494, G > A), XPC (rs2228000, C > T), HCG9 (rs3869062, A > G; rs16896923, T > C), HLA-F (rs3129055, T > C), MMP2 (rs243865, C > T), SPLUNC1 (rs2752903, T > C; rs750064, A > G). Trong số đó 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 độ nhạy cảm với NPC, trong khi GSTM1 (+ / DEL), IL-10 (rs1800896, A > G), MDM2 (rs2279744, T > G), MDS1-EV11 (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 độ nhạy cảm với NPC.<sup>12</sup> Trong nghiên cứu của chúng tôi, sự liên quan của các biến thể di truyền của rs1049174 trong gen *NKG2D* và

độ nhạy cảm với ung thư vòm họng đã được tìm thấy ở 100 bệnh nhân ung thư vòm họng thể không biệt hóa và 100 người thuộc nhóm chứng tại Việt Nam. Kết quả này cho thấy rằng alen G của NKG2D rs1049174 có liên quan rõ rệt với việc giảm nguy cơ NPC. Alen C của NKG2D rs1049174 làm tăng nguy cơ mắc NPC. Đây là nghiên cứu đầu tiên về mối liên quan di truyền giữa NKG2D và tính nhạy cảm với ung thư vòm họng tại Việt Nam, xác nhận giả thuyết ban đầu của chúng tôi là những cá thể mang alen G sẽ có nguy cơ bị ung thư vòm họng thấp hơn những cá thể mang alen C.

Đa hình thái rs1049174 NKG2D cũng có mối liên quan đến một số dạng ung thư khác. Nghiên cứu tại bệnh viện Xianyou, Phúc Kiến, Trung Quốc gần đây cho thấy: bệnh nhân mang kiểu gen rs1049174 GG có tỷ lệ mắc ung thư dạ dày cao hơn (OR = 1,85; 95% (CI): 1,02 - 3,38).<sup>13</sup> Tuy nhiên, kết quả này không giống với nghiên cứu của chúng tôi. Điều này chứng tỏ cùng một đa hình gen, nhưng đối với những loại ung thư khác nhau, sẽ có ảnh hưởng khác nhau, thậm chí là trái ngược nhau.

## V. KẾT LUẬN

Alen C SNP rs1049174 của gen *NKG2D* có ý nghĩa lớn trong việc làm tăng nguy cơ mắc ung thư vòm họng và gợi ý SNP này có thể được sử dụng như một dấu ấn sinh học để sàng lọc các bệnh nhân Việt Nam có nguy cơ mắc ung thư vòm họng.

### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi quỹ NAFOSTED trong đề tài mã số 108.02-2018.312. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Bệnh viện K cơ sở Quán Sứ và Trường đại học Y Hà Nội đã giúp đỡ trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262
2. He M-L, Luo MX-M, Lin MC, Kung H. MicroRNAs: Potential diagnostic markers and therapeutic targets for EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2012;1825(1):1-10. doi:10.1016/j.bbcan.2011.09.001
3. Pietra G, Manzini C, Vitale M, et al. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells. *Int Immunol*. 2009;21(7):793-801. doi:10.1093/intimm/dxp047
4. Bottino C, Castriconi R, Pende D, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *J Exp Med*. 2003;198(4):557-567. doi:10.1084/jem.20030788
5. Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res*. 2008;40(1):18-34. doi:10.1007/s12026-007-0060-9
6. Asadi-Saghandi A, Shams A, Eslami G, Mirghanizadeh SA, Eskandari-Nasab E. 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
7. Espinoza JL, Nguyen VH, Ichimura H, et al. A functional polymorphism in the NKG2D gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to Human Papilloma Virus-related cancers. *Sci Rep*. 2016;6:39231. doi:10.1038/srep39231
8. 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 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492

9. Jia W-H, Qin H-D. Non-viral environmental risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a systematic review. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(2):117-126. doi:10.1016/j.semcancer.2012.01.009

10. Hildesheim A, Wang C-P. Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: a review of epidemiological association studies, 2000-2011: Rosetta Stone for NPC: genetics, viral infection, and other environmental factors. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(2):107-116. doi:10.1016/j.semcancer.2012.01.007

11. Su CK, Wang CC. Prognostic value of Chinese race in nasopharyngeal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002;54(3):752-758. doi:10.1016/s0360-3016(02)02969-3

12. Wu M-Y, Huang S-J, Yang F, et al. Detection of nasopharyngeal carcinoma susceptibility with single nucleotide polymorphism analysis using next-generation sequencing technology. *Oncotarget.* 2017;8(32):52708-52723. doi:10.18632/oncotarget.17085

13. Zheng W, Li H, Liu B, Wu C. 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.

## Summary

### SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM RS1049174 IN THE NKG2D GENE IN NASOPHARYNGEAL CANCER PATIENTS

NKG2D is an activity receptor, which plays an important role in helping immune cells killing cancer cells. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) at rs1049174 of *NKG2D* gene has the ability to alter the toxicity of natural killer cells (NK), which has an effect to cancer risk. The objective of the study was to determine the association of SNP rs1049274 with the risk of nasopharyngeal cancer. 100 tissue biopsy samples of nasopharyngeal cancer patients and 100 blood samples of healthy people were collected in the study. The NKG2D genotype was determined by sequencing techniques and realtime PCR. The ratio of NKG2D genotype at rs1049174 in nasopharyngeal cancer patients is 27% GG, 35% CC, 38% GC respectively. The genotype of CC and C allele in the disease group was significantly higher than the control group,  $p = 0.04$ ; OR = 1.909; 95% CI: 1.020 - 3.573 and  $p = 0.03$ ; OR = 0.6559; 95% CI: 0.4421-0.9729. The C allele at SNP rs1049174 of the *NKG2D* gene increases the risk of nasopharyngeal cancer and suggests this may be a biological marker for screening for nasopharyngeal cancer in Viet Nam.

**Keywords:** NKG2D, rs1049174, nasopharyngeal cancer.