

NGHIÊN CỨU MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN MIRNA-29B Ở BỆNH NHÂN U THẦN KINH ĐỆM

Nguyễn Duy Ngọc^{1,2}, Trần Văn Khánh¹, Nguyễn Thu Thúy¹
Lê Thị Phương¹, Trần Huy Thịnh¹, Phạm Văn Thái¹
Lê Đức Tâm¹ và Kiều Đình Hùng^{1,✉}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện E

U thần kinh đệm phát triển từ tế bào thần kinh đệm chưa biệt hóa hoặc biệt hóa thấp trong não. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra cơ chế sinh bệnh u thần kinh đệm có liên quan đến sự thay đổi mức độ biểu hiện của nhiều miRNA. miRNA-29b thúc đẩy quá trình chết theo chương trình và ức chế sự tăng sinh trong các tế bào u thần kinh đệm. Nghiên cứu này nhằm xác định mức độ biểu hiện miRNA-29b trong máu ngoại vi ở bệnh nhân u thần kinh đệm. Kỹ thuật realtime-PCR được sử dụng để xác định mức độ biểu hiện của miRNA-29b trong huyết tương của 62 bệnh nhân u thần kinh đệm đã được phẫu thuật loại bỏ khối u và 62 người khỏe mạnh. Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện của miRNA-29b giữa nhóm u thần kinh đệm và đối chứng. Đồng thời, không tìm thấy mối liên quan giữa sự biểu hiện miRNA-29b với một số đặc điểm của nhóm u thần kinh đệm.

Từ khóa: U thần kinh đệm, miRNA-29b, realtime-PCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

U thần kinh đệm (UTKĐ) là một trong những loại ung thư ác tính nhất ở người. UTKĐ phát triển từ tế bào thần kinh đệm chưa biệt hóa hoặc biệt hóa thấp trong não. WHO đã đưa ra hướng dẫn phân loại 4 cấp dựa trên các đặc điểm mô học và hình thái của chúng với mức độ ác tính tăng dần, trong đó độ I là mức độ ác tính thấp nhất và độ IV là độ ác tính cao nhất. Một khối u ở độ IV đồng nghĩa với việc chúng là loại phát triển nhanh và mạnh nhất, có thể lan rộng khắp não bộ trong thời gian ngắn. UTKĐ độ cao (độ IV) phổ biến và ác tính nhất là u nguyên bào thần kinh đệm đa hình (Glioblastoma multiforme - GBM), với thời gian sống trung bình chỉ 8 tháng từ khi phát hiện, đã bao gồm các điều trị đầy đủ là phẫu thuật và hoá xạ trị bổ

trợ. Thời gian sống còn 1 năm và 2 năm tương ứng chỉ là 20% và 3,27%.¹

Cơ chế sinh bệnh UTKĐ được biết đến đa phần là do đột biến gen, gây rối loạn thông tin di truyền trong tế bào, tế bào tăng sinh, không ngừng phân chia phát sinh khối u, ung thư.² Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra cơ chế sinh bệnh UTKĐ có liên quan đến mức độ biểu hiện tăng hoặc giảm của nhiều miRNA.^{3,4} Các miRNA biểu hiện tăng có thể hoạt động như các yếu tố kích thích sinh ung thư và làm bất hoạt các gen ức chế ung thư, trong khi các miRNA biểu hiện giảm có thể hoạt động như các chất ức chế khối u. miRNA-29b có thể đóng vai trò ức chế khối u trong nhiều loại bệnh ung thư ở người. miRNA-29b ức chế đa u tủy bằng cách ức chế hoạt động gây viêm và ức chế các tế bào đuôi gai.⁵ miRNA-29b cũng có thể đảo ngược tình trạng kháng bortezomib của bệnh đa u tủy và bệnh bạch cầu tủy (Mcl-1).⁶ Trong ung thư dạ dày, miRNA-29b ngăn chặn sự di căn và sự

Tác giả liên hệ: Kiều Đình Hùng

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: kieudinhhung@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 28/12/2023

Ngày được chấp nhận: 05/01/2024

phát triển của khối u bằng cách ức chế MMP-2 (matrix metalloprotein-2).⁷ Đáng chú ý, sự điều hòa giảm biểu hiện của miRNA-29b cũng có chức năng ức chế khối u quan trọng trong bệnh UTKĐ bằng cách điều chỉnh hoạt động nhiều gen và con đường tín hiệu.³ miRNA-29b thúc đẩy quá trình chết theo chương trình và ức chế sự tăng sinh trong các tế bào UTKĐ.⁴ Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm đánh giá mức độ biểu hiện miRNA-29b trong máu ngoại vi bệnh nhân u thần kinh đệm và mối liên quan giữa sự biểu hiện miRNA-29b với một số đặc điểm của nhóm u thần kinh đệm.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tiêu chuẩn lựa chọn

Nhóm UTKĐ gồm 62 bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định là UTKĐ dựa trên kết quả khám lâm sàng và kết quả giải phẫu bệnh sau phẫu thuật lấy u tại Bệnh viện Việt Đức và Bệnh viện K. Nhóm chứng gồm 62 người khỏe mạnh đến kiểm tra sức khỏe tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, tương ứng về tuổi và giới với nhóm bệnh.

Tiêu chuẩn loại trừ

Có tiền sử mắc ung thư hoặc các bệnh lý khác.

2. Phương pháp

Nghiên cứu sử dụng phương pháp lấy mẫu thuận tiện và thiết kế mô tả cắt ngang có nhóm chứng. Nghiên cứu được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu Gen và Protein - Trường Đại học Y Hà Nội, Khoa phẫu thuật thần kinh 2 - Bệnh viện Việt Đức, Khoa Ngoại Thần kinh - Bệnh viện K, từ tháng 1/2023 đến tháng 11/2023.

Cách lấy mẫu: 3ml máu chống đông bằng EDTA, ly tâm 3000 vòng/ phút trong 3 phút để tách huyết tương sử dụng cho tách chiết miR-

NA.

Quy trình thực hiện

miRNA được tách chiết bằng kit miRNeasy Serum/Plasma (QIAGEN - Đức). Quy trình tách chiết tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ và độ tinh sạch của miRNA được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nanodrop. Mẫu đạt tiêu chuẩn OD260nm/OD280nm = 1,8 - 2,0 được sử dụng cho phân tích tiếp theo. cDNA được tổng hợp bằng hóa chất TaqMan® Advanced miRNA Assays (Appliedbiosystems - Mỹ). Mức độ biểu hiện của miRNA của mẫu nghiên cứu được xác định bằng kỹ thuật Realtime-PCR sử dụng hóa chất TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X) và cặp mồi đặc hiệu cùng với mẫu dò gắn huỳnh quang (Appliedbiosystems - Mỹ).

Kết quả Realtime PCR của mẫu bệnh và mẫu chứng được phân tích bằng phương pháp định lượng tương đối $2^{-\Delta\Delta Ct}$ của Livak. *U361* được sử dụng như gen nội chuẩn để so sánh mức biểu hiện của miRNA trên mẫu bệnh và mẫu chứng.

Phần mềm SPSS 20.0 được sử dụng để phân tích số liệu. Sự khác biệt về mức độ biểu hiện miRNA-29b giữa nhóm bệnh và chứng được đánh giá bằng kiểm định Independent-samples T Test và One-Way ANOVA, giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài đã được Hội đồng Đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội chấp thuận theo quyết định số IRB-VN01.001/IRB/FWA00004148 ngày 17/03/2020. Mọi thông tin của cá nhân được mã hóa và giữ bảo mật an toàn. Thu thập số liệu được tiến hành một cách trung thực, chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ

Tuổi trung bình nhóm UTKĐ là $49,81 \pm 16,33$, nhóm chứng là $49,36 \pm 15,92$, không có

sự khác biệt về tuổi trung bình giữa hai nhóm với $p = 0,374$. Tỷ lệ nam ở nhóm UTKĐ, nhóm chứng đều là 46,77%, tỉ lệ nữ ở nhóm UTKĐ,

nhóm chứng đều là 53,23%. Tỷ lệ giới nam và nữ cả hai nhóm không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,683$ (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	Nhóm chứng	Nhóm bệnh nhân UTKĐ	p
Tuổi (TB \pm SD)	49,36 \pm 15,92	49,81 \pm 16,33	0,347
Giới (n, %)	Nam	29 (46,77%)	0,683
	Nữ	33 (53,23%)	

Kết quả xác định mức độ biểu hiện của miRNA-29b trên các mẫu chứng và mẫu bệnh tương ứng cho thấy, mức độ biểu hiện miRNA-29b ở nhóm bệnh nhân UTKĐ là 0,621 \pm

0,846, cao hơn mức độ biểu hiện miRNA-29b ở nhóm chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (bảng 2).

Bảng 2. Mức độ biểu hiện miRNA-29b ở nhóm chứng và bệnh nhân UTKĐ

	Nhóm chứng	Nhóm bệnh nhân UTKĐ	p
Kết quả	0,433 \pm 0,569	0,621 \pm 0,846	0,149

Nhóm bệnh nhân UTKĐ được chia thành các nhóm đặc điểm lâm sàng: tuổi, giới tính, kích thước khối u, cấp độ u (WHO). Trong đó, tỉ lệ các nhóm tuổi dưới 50 tuổi và trên 50 tuổi lần lượt là 45,16% và 54,84%. Tỷ lệ nam và nữ lần lượt là 46,77% và 53,23%. Tỷ lệ kích thước khối u dưới 5cm và trên 5cm lần lượt là 59,18%

và 40,82%. Cấp độ u được chia thành ba nhóm cấp độ II (4,84%), cấp độ III (30,65%) và cấp độ IV (64,51%). Mức độ biểu hiện miRNA-29b cũng được đánh giá ở các nhóm đặc điểm lâm sàng. Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện miRNA-29b với các đặc điểm lâm sàng được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện miRNA-29b với các đặc điểm lâm sàng ở nhóm bệnh nhân UTKĐ

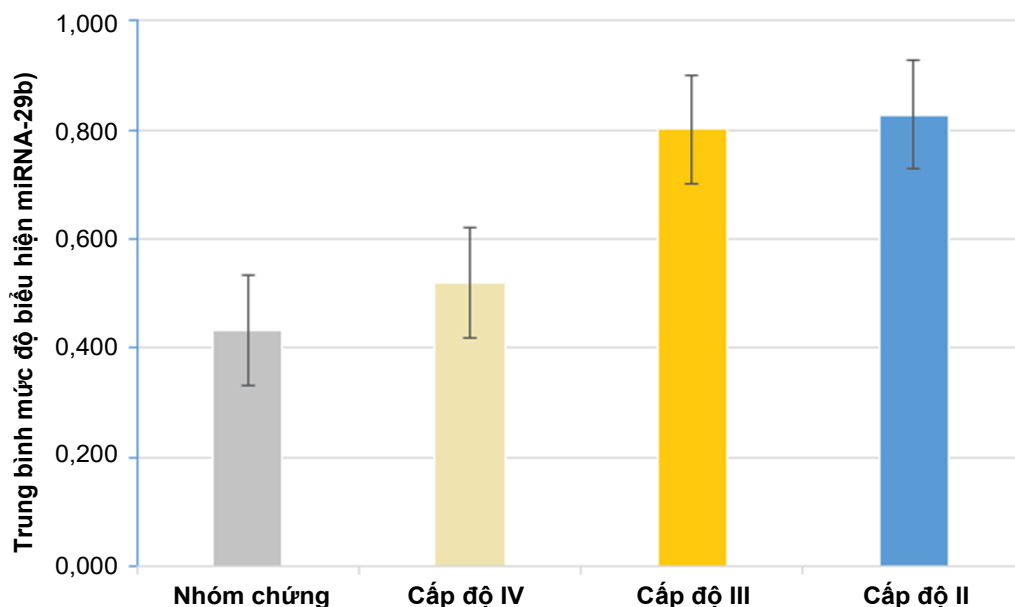
Đặc điểm	Số lượng (n, %)	Mức độ biểu hiện miRNA-29b	p
<i>Tuổi</i>			
< 50	28 (45,16%)	0,612 \pm 0,862	0,939
\geq 50	34 (54,84%)	0,628 \pm 0,845	
<i>Giới</i>			
Nam	29 (46,77%)	0,573 \pm 0,839	0,683
Nữ	33 (53,23%)	0,662 \pm 0,862	
<i>Kích thước khối u (cm)</i>			
< 5	29 (59,18%)	26,14 \pm 2,838	0,421
\geq 5	20 (40,82%)	25,45 \pm 2,964	

Đặc điểm	Số lượng (n, %)	Mức độ biểu hiện miRNA-29b	p
<i>Cấp độ UTKĐ (WHO)</i>			
II	3 (4,84%)	0,828 ± 1,172	0,232
III	19 (30,65%)	0,801 ± 0,961	
IV	40 (64,51%)	0,520 ± 0,769	

Đánh giá mối liên quan giữa mức độ biểu hiện miRNA-29b với một số đặc điểm của nhóm UTKĐ cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mức độ biểu hiện giữa các nhóm tuổi (< 50 tuổi, ≥ 50 tuổi, với $p = 0,939$); nhóm giới tính (nam và nữ, với $p = 0,683$); nhóm kích thước khối u (< 5cm, ≥ 5cm, với $p =$

0,421); cũng như giữa các nhóm cấp độ UTKĐ (cấp độ II, III, IV, với $p = 0,232$).

Khi so sánh mức độ biểu hiện miRNA-29b của từng cấp độ UTKĐ (IV, III, II) với nhóm chứng thì sự khác biệt cũng không có ý nghĩa thống kê, với p lần lượt là 0,933; 0,212; 0,789.



Biểu đồ 1. Mức độ biểu hiện miRNA-29b theo cấp độ UTKĐ và nhóm chứng

IV. BÀN LUẬN

Hiện nay, nhờ sự tiến bộ của sinh học phân tử, chúng ta có nhiều bằng chứng có cơ sở khoa học đáng tin cậy hơn hỗ trợ cho chẩn đoán, tiên lượng và xây dựng kế hoạch điều trị u thần kinh đệm. Một trong số đó là các miRNA, là những RNA ngắn (21 - 23 nucleotid), không mã hóa, miRNA có khả năng liên kết với vùng 3'UTR không dịch mã của mRNA, dẫn đến sự phân

hủy của mRNA hoặc ức chế quá trình dịch mã. miRNA có vai trò quan trọng trong các quá trình phát triển của tế bào bao gồm quá trình tăng sinh, biệt hóa, chết theo chương trình.⁸ miRNA có thể tham gia điều chỉnh hơn một phần ba tổng số gen ở người thông qua liên kết bổ sung của miRNA trưởng thành và vùng 3'UTR của mRNA đích, dẫn đến sự điều hòa biểu sinh

thông qua sự phân cắt mRNA hoặc ức chế dịch mã. miRNA điều chỉnh sự biểu hiện mRNA gen đích của chúng. Do đó, sự biểu hiện quá mức hoặc dưới mức của các miRNA sẽ dẫn đến sự điều hòa tăng hoặc giảm sản phẩm protein của mRNA đích. miRNA có thể là nguyên nhân gây ung thư nếu đích trực tiếp của miRNA là gen gây ung thư hoặc chất ức chế khối u.⁸

Việc đánh giá miRNA-29b trong các mẫu huyết tương cho thấy kết quả tương tự và phù hợp với kết quả trong các mẫu mô UTKĐ.⁹ Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu thập mẫu huyết tương từ máu ngoại vi của bệnh nhân sau khi bệnh nhân phẫu thuật lấy u từ 7 - 10 ngày và đã có kết quả giải phẫu bệnh khối u là UTKĐ. Mức độ biểu hiện miRNA-29b của 62 mẫu bệnh UTKĐ được phân tích theo ba đặc điểm lâm sàng (tuổi, giới, cấp độ u theo WHO), chúng tôi đánh giá xem liệu có mối quan hệ giữa các đặc điểm lâm sàng này với mức độ biểu hiện miRNA-29b trong huyết tương hay không. Kết quả ở bảng 3 cho thấy, không có sự khác biệt ở nhóm đặc điểm về tuổi, giới tính, kích thước khối u, cũng như cấp độ UTKĐ với $p > 0,05$. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Zhong F và cộng sự (2019).¹⁰ Ngoài ra, biểu hiện miRNA-29b trong huyết tương ở bệnh nhân UTKĐ ở cấp độ cao (độ IV) thấp hơn so với giai đoạn (II và III) (Biểu đồ 1). Kết quả này tương đối phù hợp với nghiên cứu của Sun và cộng sự (2017).⁹

Nhiều nghiên cứu đã nhận thấy sự giảm bất thường của miRNA-29b ở những bệnh nhân UTKĐ chưa được loại bỏ khối u. Shin J và cộng sự (2017) phát hiện thấy miRNA-29b được điều chỉnh giảm đáng kể (giảm 1,34 lần, $p = 0,02$) ở UTKĐ so với mô não không có khối u.¹¹ Nghiên cứu của Zhong F và cộng sự (2019) có kết quả nồng độ miRNA-29b trong huyết thanh ở bệnh nhân UTKĐ trước phẫu thuật thấp hơn đáng kể so với nhóm chứng bình thường ($p < 0,001$).¹⁰

Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện miRNA-29b của nhóm bệnh nhân UTKĐ cao hơn của nhóm chứng (bảng 2), tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Điều này tương đối phù hợp với kết quả nghiên cứu của nghiên cứu của Zhong F và cộng sự (2019) thấy rằng nồng độ miRNA-29b ngoại bào trong huyết thanh của các mẫu sau phẫu thuật đã tăng rõ rệt so với các mẫu trước phẫu thuật ($p = 0,009$).¹⁰ Ngoài ra, sự biểu hiện của miRNA-29b được điều hòa bởi nhiều phân tử tín hiệu như MYC, EZH2, YY1, HDAC và GATA3. Những protein điều hòa này kiểm soát sự biểu hiện của miRNA-29b chủ yếu ở giai đoạn đầu.¹² Đặc biệt, MYC là họ gen gây ung thư, mã hóa ba loại protein là MYC-C, MYC-N, MYC-L, giả thiết đưa ra là có thể trong các mô UTKĐ có sự biểu hiện quá mức MYC-N, dẫn đến ức chế tổng hợp miRNA-29b. Do đó, khi phẫu thuật loại bỏ khối UTKĐ thì nồng độ MYC-N giảm xuống, không còn ức chế tổng hợp miRNA-29b và làm cho biểu hiện của miRNA-29b tăng lên. Nghiên cứu này không trực tiếp đánh giá sự biểu hiện của MYC-N trong UTKĐ, nhưng tương đối phù hợp với kết quả nghiên cứu của Sun và cộng sự (2017), đã phát hiện biểu hiện của miRNA-29b trong các mô UTKĐ có mối tương quan nghịch với mức độ mRNA và protein của MYC-N.⁹

Một số nghiên cứu trên thế giới cũng đã phát hiện sự biểu hiện tăng cao của miRNA-29b trong huyết tương của bệnh nhân UTKĐ sau phẫu thuật loại bỏ khối u. Vì vậy, cần thực hiện thêm nghiên cứu về mức độ biểu hiện miRNA-29b trong huyết tương của bệnh nhân trước và sau khi phẫu thuật, với cỡ mẫu lớn hơn, đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của gen, để khẳng định vai trò hỗ trợ chẩn đoán và điều trị của miRNA-29b trong UTKĐ.

V. KẾT LUẬN

Mức độ biểu hiện miRNA-29b trong máu

ngoại vi của nhóm bệnh nhân UTKĐ sau phẫu thuật loại bỏ khối u không có sự khác biệt với nhóm đối chứng và không có mối liên quan giữa sự biểu hiện miRNA-29b với một số đặc điểm của nhóm u thần kinh đệm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ Y tế theo Quyết định số 369/QĐ-BYT. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Bệnh viện Việt Đức và Bệnh viện K đã cung cấp mẫu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ghosh M, Shubham S, Mandal K, et al. Survival and prognostic factors for glioblastoma multiforme: Retrospective single-institutional study. *Indian J Cancer*. 2017;54(1):362-367.
2. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(16):7727-7731.
3. Purow BW, Schiff D. Glioblastoma Genetics: In Rapid Flux. *Discov Med*. 2010;9(45):125-131.
4. Cortez MA, Nicoloso MS, Shimizu M, et al. miR-29b and miR-125a Regulate Podoplanin and Suppress Invasion in Glioblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(11):981-990.
5. Botta C, Cucè M, Pitari MR, et al. MiR-29b antagonizes the pro-inflammatory tumor-

promoting activity of multiple myeloma-educated dendritic cells. *Leukemia*. 2018;32(4):1003-1015. doi:10.1038/leu.2017.336

6. Pan Y, Zhang Y, Liu W, et al. LncRNA H19 overexpression induces bortezomib resistance in multiple myeloma by targeting MCL-1 via miR-29b-3p. *Cell Death Dis*. 2019;10(2):1-14. doi:10.1038/s41419-018-1219-0

7. Wang T, Hou J, Jian S, et al. miR-29b negatively regulates MMP2 to impact gastric cancer development by suppress gastric cancer cell migration and tumor growth. *J Cancer*. 2018;9(20):3776-3786. doi:10.7150/jca.26263

8. Brower J, Clark PA, Lyon W, et al. MicroRNAs in Cancer: Glioblastoma and Glioblastoma Cancer Stem Cells. *Neurochem Int*. 2014;77:68-77.

9. Sun G, Lu J, Zhang C, et al. MiR-29b inhibits the growth of glioma via MYCN dependent way. *Oncotarget*. 2017;8(28):45224-45233. doi:10.18632/oncotarget.16780

10. Zhong F, Huang T, Leng J. Serum miR-29b as a novel biomarker for glioblastoma diagnosis and prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12(11):4106-4112.

11. Shin J, Shim HG, Hwang T, et al. Restoration of miR-29b exerts anti-cancer effects on glioblastoma. *Cancer Cell Int*. 2017;17:104. doi:10.1186/s12935-017-0476-9

12. Jiang H, Zhang G, Wu JH, et al. Diverse roles of miR-29 in cancer (Review). *Oncology Reports*. 2014;31(4):1509-1516. doi:10.3892/or.2014.3036

Summary

STUDYING MIRNA-29B EXPRESSION LEVEL IN GLIOMA PATIENTS

Gliomas develop from undifferentiated or poorly differentiated glial cells in the brain. Many studies have shown that the pathogenesis of glioma relates to the variable expression levels of miRNAs. miRNA-29b promotes apoptosis and inhibits proliferation in glioma cells. This study aimed to determine miRNA-29b expression level in peripheral blood of glioma patients. The expression of miRNA-29b was detected in plasma from 62 post-operative gliomas and 62 healthy controls using realtime-PCR technique. The results showed that the expression level of miRNA-29b was not different between gliomas and controls. We found no correlation between miRNA-29b and characteristics of glioma group.

Keywords: Gliomas, miRNA-29b, realtime-PCR.