

ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN MIRNA-20A TRÊN BỆNH NHÂN U THẦN KINH ĐỆM

Hứa Thị Kim Anh¹, Nguyễn Thu Thúy¹, Trần Văn Khánh¹, Nguyễn Đức Liên²
Nguyễn Văn Linh², Lê Thị Phương¹, Phạm Lê Anh Tuấn¹, Nguyễn Hoàng Việt¹
Nguyễn Văn Duy³ và Kiều Đình Hùng^{1,✉}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện K

³Bệnh viện Phổi Trung ương

U thần kinh đệm (UTKĐ) là khối u não nguyên phát hình thành do sự phát triển bất thường từ tế bào thần kinh đệm chưa biệt hóa hoặc biệt hóa thấp trong não. Nhiều nghiên cứu cho thấy sự điều hòa tăng cường biểu hiện miR-20a có liên quan đến giai đoạn tiến triển bệnh, khả năng sống sót kém và tử vong cao của bệnh nhân u thần kinh đệm sau phẫu thuật. Mức độ biểu hiện của miR-20a được xác định trên mẫu huyết tương của 62 bệnh nhân u thần kinh đệm sau phẫu thuật loại bỏ khối u và đối chứng bằng kỹ thuật RT-PCR. Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện miR-20a ở nhóm u thần kinh đệm ($0,264 \pm 0,342$) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($0,659 \pm 0,841$), với $p < 0,001$. Điều này gợi ý mối liên quan giữa sự giảm mức độ biểu hiện miR-20a với bệnh u thần kinh đệm.

Từ khóa: U thần kinh đệm, miR-20a, mức độ biểu hiện

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

U thần kinh đệm (UTKĐ) là khối u nguyên phát phổ biến nhất của não và tủy sống. Theo phân loại của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) năm 2007, các nhóm u thần kinh đệm chính bao gồm u tế bào hình sao (WHO độ II), u tế bào ít nhánh (WHO độ III), u nguyên bào thần kinh đệm (WHO độ IV). Dạng u thần kinh đệm độ cao phổ biến và ác tính nhất là u nguyên bào thần kinh đệm (Glioblastoma – UNBTKĐ), tiền thân của chúng chủ yếu từ dòng sao bào đệm (Astrocytoma) và tế bào thần kinh đệm ít nhánh (Oligodendroglioma).¹ Do đặc tính xâm lấn, sự đa dạng cả về nguồn gốc tế bào, biến đổi phân tử và đáp ứng với môi trường vi mô ngay cả trong cùng một khối u, đây được coi là loại u não ác tính nhất và tiên lượng xấu.

Bệnh tiến triển rất nhanh, bệnh nhân UNBTKĐ có thời gian sống trung bình chỉ 15 tháng ngay cả khi được điều trị tích cực bằng phẫu thuật cắt bỏ tối đa và hóa xạ trị hỗ trợ, tỷ lệ bệnh nhân có thời gian sống trên 5 năm ít hơn 5%.² Chẩn đoán xác định u thần kinh đệm hiện nay chủ yếu nhờ vào giải phẫu mô bệnh học sau khi đã can thiệp lấy mẫu bệnh phẩm. Bởi vậy, việc tìm ra một dấu ấn sinh học để chẩn đoán sớm và không xâm lấn là một vấn đề rất cần thiết và được quan tâm nghiên cứu.

MicroRNA (miRNA) là các phân tử RNA không mã hóa, chuỗi đơn, dài khoảng 22 nucleotide, điều hòa biểu hiện gen sau phiên mã bằng cách ức chế dịch mã hoặc làm mất ổn định các bản phiên mã mRNA. miRNA có thể đóng vai trò như một gen gây ung thư hoặc cũng có thể là gen ức chế khối u.³ Nhiều nghiên cứu trên thế giới chỉ ra sự biểu hiện bất thường của miR-20a trên tế bào u thần kinh đệm có liên quan đến nhiều con đường tín hiệu, bao gồm

Tác giả liên hệ: Kiều Đình Hùng

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: kieudinhhung@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 05/01/2024

Ngày được chấp nhận: 22/01/2024

quá trình tăng sinh tế bào, kháng quá trình chết theo chương trình, sự tự thực bào, quá trình xâm lấn và di căn, tạo mạch và kháng thuốc.⁴⁻⁶ Phân tích biểu hiện miR-20a trong mô thần kinh đệm và huyết thanh đã phát hiện sự điều hòa tăng cường biểu hiện miR-20a có liên quan đến giai đoạn tiến triển bệnh của u thần kinh đệm, khả năng sống sót kém và tử vong cao.⁷⁻⁹ Điều này mở ra một hướng nghiên cứu mới về vai trò của dấu ấn sinh học trong chẩn đoán sớm và theo dõi điều trị bệnh u thần kinh đệm ở Việt Nam. Do vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này với mục tiêu: Đánh giá mức độ biểu hiện của miR-20a huyết tương ở bệnh nhân u thần kinh đệm sau phẫu thuật và mối liên quan với một số đặc điểm u thần kinh đệm.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tiêu chuẩn chọn mẫu

Nhóm bệnh gồm 62 bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định là u thần kinh đệm dựa trên kết quả khám lâm sàng và kết quả giải phẫu mô bệnh học sau phẫu thuật lấy u tại Bệnh viện K và Bệnh viện Việt Đức, từ tháng 2/2013 đến tháng 11/2023. Nhóm chứng gồm 62 người khỏe mạnh đến kiểm tra sức khỏe tại Bệnh viện Trường Đại học Y Hà Nội, có tuổi và giới tương ứng với nhóm bệnh, với khoảng tuổi chênh lệch so với nhóm bệnh cho phép là ± 3 tuổi và tình trạng sau khám sức khỏe là khỏe mạnh bình thường.

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 miRNA.

Quy trình thực hiện

miRNA được tách chiết bằng kit miRNeasy Serum/Plasma (QIAGEN - Đức) theo quy trình tách chiết 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 miRNA đạt tiêu chuẩn về nồng độ và độ tinh sạch được sử dụng để tổng hợp cDNA. cDNA được tổng hợp bằng bộ hóa chất TaqMan® Advanced miRNA Assays (Appliedbiosystems - Mỹ). 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) được sử dụng để xác định mức độ biểu hiện của miRNA-20a.

Kết quả Realtime PCR của mẫu bệnh và mẫu chứng được phân tích bằng phương pháp so sánh mức độ biểu hiện dựa trên sự khác biệt Ct sử dụng $Ct\ 2^{-\Delta\Delta Ct}$ của Livak. *U361* được sử dụng như gen nội chuẩn để so sánh mức độ biểu hiện của miRNA trên mẫu bệnh và mẫu chứng. Số liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS 20.0 và PRISM 8,0. Sự khác biệt về mức độ biểu hiện miR-20a giữa nhóm chỉ số nghiên cứu được đánh giá bằng kiểm định T test, One-Way ANOVA, giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

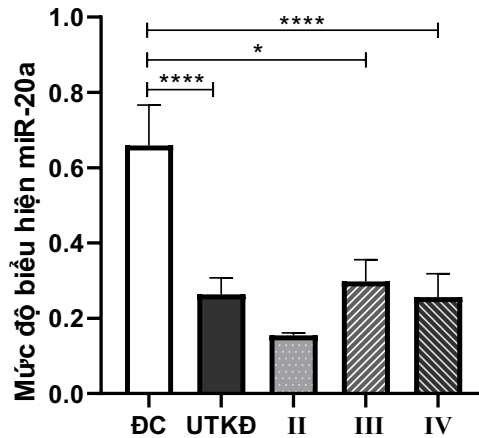
3. Đạo đức nghiên cứu

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

Nghiên cứu được tiến hành trên 62 mẫu u thần kinh đệm có tuổi trung bình nhóm là $49,81 \pm 16,33$ và 62 mẫu đối chứng có tuổi trung bình là $50,4 \pm 15,15$, không có sự khác biệt về tuổi trung bình giữa hai nhóm với $p = 0,833$. Hai nhóm nghiên cứu đều có tỉ lệ nam là 46,77% và tỉ lệ nữ là 53,23%. Kết quả xác định mức độ

biểu hiện của miRNA-20a trên các mẫu u thần kinh đệm và mẫu chứng tương ứng bằng kỹ thuật RT-PCR cho thấy, mức độ biểu hiện của miRNA-20a ở nhóm u thần kinh đệm là $0,264 \pm 0,342$, thấp hơn so với nhóm chứng là $0,659 \pm 0,841$ và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ (biểu đồ 1).



Biểu đồ 1. Mức độ biểu hiện của miR-20a của nhóm u thần kinh đệm và đối chứng

Một số đặc điểm của nhóm bệnh nhân u thần kinh đệm được thể hiện ở bảng 1. Trong đó, tỉ lệ bệnh nhân dưới 50 tuổi là 41,9% và trên 50 tuổi là 58,1%. Tỉ lệ bệnh nhân nam và nữ trong nhóm lần lượt là 46,8% và 53,2%. Tỉ lệ các cấp độ u thần kinh đệm (WHO) gồm: nhóm cấp độ IV (40 mẫu u nguyên bào thần

kinh đệm) chiếm tỉ lệ cao nhất là 64,5%, nhóm cấp độ III (19 mẫu) chiếm 30,6% và nhóm cấp độ II (3 mẫu) chỉ có 4,8%. Mối liên quan giữa các đặc điểm này của nhóm u thần kinh đệm với mức độ biểu hiện miR-20a cũng được đánh giá, kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện miR-20a với các đặc điểm của nhóm bệnh nhân u thần kinh đệm

	Số lượng (n = 62)	Mức độ biểu hiện miR-20a	p
Tuổi			0,519
< 50	26 (41,9%)	0,203 ± 0,103	
≥ 50	36 (58,1%)	0,308 ± 0,442	
Giới			0,980
Nam	29 (46,8%)	0,283 ± 0,457	
Nữ	33 (53,2%)	0,247 ± 0,208	

	Số lượng (n = 62)	Mức độ biểu hiện miR-20a	p
Cấp độ u thần kinh đệm			0,249
II	3 (4,8%)	0,155 ± 0,010	
III	19 (30,6%)	0,298 ± 0,246	
IV	40 (64,5%)	0,256 ± 0,389	

Khi so sánh giữa mức độ biểu hiện miR-20a của hai nhóm bệnh nhân u thần kinh đệm < 50 tuổi ($0,203 \pm 0,103$) và ≥ 50 tuổi ($0,308 \pm 0,442$) thì không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, với $p = 0,519$. Tương tự, không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh mức độ biểu hiện của miR-20a giữa hai nhóm giới tính nam và nữ, với $p = 0,980$. Mức độ biểu hiện của miR-20a giữa các cấp độ u thần kinh đệm (II, III, IV) cũng không khác nhau có ý nghĩa thống kê với $p = 0,249$. Ngoài ra, khi so sánh sự biểu hiện của miR-20a giữa từng nhóm cấp độ u thần kinh đệm với nhóm đối chứng cho thấy, có sự khác nhau giữa nhóm chứng với nhóm cấp độ III ($p = 0,015$) và nhóm cấp độ IV ($p < 0,0001$) (biểu đồ 1).

IV. BÀN LUẬN

U thần kinh đệm là khối u có tính xâm lấn cao của hệ thống thần kinh ở người. Việc sử dụng các miRNA như dấu ấn sinh học, công cụ giúp chẩn đoán và tiên lượng bệnh không xâm lấn ngày càng được chú trọng nghiên cứu. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc sử dụng miRNA lưu hành trong máu là dấu ấn sinh học cho u thần kinh đệm bởi vì miRNA đóng vai trò quan trọng như một gen gây ung thư hoặc chất ức chế khối u. Phân tử miRNA tham gia vào quá trình điều hòa âm sự biểu hiện gen đích bằng cách gắn vào vùng 3' không dịch mã (3'UTR) của mRNA làm cho mRNA bị phân hủy hoặc bất hoạt sự dịch mã của mRNA.³

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh miR-20a làm tăng cường quá trình tế bào chết theo

chương trình, tăng sự phát triển tế bào ung thư và tăng sự xâm lấn, phát triển mạch máu quanh khối u bằng nhiều cơ chế tác động khác nhau. Theo nghiên cứu của Zhou và cộng sự (2015), sự kim hãm hoạt động của gen DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) dẫn đến tình trạng kháng temozolomide trong các tế bào u thần kinh đệm gây dimethyl hóa vùng promoter của miR-20a. Do đó, gây ra sự tăng cường biểu hiện miR-20a và sự kháng hóa chất của tế bào u thần kinh đệm. Nguyên nhân là do sự tăng cường biểu hiện quá mức của miR-20a có tác động ức chế lên sự phiên mã và tổng hợp protein LRIG1 (leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1). LRIG1 được chứng minh có chức năng như một chất ức chế thụ thể Tyrosine kinase và là gen ức chế khối u, có thể liên quan đến tình trạng kháng temozolomide trong hóa trị u thần kinh đệm. Tăng biểu hiện quá mức của DNMT1 tăng tỉ lệ tế bào ở pha G1 và giảm tỉ lệ tế bào ở pha S từ đó làm thúc đẩy quá trình apoptosis của tế bào.⁶ Nghiên cứu của Wang Z và cộng sự (2015) cho thấy, miR-20a tăng cường khả năng xâm lấn của tế bào gốc u thần kinh đệm bằng cách tác động trực tiếp vào gen đích Tissue Inhibitor of Metallopeptidase 2 (TIMP-2). miR-20a điều chỉnh sự biểu hiện TIMP-2 bằng cách can thiệp vào vùng 3'UTR của gen TIMP-2. Gen TIMP-2 có chức năng ức chế sự phát triển, xâm lấn của khối u.⁴ Từ đó, cho thấy miR-20a có thể là mục tiêu tiềm năng cho phương pháp điều trị u thần kinh đệm bằng cách kiểm soát sự xâm lấn của khối u. Nghiên cứu của Zhao và cộng

sự (2017) phát hiện ra rằng nồng độ miR-20a trong huyết thanh tăng cao có liên quan đến khả năng sống sót kém, với xác suất sống sót không bệnh trong 2 năm là thấp và cũng liên quan đáng kể đến tăng nguy cơ tử vong.⁹ Điều đó cho thấy, xu hướng tăng biểu hiện của miR-20a trong u thần kinh đệm là một yếu tố tiên lượng xấu cho cả chất lượng và thời gian sống thêm của bệnh nhân.

Nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện được suy giảm mức độ biểu hiện của miR-20 trong huyết thanh bệnh nhân u thần kinh đệm sau khi phẫu thuật lấy u so với đối chứng người khỏe mạnh. Trong đó, bệnh nhân u thần kinh đệm cấp độ IV có mức giảm biểu hiện miR-20 (so với mẫu chứng) nhiều hơn bệnh nhân u thần kinh đệm cấp độ III (so với mẫu chứng). Tuy nhiên, không có sự khác nhau về mức độ biểu hiện giữa 3 nhóm cấp độ u thần kinh đệm trong nghiên cứu. Mẫu máu bệnh nhân u thần kinh đệm trong nghiên cứu được lấy sau khi bệnh nhân đã phẫu thuật 7 - 10 ngày nên trong khoảng thời gian đó đã làm cho nồng độ miR-20a thay đổi so với trước khi phẫu thuật. Kết quả này cũng phù hợp với kết nghiên cứu của Zhi và cộng sự (2015) trên 73 bệnh nhân u tế bào hình sao, sau phẫu thuật cắt bỏ khối u và được lấy máu để đánh giá độ biểu hiện của miR-20a cho thấy có xu hướng giảm so với mức biểu hiện của miR-20a cũng của những bệnh nhân đó trước khi thực hiện phẫu thuật ($p < 0,0001$).⁸ Đồng thời, nghiên cứu của Zhi và cộng sự công bố rằng sự điều chỉnh tăng nồng độ miR-20a trong huyết thanh bệnh nhân u tế bào sao có liên quan đến các giai đoạn tiến triển của các cấp độ ác tính của khối u theo phân loại WHO ($p = 0,0366$), tuy nhiên cũng chưa rõ ràng về cơ chế tăng miR-20a qua các giai đoạn tiến triển lâm sàng của bệnh.⁷ Nghiên cứu của Yu (2018) trên 35 bệnh nhân nhi bị u nguyên bào não lại phát hiện mức độ biểu hiện của miR-20a bị giảm đáng kể ở giai đoạn III

và IV so với giai đoạn I.⁸ Như vậy, khi nghiên cứu sự thay đổi miRNA giữa các nhóm u thần kinh đệm và các giai đoạn tiến triển khác nhau của chúng, kết quả vẫn còn chưa nhất quán giữa các nghiên cứu khác nhau. Do đó, cần tiến hành thêm nghiên cứu khác để khẳng định mức độ biểu hiện của miR-20a trong u thần kinh đệm và đặc biệt là trước và sau khi thực hiện phẫu thuật. Mỗi liên quan giữa mức biểu hiện miR-20a và các yếu tố tuổi, giới tính của nhóm u thần kinh đệm cũng được đánh giá, nhưng nghiên cứu không tìm thấy mối liên quan nào. Kết quả này tương tự với kết quả trong nghiên cứu của Zhi và cộng sự (2015) khi đánh giá mức độ biểu hiện miR-20a theo các nhóm tuổi và giới tính.⁷

V. KẾT LUẬN

Mức độ biểu hiện của miR-20a giảm ở huyết tương của bệnh nhân u thần kinh đệm sau phẫu thuật lấy u so với nhóm chứng, có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Điều này cho thấy có mối liên quan giữa sự giảm mức độ biểu hiện của miR-20a với bệnh u thần kinh đệm sau phẫu thuật lấy u. Kết quả này có thể có ý nghĩa trong theo dõi điều trị bệnh 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, Bệnh viện K, Bệnh viện Trường Đại học Y Hà Nội đã cung cấp mẫu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*. 2008; 321(5897): 1807. doi:10.1126/science.1164382.
2. Aum DJ, Kim DH, Beaumont TL, Leuthardt EC, Dunn GP, Kim AH. Molecular

and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma. *Neurosurg Focus*. 2014; 37(6): E11. doi:10.3171/2014.9.FOCUS14521.

3. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function - ScienceDirect. Accessed January 4, 2024. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404000455>.

4. Wang Z, Wang B, Shi Y, et al. Oncogenic miR-20a and miR-106a enhance the invasiveness of human glioma stem cells by directly targeting TIMP-2. *Oncogene*. 2015; 34(11): 1407-1419. doi:10.1038/onc.2014.75.

5. Liao C, Chen W, Wang J. MicroRNA-20a Regulates Glioma Cell Proliferation, Invasion, and Apoptosis by Targeting CUGBP Elav-Like Family Member 2. *World Neurosurgery*. 2019; 121: e519-e527. doi:10.1016/j.wneu.2018.09.155.

6. Zhou D, Wan Y, Xie D, et al. DNMT1 mediates chemosensitivity by reducing

methylation of miRNA-20a promoter in glioma cells. *Exp Mol Med*. 2015; 47(9): e182-e182. doi:10.1038/emmm.2015.57.

7. Zhi F, Shao N, Wang R, et al. Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma. *Neuro Oncol*. 2015; 17(3): 383-391. doi:10.1093/neuonc/nou169.

8. Yu Y, Zhang J, Jin Y, et al. MiR-20a-5p suppresses tumor proliferation by targeting autophagy-related gene 7 in neuroblastoma. *Cancer Cell International*. 2018; 18(1): 5. doi:10.1186/s12935-017-0499-2.

9. Zhao H, Shen J, Hodges TR, Song R, Fuller GN, Heimberger AB. Serum microRNA profiling in patients with glioblastoma: a survival analysis. *Mol Cancer*. 2017; 16: 59. doi:10.1186/s12943-017-0628-5.

Summary

EVALUATION OF MIRNA-20A EXPRESSION LEVEL IN GLIOMA PATIENTS

Glioma is a primary brain tumor driven from abnormal growth of poorly differentiated or anaplastic glial cells. Many studies have shown that upregulated expression of miR-20a is related to disease progression, poor survival and high mortality of glioma. This study aimed to evaluate miR-20a expression level in the peripheral blood of glioma patients after surgery. The expression level of miR-20a of 62 post-operative gliomas and 62 healthy controls was quantified by Realtime-PCR technique. The results showed that miR-20a expression level was significantly lower in the glioma group (0.264 ± 0.342) than that in control group (0.659 ± 0.841) ($p < 0.001$). This data suggests a relation between the decrease of miR-20 expression level and glioma.

Keywords: Gliomas, miR-20a, expression level.