

MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN MIR-125B TRÊN BỆNH NHÂN U THẦN KINH ĐỆM

Đỗ Thị Chi¹, Nguyễn Thu Thúy¹, Trần Văn Khánh¹

Lê Thị Phương¹, Đồng Văn Hệ²

Nguyễn Đức Liên³ và Kiều Đình Hùng^{1,✉}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức

³Bệnh viện K

U thần kinh đệm là khối u ác tính xuất phát từ nhu mô não, việc chẩn đoán sớm và điều trị đích đến nay vẫn là một bài toán đối với y học hiện đại. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh miRNA có ý nghĩa quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của u thần kinh đệm, trong đó miR-125b hoạt động như một gen gây ung thư với mức độ biểu hiện cao nhất trong mô não hứa hẹn trở thành một dấu ấn sinh học hữu hiệu có thể hỗ trợ trong chẩn đoán và điều trị. Nghiên cứu này nhằm tìm hiểu mức độ biểu hiện của miR-125b trong huyết tương 62 bệnh nhân được chẩn đoán xác định là u thần kinh đệm và 62 người chứng khỏe mạnh. Kết quả cho thấy: mức độ biểu hiện miR-125b thấp hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm u thần kinh đệm ($0,77 \pm 1,318$) so với nhóm chứng ($1,165 \pm 1,404$) ($p < 0,001$) và ở nhóm bệnh nhân dưới 50 tuổi ($0,318 \pm 0,312$) so với nhóm trên 50 tuổi ($1,143 \pm 1,678$) ($p = 0,01$). Điều này cho thấy có mối liên quan giữa sự giảm mức độ biểu hiện miR-125b với bệnh u thần kinh đệm và tuổi của người bệnh.

Từ khóa: U thần kinh đệm, miR-125b, Realtime - PCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

U thần kinh đệm (UTKĐ) là khối u nội sọ ác tính nguyên phát phổ biến nhất xuất phát từ tế bào thần kinh đệm não và tủy sống.¹ Tỷ lệ UTKĐ chiếm khoảng 60% tổng các khối u nội sọ, hầu hết chúng xâm lấn lan tỏa vào các mô não xung quanh và rất khó cắt bỏ hoàn toàn.² Trong phân loại u não hiện nay của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), UTKĐ được phân loại từ cấp I đến IV, tương đương với mức độ ác tính tăng dần.³ Khoảng một nửa số UTKĐ ở người trưởng thành là u nguyên bào thần kinh đệm (Glioblastoma - GBM). GBM còn được gọi là u tế bào hình sao độ IV, cũng là loại ác tính

nhất theo phân loại của WHO.⁴ Tỷ lệ mắc u não nguyên phát ở Hoa Kỳ được ước tính là 10 trên 100.000 người mỗi năm, nam hay gặp hơn nữ. UTKĐ hay gặp nhất ở độ tuổi trung niên, khoảng từ 40 đến 65 tuổi.⁵ Thời gian sống sót của người bệnh sau phẫu thuật rất ngắn dù có được điều trị tích cực.

MiRNA (microRNA) là các RNA sợi đơn nhỏ, không mã hóa, có chiều dài 21 - 25 nucleotide, chúng có khả năng liên kết với vùng không dịch mã đầu 3' (3' UTR) của mRNA, dẫn đến sự phân hủy của mRNA và ức chế quá trình dịch mã. MiRNA điều chỉnh sự biểu hiện của mRNA các gen đích. Do đó, sự biểu hiện quá mức hoặc dưới mức của miRNA dẫn đến điều hòa tăng hoặc giảm sản phẩm protein của mRNA đích. Đây có thể là nguyên nhân gây ung thư nếu mục tiêu của miRNA là gen gây ung thư hoặc chất ức chế khối u. Các nghiên cứu đã chứng

Tác giả liên hệ: Kiều Đình Hùng

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: kieudinhhung@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 31/05/2024

Ngày được chấp nhận: 20/06/2024

minh rằng rối loạn biểu hiện của miR125b xảy ra trong nhiều bệnh ung thư. MiR125b nhắm gen đích *A20* được điều chỉnh tăng trong ung thư biểu mô vòm họng.⁶ Trong ung thư dạ dày, miR125b nhắm các gen đích *STARD13*, *NEU1*, *PPP1CA* có sự gia tăng mức độ biểu hiện. Trong u thư bàng quang, miR-125b hoạt động như một chất ức chế khối u, biểu hiện miR-125b giảm đáng kể và sự biểu hiện quá mức của nó sẽ ức chế sự tăng sinh của các tế bào T24 bằng cách nhắm gen đích *SphK1*.⁷ Sự biểu hiện quá mức của miR-125b có liên quan đáng kể đến việc giảm biểu hiện *HMGA1*, khả năng sống sót và tiên lượng trong ung thư cổ tử cung.⁸ MiR-125b được chứng minh có khả năng ức chế phiên mã và dịch mã gen *p53* - một gen ức chế khối u có vai trò kiểm soát sự phân chia tế bào và sửa chữa DNA. MiR-125b liên kết trực tiếp với vùng 3'-UTR của mRNA gen *p53*, đồng thời ức chế mức biểu hiện protein *p53* theo cách phụ thuộc vào vị trí gắn kết của nó trong vùng 3' UTR. Sự biểu hiện quá mức của miR-125b sẽ ức chế protein *p53* nội sinh và ức chế quá trình apoptosis trong tế bào u nguyên bào thần kinh.⁹ Ngoài gen đích *p53*, miR-125b còn nhắm vào các chất điều hòa chu kỳ tế bào như kinase phụ thuộc cyclin 6 (*CDK6*) và chu kỳ phân chia tế bào 25A (*CDC25A*), từ đó ảnh hưởng đến sự tăng sinh tế bào gốc thần kinh đệm.¹⁰ Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm tìm hiểu mức độ biểu hiện của miR-125b trong huyết tương bệnh nhân UTKĐ sau phẫu thuật cắt khối u bằng kỹ thuật Realtime - PCR.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tiêu chuẩn chọn mẫu

Nhóm UTKĐ gồm 62 bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc UTKĐ dựa trên kết quả khám lâm sàng và kết mô bệnh học sau phẫu thuật lấy u tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức và

Bệnh viện K. Nhóm chứng gồm 62 người khỏe mạnh tham gia khám sức khỏe tại bệnh viện Đại học Y Hà Nội, độ tuổi và giới tính tương đồng với nhóm bệnh.

Tiêu chuẩn loại trừ

Có khối u di căn não, có tiền sử mắc ung thư hoặc các bệnh lý khác.

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: mô tả cắt ngang. Nghiên cứu được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu Gen và Protein Trường đại học Y Hà Nội, Khoa phẫu thuật thần kinh - Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, Khoa Ngoại Thần kinh - Bệnh viện K, thời gian từ tháng 1/2023 đến tháng 11/2023.

Chọn mẫu: Mẫu được lấy thuận tiện. Nhóm bệnh và nhóm chứng tương ứng nhau về độ tuổi trung bình và tỉ lệ giới tính. Lấy 3mL máu toàn phần chống đông EDTA của mỗi đối tượng nghiên cứu, ly tâm 3000 vòng/phút trong 3 phút tách huyết tương, bảo quản -80°C để sử dụng cho quá trình tách chiết miRNA.

Quy trình thực hiện

MiRNA được tách chiết bằng bộ kit miRNeasy Serum/Plasma (QIAGEN - Đức). Quy trình tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất. MiRNA sau khi tách chiết được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp đo mật độ quang trên máy Nanodrop. Mẫu đạt tiêu chuẩn OD260nm/280nm = 1,8 - 2,0 được sử dụng cho bước tiếp theo. cDNA được tổng hợp bằng hóa chất TaqMan® Advanced miRNA Assays (Appliedbiosystems - Mỹ). Mức độ biểu hiện miR-125b 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.¹¹ *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-125b 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

Bảng 1. Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	Nhóm UTKĐ	Nhóm chứng	p
Tuổi (trung bình \pm độ lệch chuẩn)	49,81 \pm 16,33	49,39 \pm 15,85	0,884
Giới tính (n, %)	Nam	29 (46,77%)	0,683
	Nữ	33 (53,23%)	

Một số đặc điểm của nhóm nghiên cứu được thể hiện ở bảng 1. Độ tuổi trung bình của nhóm UTKĐ là 49,81 \pm 16,33, nhóm chứng là 49,39 \pm 15,85, không có sự khác biệt về tuổi trung bình giữa 2 nhóm với $p = 0,884$ (Bảng 1).

Không thấy sự khác biệt về tỉ lệ giới tính nam và nữ ở cả 2 nhóm UTKĐ và nhóm chứng ($p = 0,683$) với tỉ lệ 46,77% bệnh nhân nam và 53,23% bệnh nhân nữ.

Bảng 2. Mức độ biểu hiện miR-125b theo nhóm UTKĐ và nhóm chứng

	Nhóm UTKĐ	Nhóm chứng	p
Mức độ biểu hiện	0,770 \pm 1,318	1,165 \pm 1,404	< 0,001

Kết quả xác định mức độ biểu hiện miR-125b trên 2 nhóm mẫu nghiên cứu (bảng 2) cho thấy, mức độ biểu hiện của miR-125b ở nhóm bệnh nhân UTKĐ là 0,770 \pm 1,318, ở

nhóm người khỏe mạnh là 1,165 \pm 1,404. Kết quả mức độ biểu hiện miR-125b ở nhóm UTKĐ thấp hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

Bảng 3. Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện miR-125b và các đặc điểm của nhóm UTKĐ

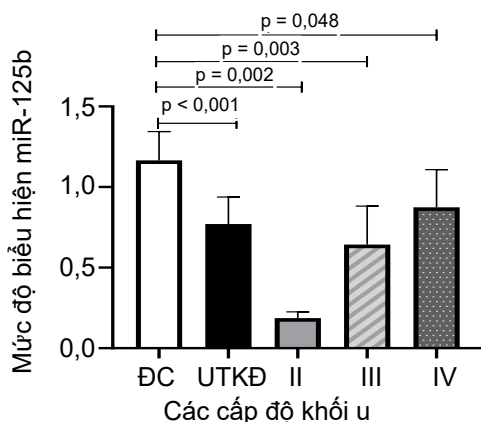
	Số lượng (n, %)	Mức độ biểu hiện miR-125b	p
Tuổi	< 50	0,318 \pm 0,312	0,010
	\geq 50	1,143 \pm 1,678	
Giới	Nam	0,855 \pm 1,22	0,987
	Nữ	0,696 \pm 1,129	

	Số lượng (n, %)	Mức độ biểu hiện miR-125b	p
Cấp độ khối u			
II	3 (4,84%)	0,186 ± 0,068	0,528
III	19 (30,65%)	0,642 ± 1,044	
IV	40 (64,11%)	0,875 ± 1,473	

Theo bảng 3, mức độ biểu hiện miR-125b ở nhóm bệnh nhân dưới 50 tuổi ($0,318 \pm 0,312$) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm trên 50 tuổi ($1,143 \pm 1,678$) với $p = 0,010$. Mức độ biểu hiện miR-125b ở 2 nhóm bệnh nhân nam và nữ lần lượt là $0,855 \pm 1,522$ và $0,696 \pm 1,129$, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,987$. 62 bệnh nhân trong nghiên cứu được chẩn đoán thuộc 3 trong 4 cấp độ UTKĐ theo phân loại của WHO, gồm 3 bệnh nhân cấp độ II (4,84%), 19 bệnh nhân cấp độ III (30,65%)

và 40 bệnh nhân cấp độ IV (64,51%). Mức độ biểu hiện miR-125b ở nhóm khối u cấp độ II là thấp nhất ($0,186 \pm 0,068$), tiếp theo là cấp độ III ($0,642 \pm 1,044$), cao nhất là cấp độ IV ($0,875 \pm 1,473$), tuy nhiên sự khác biệt giữa các nhóm cấp độ u không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,528$).

Khi so sánh mức độ biểu hiện miR-125b theo các cấp độ II, III, IV với nhóm đối chứng tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p lần lượt là 0,048; 0,003 và 0,002, kết quả được thể hiện ở biểu đồ 1.



Biểu đồ 1. Mức độ biểu hiện miR-125b theo các cấp độ khối u

IV. BÀN LUẬN

U thần kinh đệm đến nay vẫn là vấn đề nhức nhối của y học hiện đại do mức độ ác tính, khó khăn trong chẩn đoán và điều trị. Tỷ lệ tử vong cao của UTKĐ được cho là có liên quan đến việc chẩn đoán ở giai đoạn muộn, nhất là u nguyên bào thần kinh đệm. Những nghiên cứu gần đây gợi ý miRNA có thể trở thành một dấu ấn sinh học chỉ điểm ung thư tiềm năng nhằm

phục vụ chẩn đoán sớm và điều trị đích, đặc biệt với UTKĐ do khả năng ức chế hoặc tăng cường mức độ điều hòa nhắm đến các gen gây ung thư.¹²

MiR-125b là một thành viên của miRNA, những nghiên cứu gần đây chứng minh miR-125b tham gia điều hòa các gen *NF-κB*, *p53*, *PI3K/Akt/mTOR*, *ErbB2*, *Wnt* và các con đường

truyền tín hiệu khác, từ đó kiểm soát sự tăng sinh, biệt hóa, trao đổi chất, apoptosis, kháng thuốc và miễn dịch khối u.¹³

Theo Xia và cộng sự (2009), miR-125b được coi như một gen gây ung thư, việc ức chế biểu hiện miR-125b làm giảm sự tăng sinh tế bào UTKĐ ở người và tăng cường độ nhạy cảm của tế bào UTKĐ đối với quá trình apoptosis do ATRA (all trans retinoic acid - một dẫn xuất vitamin A) gây ra.¹⁴ Nghiên cứu của Shi và cộng sự (2011) cho thấy sự điều hòa tăng biểu hiện miR-125b góp phần vào tăng sinh tế bào thần UTKĐ đồng thời gây ra những lỗi sai trong chu kỳ tế bào. Sự biểu hiện quá mức miR-125b có thể khiến tế bào gốc u nguyên bào thần kinh đệm kháng temozolomide - một tác nhân hóa trị liệu đầy hứa hẹn để điều trị u nguyên bào thần kinh đệm.¹⁵ Việc ức chế biểu hiện miR-125b có thể tăng cường độ nhạy cảm của u nguyên bào thần kinh đệm với temozolomide bằng cách nhắm gen đích *PIAS3* vào sự xâm lấn tế bào. Từ đó có thể thấy được tiềm năng của miR-125b trong điều trị đích UTKĐ. Kết quả của hai nghiên cứu này khá tương đồng với nghiên cứu của Li và cộng sự (2016), miR-125b cũng được tăng cường biểu hiện trên mẫu mô UTKĐ.¹⁶ Nghiên cứu này còn nhận thấy sự tăng mức độ biểu hiện miR-125b có liên quan chặt chẽ đến tiên lượng xấu và đáp ứng điều trị kém của bệnh nhân. Điều này khác biệt với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, mức độ biểu hiện của miR-125b trong huyết tương bệnh nhân UTKĐ sau khi đã phẫu thuật lấy u (từ 7 - 10 ngày) giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng khỏe mạnh. Tương tự, nghiên cứu của Wei và cộng sự (2014) tại Trung Quốc được thực hiện trên 33 mẫu huyết tương UTKĐ sau phẫu thuật so với 33 mẫu đối chứng cũng cho thấy sự giảm biểu hiện miR-125b ở nhóm UTKĐ và có mối liên quan chặt chẽ với mức độ ác tính tăng dần của khối u (I, II, III/IV).¹⁷

Nghiên cứu của Regazzo và cộng sự (2016) cũng đã chỉ ra miR-125b được điều hòa giảm ở mẫu huyết thanh bệnh nhân UTKĐ và miR-125b rất có ý nghĩa trong việc phân biệt UTKĐ cấp độ IV (GBM) với các cấp độ thấp khác.¹⁸ Trong nghiên cứu của chúng tôi mức độ biểu hiện miR-125b có xu hướng tăng theo cấp độ ác tính của khối u nhưng chưa có ý nghĩa thống kê, nguyên nhân có thể do số lượng mẫu UTKĐ cấp độ II và III nhỏ. Nghiên cứu cũng không tìm thấy mối liên quan giữa mức độ biểu hiện miR-125b với yếu tố giới tính, tuy nhiên lại tìm thấy có sự khác biệt biểu hiện miR-125b ở nhóm bệnh nhân dưới 50 tuổi và trên 50 tuổi. Đây có thể gợi ý mối quan hệ giữa miR-125b với mức độ, tiên lượng bệnh ở hai nhóm tuổi. Như vậy, mức biểu hiện của miR-125b trong UTKĐ có sự khác nhau tùy thuộc vào các nghiên cứu khác nhau.

V. KẾT LUẬN

Mức độ biểu hiện miR-125b trong huyết tương nhóm bệnh nhân UTKĐ sau phẫu thuật thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm khỏe mạnh. MiR-125b cũng biểu hiện thấp hơn ở nhóm bệnh nhân dưới 50 tuổi so với nhóm trên 50 tuổi. Kết quả này cho thấy có mối liên quan giữa mức độ giảm biểu hiện miR-125b với bệnh UTKĐ và độ tuổi của bệnh nhân. Điều này có thể có ý nghĩa trong theo dõi điều trị bệnh UTKĐ.

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 Hữu nghị Việt Đức, Bệnh viện K, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội đã cung cấp mẫu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Puranik AD, Rangarajan V, Dev ID,

- et al. Brain FET PET tumor-to-white matter ratio to differentiate recurrence from post-treatment changes in high-grade gliomas. *J. Neuroimaging*. 2021;31:1211-1218.
2. M Weller, W Wick, K Aldape, et al. Glioma. *Natrev dis primers*. 2015;1:15017.
 3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109.
 4. David N Louis, Arie Perry, Guido Reifenberger, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2017;401(16):1545-1.
 5. Zülch KJ. *Brain Tumors*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag; 1986. Their biology and pathology.
 6. Zheng Z, Qu JQ, Yi HM, et al. MiR-125b regulates proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma by targeting A20/NF-kappaB signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2017;8(6):e2855.
 7. Zhao X, He W, Li J, et al. MiRNA-125b inhibits proliferation and migration by targeting SphK1 in bladder cancer. *Am J Transl Res*. 2015;7(11):2346-54.
 8. Sun Y, Liu X, Zhang Q, et al. Oncogenic potential of TSTA3 in breast cancer and its regulation by the tumor suppressors miR-125a-5p and miR-125b. *Tumour Biol*. 2016;37(4):4963-4972.
 9. Le MTN, Xie H, Zhou B, et al. MicroRNA-125b Promotes Neuronal Differentiation in Human Cells by Repressing Multiple Targets. *Mol Cell Biol*. 2009;29:52905305.
 10. Shi L, Zhang J, Pan T, et al. MiR-125b is critical for the suppression of human U251 glioma stem cell proliferation. *Brain Res*. 2010;1312:120-126.
 11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
 12. Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int*. 2015;15(38). <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0185-1>.
 13. Wang Y, Zeng G, Jiang Y. The Emerging Roles of miR-125b in Cancers. *Cancer Manag. Res*. 2020;12:1079-1088.
 14. Hong-Fei Xia, Tian-Zhu He, Chun-Mei Liu, et al. MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2009;23(4-6):347-358.
 15. Lei Shi, Shuguang Zhang, Kun Feng, et al. MicroRNA-125b-2 confers human glioblastoma stem cells resistance to temozolomide through the mitochondrial pathway of apoptosis. *Int J Oncol*. 2012;40(1):119-129.
 16. Li X, Zheng J, Chen L, et al. Predictive and prognostic roles of abnormal expression of tissue miR-125b, miR-221, and miR-222 in glioma. *Mol Neurobiol*. 2016; 53: 577-583.
 17. XiangTai Wei, Duo Chen, Tao Lv, et al. Serum MicroRNA-125b as a Potential Biomarker for Glioma Diagnosis. *Mol Neurobiol*. 2016;53(1):163-170.
 18. Regazzo G, Terrenato I, Spagnuolo M, et al. A restricted signature of serum miRNAs distinguishes glioblastoma from lower grade gliomas. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35:124. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0393-0>.

Summary

EXPRESSION LEVEL OF MIR-125B IN GLIOMA PATIENTS

Glioma is malignant tumor originating from the brain parenchyma. Early diagnosis and targeted treatment are still a problem for modern medicine. Many studies have demonstrated that miRNAs are important in the pathogenesis of glioma, in which miR-125b acts as an oncogene with the highest expression level in brain tissue, promising to become an effective biological marker in diagnosis and treatment. This study aimed to evaluate the expression level of miR-125b in plasma of 62 glioma patients and 62 healthy controls. The results showed that the level of expression of miR-125b was significantly lower in the glioma group (0.77 ± 1.318) compared to the control group (1.165 ± 1.404) ($p < 0.001$) and in the group of patients under 50 years old (0.318 ± 0.312) compared to the group over 50 years old (1.143 ± 1.678) ($p = 0.01$). Our data suggests the relation between reduced levels of miR-125b expression and glioma and patient age.

Keywords: Glioma, miR-125b, Realtime - PCR.