

ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN miRNA-29a-5p VÀ MỐI LIÊN QUAN VỚI CÁC ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ GAN, XƠ GAN, VIÊM GAN MẠN DO NHIỄM HBV

Ngô Diệu Hoa¹, Đào Phương Giang², Nguyễn Thị Thanh Huyền¹
Đỗ Thúy Hạnh¹, Nguyễn Thị Hào¹, Đặng Thị Ngọc Dung¹
Đặng Thị Bích³ và NghiêM Xuân Hoàn^{2,✉}

¹Trường Đại Học Y Hà Nội

²Bệnh viện Trung ương Quân Đội 108

³Bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới Trung Ương

Nghiên cứu nhằm đánh giá giá trị chẩn đoán của miRNA-29a-5p trong ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), đặc biệt ở giai đoạn sớm và trên nền bệnh lý gan mạn tính do nhiễm HBV. Thiết kế nghiên cứu mô tả cắt ngang, định lượng miRNA-29a-5p trong huyết thanh bệnh nhân bằng qPCR qua hai giai đoạn: sàng lọc (30 bệnh nhân) và xác nhận (300 bệnh nhân). Kết quả cho thấy miRNA-29a-5p có mức biểu hiện tăng cao có ý nghĩa thống kê ở nhóm HCC so với nhóm viêm gan B và xơ gan, fold-change tương ứng là 2,69 và 2,07, $p < 0,001$. Diện tích dưới đường cong của miRNA-29a-5p ở nhóm HCC so với nhóm viêm gan B mạn tính là $AUC = 0,677$, $p < 0,001$; của nhóm HCC so với xơ gan là 0,758, cao hơn của AFP là 0,729. Trong nhóm bệnh nhân nhiễm HCC, khi so sánh mức độ biểu hiện của miRNA-29a-5p giữa 2 nhóm $AFP \leq 20$ ng/ml và >20 ng/ml, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,032$.

Từ khóa: miRNA, ung thư biểu mô tế bào gan, xơ gan, viêm gan B mạn tính, vi rút viêm gan B.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm vi rút viêm gan B (HBV) mạn tính vẫn là một vấn đề sức khỏe toàn cầu quan trọng khi phải đối mặt với nguy cơ phát triển thành xơ gan, ung thư biểu mô tế bào gan. Trong khoảng 10 - 30 năm, 30% bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính tiến triển thành xơ gan và 70 - 90% các trường hợp xơ gan này sẽ phát triển thành ung thư biểu mô tế bào gan (HCC).^{1,2} Do đó, việc sàng lọc sớm HCC ở những người mắc viêm gan B mạn tính, xơ gan do nhiễm HBV là rất quan trọng, mang lại cơ hội cho bệnh nhân để can thiệp kịp thời thông qua các phương pháp điều trị chính xác. Tuy nhiên trên thực tế, các

phương pháp tầm soát xơ gan và HCC ứng dụng siêu âm và một số dấu ấn sinh học như AFP (đối với HCC) hay một số chỉ số fibroscan, FIB4, APRI (đối với xơ gan) còn có độ nhạy thấp và độ đặc hiệu còn hạn chế.³

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã nhấn mạnh vai trò của microRNA (miRNA) trong bệnh gan, đặc biệt là trong bệnh viêm gan B mạn tính, xơ gan và HCC do nhiễm vi rút viêm gan B. MicroRNAs (miRNAs) là các phân tử RNA có kích thước nhỏ (19 - 24 nucleotid) không mã hóa protein. miRNAs tham gia vào điều hòa hoạt động của gen ở cấp độ sau phiên mã thông qua việc ngăn chặn mRNA dịch mã hoặc gây thoái hóa mRNA. miRNA-29a-5p là một microRNA có vai trò điều hòa mạnh mẽ nhiều tiến trình sinh học liên quan đến ung thư gan như xơ hóa mô gan, ức chế methyl hóa

Tác giả liên hệ: NghiêM Xuân Hoàn

Bệnh viện Trung ương Quân Đội 108

Email: nghiemxuanhoan@108-icid.com

Ngày nhận: 13/05/2025

Ngày được chấp nhận: 11/06/2025

gen, và cảm ứng apoptosis. Các nghiên cứu quốc tế đã chỉ ra rằng miR-29a-5p thường bị giảm biểu hiện trong HCC do HBV, và sự giảm này có thể thúc đẩy quá trình tiến triển khối u.^{3,4} Tại Việt Nam, hiện mới chỉ có số ít nghiên cứu bước đầu về miRNA trong ung thư gan, và chưa có công trình nào tập trung vào miRNA-29a-5p hoặc so sánh hiệu quả chẩn đoán của nó với AFP - marker huyết thanh truyền thống nhưng độ nhạy hạn chế.⁵ Các nghiên cứu gần đây trên thế giới cho thấy, việc kết hợp miR-29a-5p với AFP có thể cải thiện độ chính xác chẩn đoán HCC lên hơn 85%, cho thấy tiềm năng ứng dụng lâm sàng rõ rệt và cần được kiểm chứng trong dân số Việt Nam – nơi tỷ lệ HCC do HBV rất cao. Vì vậy, nghiên cứu của chúng tôi giúp xác định miRNA-29a-5p xác định vai trò của miRNA-29a-5p trong pha xác nhận trong việc hỗ trợ quá trình sàng lọc ung thư biểu mô tế bào gan ở những người có nguy cơ cao.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tiêu chuẩn lựa chọn

Bệnh nhân nhiễm viêm gan B mạn tính theo hướng dẫn chẩn đoán, điều trị bệnh viêm gan vi rút B của Bộ Y tế Việt Nam (quyết định 3310/QĐ-BYT năm 2019).⁶ Bệnh nhân xơ gan được chẩn đoán dựa trên các biểu hiện lâm sàng (hội chứng tăng áp lực tĩnh mạch cửa, hội chứng suy tế bào gan) và cận lâm sàng (siêu âm bụng, xét nghiệm sinh hóa, huyết học, độ đàn hồi của gan được đánh giá bằng Fibroscan). Chỉ số APRI > 1,5, Fib-4 > 3,25. Bệnh nhân HCC được chẩn đoán xác định theo Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị HCC của Bộ Y tế (quyết định 3129/QĐ-BYT năm 2020) dựa trên tiêu chuẩn trên CT scan bụng có cản quang hoặc MRI bụng có tương phản từ kết hợp với nồng độ AFP;⁷ hoặc có bằng chứng giải phẫu bệnh. Phân loại giai đoạn lâm sàng của HCC được thực hiện theo phân loại giai đoạn Ung thư gan Barcelona.⁸

Tiêu chuẩn loại trừ

Bệnh nhân < 18 tuổi, phụ nữ có thai, bệnh nhân xơ gan do rượu, nhiễm HCV hoặc HIV, nhiễm độc gan do thuốc, bệnh nhân mắc các bệnh ung thư khác, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), các bệnh nhân đang điều trị can thiệp gan gần đây (sử dụng TACE, RFA, sorafenib)...

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu

Mô tả cắt ngang, hồi cứu kết hợp tiến cứu.

Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 05/2023 đến tháng 01/2025 (giai đoạn sàng lọc từ tháng 5/2023 đến tháng 4/2024, giai đoạn xác nhận từ tháng 5/2024 đến tháng 10/2024, giai đoạn phân tích từ tháng 11/2024 đến tháng 1/2025).

Địa điểm nghiên cứu

Bệnh viện Trung ương Quân Đội 108, Bệnh viện Nhiệt đới Trung ương.

Cỡ mẫu

Chọn mẫu thuận tiện, pha sàng lọc gồm 30 bệnh nhân, chia làm 3 nhóm 10 bệnh nhân viêm gan B mạn tính, 10 bệnh nhân xơ gan, 10 bệnh nhân HCC do nhiễm vi rút HBV, pha xác nhận gồm 300 bệnh nhân (100 bệnh nhân/nhóm). Cỡ mẫu được tính dựa trên so sánh mức biểu hiện miRNA-29a-5p giữa ba nhóm (HCC, xơ gan, và chứng khỏe mạnh), với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$, độ mạnh thống kê 80% và kích thước hiệu ứng trung bình ($f = 0,25$). Sử dụng phần mềm G*Power cho ANOVA một chiều, cỡ mẫu tối thiểu ước tính khoảng 252 bệnh nhân (~84 bệnh nhân/nhóm). Để tăng độ tin cậy và dự phòng mất mẫu, nghiên cứu lựa chọn tổng cộng 300 bệnh nhân, chia đều 100 bệnh nhân mỗi nhóm.

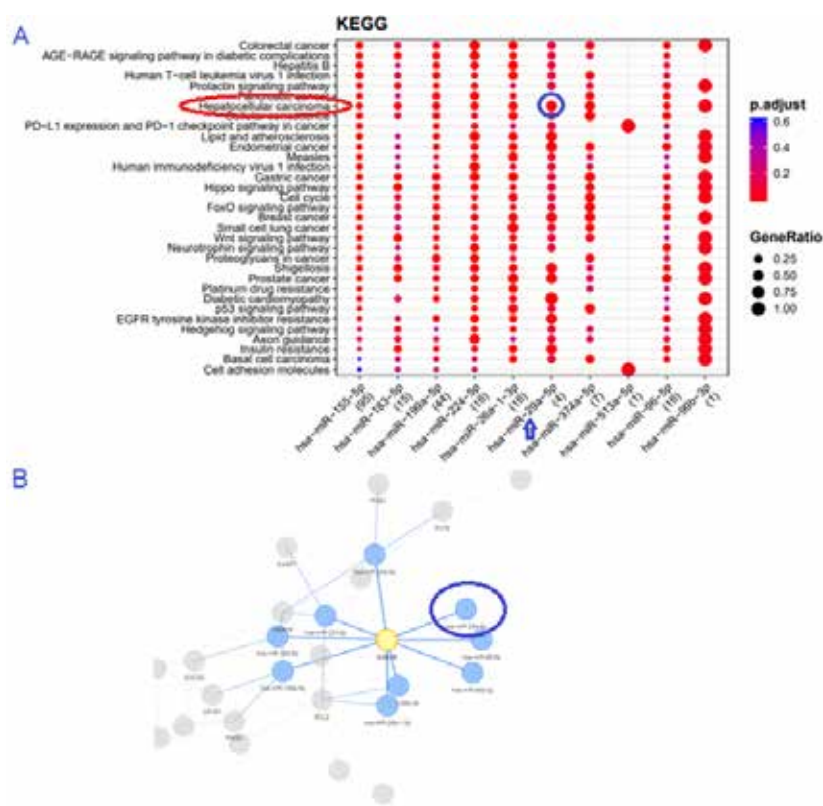
Biến số/chỉ số nghiên cứu

Mức độ biểu hiện của miRNA-29a-5p, tuổi, giới, phân loại giai đoạn BCLC, AFP, HBV DNA, Child-Pugh, Fib4, APRI.

Cách lựa chọn miRNA

Nghiên cứu sàng lọc các miRNA tiềm năng liên quan đến các bệnh lý mạn tính về gan nhiễm vi rút viêm gan B dựa trên các bài báo công bố trên các tạp chí uy tín của nước ngoài chỉ số H-score > 100, mức độ biểu hiện miRNA có mức thay đổi fold-change > 2 trên các hệ thống dữ liệu mở PubMed, Science Research, Google Scholar, sau đó sử dụng phần mềm Mienturnet (có phức hợp dữ liệu miRNA của dữ liệu thực nghiệm miRTarbase và phần mềm tiên

đoán Targetscan), lựa chọn các miRNA có FDR < 0,05. Kết quả sàng lọc bằng insilico chọn được 17 miRNA. Các miRNA liên quan với các gen đích sẽ được so sánh với các con đường tín hiệu nội bào chính liên quan đến HCC được thu thập trên phần mềm KEGG (<https://www.kegg.jp/pathway/map=map05225&keyword=HCC>). Kết quả tìm ra miRNA-29a-5p có ý nghĩa cao trong chẩn đoán HCC gen GSK3B, liên quan đến con đường tín hiệu nội bào Wnt.



Hình 1. miRNA có ý nghĩa trong HCC.

A: Phân tích miRNA-29a-5p từ phần mềm MIENTURNET, liên kết với phần mềm KEGG.

B: Mối liên kết của miRNA-29a-5p với gen GSK3B, liên quan đến con đường tín hiệu nội bào Wnt

Phương pháp phân tích miRNA

Nghiên cứu sử dụng phương pháp Realtime PCR để phân tích mức độ biểu hiện của miRNA. Mẫu huyết thanh được lấy trong ống chống đông EDTA, được tách chiết RNA bằng phương pháp phenol-chloroform, kiểm tra chất

lượng bằng phương pháp đo OD, với A260/A280 trong khoảng 1,8 - 2,0, sau đó được tổng hợp cDNA bằng mỗi stem-loop đặc hiệu miRNA. Sản phẩm cDNA thực hiện phản ứng Realtime PCR sử dụng SYRB Green master mix, trên thiết bị Roche lightcycler 480). Mẫu

phân tích được chạy lặp lại 3 lần. Mỗi stem-loop và các cặp mồi của miRNA-29a-5p thiết kế theo nguyên tắc thiết kế mồi được công bố năm 2012 trên tạp chí Curr Protoc Mol Biol tại trang website (<http://genomics.dote.hu:8080/mirnaesigntool/>) dựa trên các trình tự miRNA trưởng thành trên dữ liệu Mirbase (<http://www.mirbase.org/>). Lựa chọn miRNA-16 làm nội chuẩn. Phần mềm phân tích Ct của Roche

Trình tự các mồi:

miRNA-29a-5p: F: 5'- GTTGGGACTGATTTCTTTTGGT -3'.

miRNA-16: F: 5'- CGC GCT AGC AGC ACG TAA ATA - 3'.

Mồi ngược duy nhất: 5'- GTG CAG GGT CCG AGG GT-3'

Mức độ biểu hiện miRNA huyết tương tính bằng công thức của Livak K.J. và cộng sự⁹:

$$\text{miRNA} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$$

Trong đó: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct (miRNA đích)} - \text{Ct (miRNA nội chuẩn)}$.

Tỉ lệ fold change mức độ biểu hiện miRNA huyết tương giữa 2 nhóm nghiên cứu:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Trong đó: $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (nhóm đích)} - \Delta\text{Ct (nhóm chứng)}$

Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm phân tích SPSS 20.0 để phân tích thống kê. Với các biến định tính được biểu thị bằng tỷ lệ, với biến định lượng mô tả thông qua giá trị trung bình, trung vị. So sánh sự khác biệt giữa các quan sát bằng kiểm định "Independent – samples T test" hoặc "Mann Whitney" với độ tin cậy 95%. So sánh giá trị chẩn đoán của các dấu ấn sinh học bằng cách so sánh diện tích dưới đường cong (AUC) của

LightCycler software. Trong mỗi giếng PCR, loại bỏ tín hiệu nền ở các chu kỳ đầu (thường là chu kỳ 3 - 15). Phần mềm qPCR (Roche) tự động đặt baseline, kết hợp kiểm tra lại vùng baseline có nằm trước pha log hay không, chỉnh tay nếu phần mềm nhận diện sai (ví dụ: baseline nằm chồng lên vùng khuếch đại). Sử dụng mẫu âm tính để kiểm tra các bước tổng hợp cDNA và qPCR.

các dấu ấn sinh học.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua của Hội đồng đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội ngày 05/05/2023, với số chứng nhận: 894/GCN-HĐĐDNCSYH-ĐHYHN. Nghiên cứu được hỗ trợ bởi Quỹ Đổi mới sáng tạo VINIF (VINIF) theo số VINIF.2021.DA00212.

Tất cả đối tượng tiến cứu đều được giải thích rõ về mục tiêu và quy trình nghiên cứu, đồng thời đã ký văn bản đồng ý tham gia. Thông tin cá nhân và dữ liệu xét nghiệm được mã hóa, lưu trữ bảo mật và chỉ nhóm nghiên cứu được phép truy cập. Người tham gia có quyền rút lui khỏi nghiên cứu bất kỳ lúc nào mà không cần lý do và không ảnh hưởng đến quyền lợi khám, chữa bệnh.

III. KẾT QUẢ

1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	HCC (n = 100)	Xơ gan (n = 100)	Viêm gan B mạn (n = 100)
Tuổi: Mean ± SD	58,36 ± 12,19	57,8 ± 11,8	40,82 ± 11,93

Đặc điểm	HCC (n = 100)	Xơ gan (n = 100)	Viêm gan B mạn (n = 100)
Giới tính			
Nữ	5 (5%)	39 (39%)	46 (46%)
Nam	95 (95%)	61 (61%)	54 (54%)
BCLC			
A, n (%)	31 (31%)	-	-
B	19 (19 %)	-	-
C	43 (43%)	-	-
D	5 (5%)	-	-
NA	2 (2%)	-	-
AFP (ng/ml)	8236,43 ± 32983,88	18,93 ± 43,71	5,96 ± 15,69
HBV DNA (copies/ml)	1.351.106 ± 10.545.245	26.452.819 ± 183.272.231	263.601.842 ± 579.903.528
Child-Pugh			
A n(%)	50 (50%)	72 (72%)	-
B	22 (22%)	14 (14%)	-
C	7 (7%)	4 (4 %)	-
NA	21 (21%)	10 (10%)	-
Fib4	4,63± 5,4	7,7 ± 6,37	1,59 ± 1,71
APRI	2 ± 2,69	3,27 ± 5,64	1,31 ± 2,84

Ghi chú: BCLC, Phân loại giai đoạn ung thư gan Barcenola; Fib4, chỉ số xơ hoá gan Fibrosis-4; APRI, Chỉ số APRI (Aspartate aminotransferase-to-Platelet Ratio Index), NA: không đủ dữ liệu.

Pha xác nhận nghiên cứu trên 300 bệnh nhân ở 3 nhóm: viêm gan B mạn (n=100), xơ gan (n=100) và HCC (n=100) do nhiễm HBV. Độ tuổi trung bình của nhóm viêm gan B mạn là thấp nhất $40,82 \pm 11,93$, xơ gan và HCC có độ tuổi cao hơn. Phần lớn các bệnh nhân là nam giới, chiếm 70%, trong đó tập trung nhiều nhất ở nhóm HCC. Trong nghiên cứu có 31% bệnh nhân HCC giai đoạn sớm (BCLC-A). Nồng độ AFP tăng dần từ nhóm bệnh nhân viêm gan B đến xơ gan và HCC. Nồng độ HBV-DNA cao nhất trên nhóm bệnh nhân viêm gan B mạn.

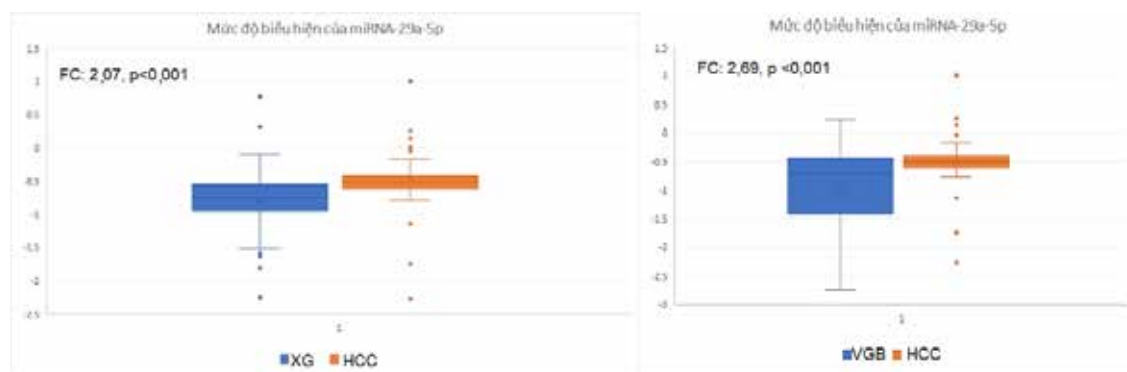
Phân loại đánh giá mức độ xơ gan Child-Pugh ở nhóm xơ gan và HCC, Child-Pugh A chiếm chủ yếu, Child-Pugh C có 11 bệnh nhân, tập trung nhiều ở nhóm HCC (7 bệnh nhân). Hai chỉ số đánh giá mức độ xơ hoá Fib-4 và APRI cao nhất ở nhóm xơ gan.

2. Mức độ biểu hiện của miRNA-29a-5p ở bệnh nhân viêm gan B mạn tính, xơ gan, HCC do nhiễm vi rút viêm gan B

Pha sàng lọc nghiên cứu trên 30 bệnh nhân trên 3 nhóm: viêm gan B mạn (n=10), xơ gan (n = 10) và HCC (n = 10) do nhiễm HBV. Mức

độ biểu hiện của miRNA-29a-5p cao hơn ở nhóm HCC so với nhóm viêm gan B mạn tính 2,373 lần có ý nghĩa thống kê với p tương ứng là 0,004; nhóm HCC so với nhóm xơ gan có nhiễm HBV là 1,457 lần, nhưng chưa có ý nghĩa thống kê với $p = 0,174$.

Mức độ biểu hiện của miRNA-29a-5p ở nhóm HCC cao gấp 2,07 lần so với nhóm xơ gan và gấp 2,69 lần so với nhóm viêm gan B mạn tính, sự khác biệt này đều có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

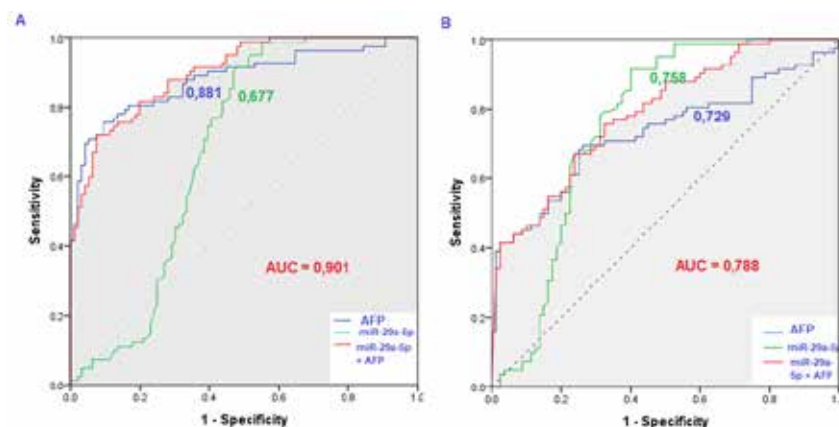


Biểu đồ 1. Mức độ biểu hiện miRNA-29a-5p trên bệnh nhân ung thư gan so với xơ gan và ung thư gan so với viêm gan B mạn

miRNA-29a-5p có ý nghĩa trong chẩn đoán HCC từ nhóm viêm gan B mạn tính. Diện tích dưới đường cong (AUC) của miRNA-29a-5p là 0,677, $p < 0,001$, tại điểm cut-off là 0,157, độ nhạy 98%, độ đặc hiệu là 45%. Tuy nhiên, khi so sánh với AUC của AFP trong chẩn đoán HCC thì AUC của miRNA-29a-5p thấp hơn (AUC của AFP là 0,881, $p < 0,001$). Khi kết hợp cả miRNA-29a-5p và AFP làm tăng giá trị chẩn

đoán của HCC từ nhóm viêm gan B mạn tính (AUC = 0,901, $p < 0,001$).

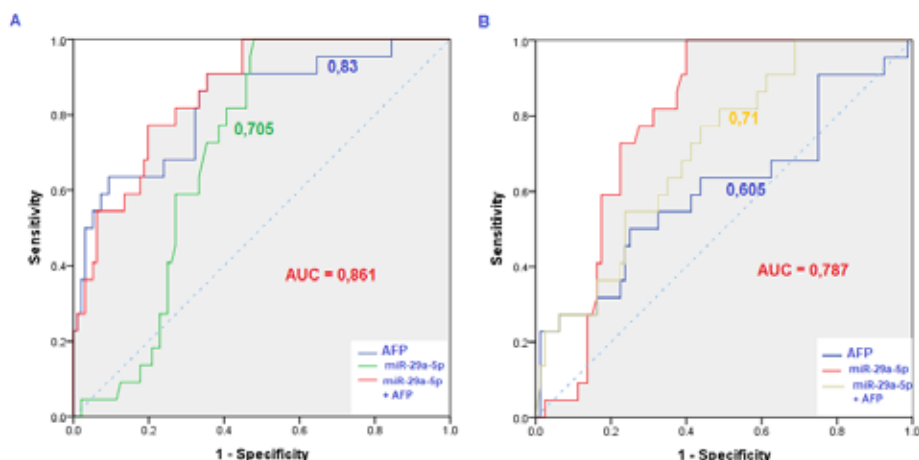
Diện tích dưới đường cong của miRNA-29a-5p trong chẩn đoán HCC từ nhóm xơ gan cao hơn của AFP (AUC = 0,758, $p < 0,001$ so với AUC = 0,729, $p < 0,001$). Khi kết hợp miRNA-29a-5p và AFP cũng làm tăng giá trị chẩn đoán của HCC từ nhóm xơ gan (AUC = 0,788, $p < 0,001$).



Biểu đồ 2. Giá trị chẩn đoán của miRNA-29a-5p và AFP: A-Giữa nhóm HCC và viêm gan B mạn tính, B-Giữa nhóm HCC và xơ gan

miRNA-29a-5p tăng gấp 3,07 lần ở nhóm HCC giai đoạn sớm (BCLC-A) so với nhóm viêm gan B mạn tính ($p < 0,001$), gấp 2,36 lần so với nhóm xơ gan ($p < 0,001$). Giá trị chẩn đoán HCC của miRNA-29a-5p từ nhóm viêm gan B mạn tính tăng khi kết hợp với AFP

(AUC = 0,861, $p < 0,001$). Tuy nhiên, AUC của miRNA-29a-5p chẩn đoán HCC từ nhóm xơ gan (AUC = 0,787) cao hơn cả AUC của AFP (AUC = 0,605) và khi kết hợp giữa miRNA-29a-5p kết hợp với AFP (AUC = 0,71).



Biểu đồ 3. Giá trị chẩn đoán của miRNA-29a-5p và AFP: A-Giữa nhóm HCC giai đoạn sớm và viêm gan B mạn tính, B-Giữa nhóm HCC giai đoạn sớm và xơ gan

Trong nhóm bệnh nhân nhiễm HCC, khi so sánh mức độ biểu hiện của miRNA-29a-5p giữa 2 nhóm AFP ≤ 20 ng/ml và > 20 ng/ml, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,032$. Không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa

mức độ biểu hiện của miRNA-29a-5p ở nhóm tuổi < 60 và ≥ 60 , giữa nhóm nam và nữ, giữa phân loại BCLC mức độ A và các mức từ B-D, giữa phân loại xơ gan Child-Pugh A và nhóm B-C ($p > 0,05$).

Bảng 2. Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện của miRNA-29a-5p với các đặc điểm cận lâm sàng, lâm sàng của nhóm ung thư biểu mô tế bào gan

Đặc điểm	Mức độ biểu hiện của miRNA-29a-5p			
	n	Trung vị	Min-Max	p (Man-Whitney)
Tuổi				
< 60	47	0,32	0,17-1,88	0,604
≥ 60	53	0,30	0,07-10,06	
Giới tính				
Nam	95	0,31	0,07-10,06	0,286
Nữ	5	0,32	0,29-1,56	

Đặc điểm	Mức độ biểu hiện của miRNA-29a-5p			
	n	Trung vị	Min-Max	p (Man-Whitney)
BCLC				
A	31	0,35	0,07-10,06	0,252
B-D	67	0,45	0,27-0,62	
AFP (ng/ml)				
≤ 20	48	0,34	0,07-10,06	0,032
> 20	52	0,29	0,09-1,01	
Child-Pugh				
A	72	0,31	0,07-10,06	0,614
B-C	18	0,3	0,18-1,56	

IV. BÀN LUẬN

miRNA đóng vai trò quan trọng trong điều hoà hoạt động của gen thông qua các con đường tín hiệu nội bào dẫn đến sự hình thành, phát triển của khối u.¹⁰ miRNA có thể đóng vai trò như gen ức chế hoặc gen sinh ung thư tùy theo chức năng. Dù nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra vai trò của miRNA trong chẩn đoán HCC, kết quả vẫn chưa thống nhất do khác biệt chủng tộc và cơ chế điều hòa biểu hiện miRNA. Tại Việt Nam, còn rất ít nghiên cứu áp dụng sàng lọc và xác nhận miRNA trên bệnh nhân HCC. Nghiên cứu này tiến hành sàng lọc miRNA từ các cơ sở dữ liệu mở với tiêu chí fold-change > 2 và H-index > 100, kết hợp phân tích in silico bằng Mienturnet với FDR < 0,05.¹¹ miRNA-29a-5p được chọn do liên quan đến gen *GSK3B* trong con đường Wnt – một con đường then chốt của HCC. Pha sàng lọc trên 30 bệnh nhân cho thấy miRNA-29a-5p có biểu hiện khác biệt giữa nhóm HCC và hai nhóm còn lại. Sau đó, dấu ấn này được đánh giá sâu hơn trong pha xác nhận với cỡ mẫu lớn hơn.

miRNA-29a-5p thuộc họ miR-29 (gồm miR-29a, b, c) và có vai trò điều hòa biểu hiện gen,

kiểm soát biểu sinh, chuyển hóa và môi trường vi mô khối u. Trong nghiên cứu này, miRNA-29a-5p được xác định liên quan đến gen *GSK3B* trong con đường tín hiệu Wnt. *GSK3B* là kinase quan trọng tham gia nhiều con đường nội bào như Wnt/ β -catenin, PI3K/AKT, NF- κ B và có ảnh hưởng đến biệt hóa, phát triển khối u, đáp ứng miễn dịch. Dù chưa có nhiều nghiên cứu trực tiếp trên HCC, các dữ liệu từ ung thư đại tràng¹² cho thấy miRNA-29a có thể ức chế các con đường PTEN/Akt/*GSK3 β* và Wnt/ β -catenin, qua đó làm giảm tăng trưởng khối u.

Vì rút viêm gan B (*HBV*) đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh ung thư gan thông qua việc gây ra đột biến, dẫn đến rối loạn điều hòa các gen thiết yếu. *HBV* có thể ảnh hưởng đến các gen ức chế khối u như *p53* và *PTEN*, cùng với các gen liên quan đến cơ chế chống chết tế bào theo chương trình (apoptosis) và điều hòa chu kỳ tế bào. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng miR-29a có thể thúc đẩy quá trình sinh ung thư. Kong và cộng sự báo cáo rằng protein X của *HBV* (HBx) có thể kích hoạt sinh ung thư gan thông qua miR-29a.¹³ Khi biểu hiện

quá mức, miR-29a thúc đẩy sự di chuyển của tế bào HepG2, trong khi việc ức chế miR-29a ngăn chặn khả năng di chuyển này ở các tế bào ung thư gan biểu hiện HBx. Cơ chế tác động của miR-29a được xác định là ức chế PTEN thông qua liên kết với vùng 3'UTR, qua đó kích hoạt con đường tín hiệu AKT, thúc đẩy tiến triển ung thư. Trái ngược với vai trò thúc đẩy ung thư trong HCC liên quan đến HBV, một số nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng miR-29a có thể đóng vai trò ức chế ung thư thông qua việc kích hoạt con đường chết tế bào theo chương trình. miR-29a có thể đối kháng quá trình sinh ung thư HCC bằng cách ức chế oncogene MDM2, từ đó khôi phục mức độ biểu hiện của protein ức chế khối u p53.¹⁴ Nghiên cứu của Li và cộng sự ủng hộ quan điểm rằng miR-29a có thể ức chế yếu tố chống chết tế bào theo chương trình để làm chậm tiến triển HCC.¹⁵ Như vậy, miR-29a có tác động thúc đẩy ung thư trong HCC liên quan đến HBV, nhưng lại thể hiện vai trò ức chế ung thư thông qua kích hoạt con đường apoptosis trong các trường hợp không liên quan đến HBV.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, miRNA-29a-5p có mức độ biểu hiện cao hơn trong nhóm bệnh nhân HCC so với nhóm viêm gan B mạn tính và xơ gan do nhiễm HBV, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Diện tích dưới đường cong khi kết hợp giữa miRNA-29a-5p và AFP cao hơn so với chỉ sử dụng AFP trong chẩn đoán HCC. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu dọc, đa trung tâm của Xue-Jia Lin trên tạp chí Lancet năm 2015, miRNA-29a là một trong bảy miRNA được xây dựng thành panel có ý nghĩa trong chẩn đoán HCC.¹⁶ Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy miRNA-29a-5p cũng tăng cao trong nhóm HCC giai đoạn sớm (BCLC-A) so với các nhóm viêm gan B mạn tính và xơ gan. Một nghiên cứu đánh giá ý nghĩa của miRNA-29a-5p được đăng tải trên tạp chí Plos One năm 2012 trong việc chẩn đoán tái phát sớm ở bệnh nhân HCC do nhiễm

HBV cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu của ở giai đoạn BCLC 0/A có thể đạt khoảng 70%.¹⁷ Theo hệ thống phân loại giai đoạn BCLC, giai đoạn 0 và A được coi là giai đoạn sớm, đồng nghĩa với tiên lượng tốt hơn, bao gồm thời gian tái phát kéo dài và tỷ lệ sống sót tổng thể cao hơn. Tuy nhiên, trên thực tế lâm sàng, vẫn có một số bệnh nhân HCC giai đoạn sớm có tiên lượng kém, trong khi các yếu tố tiên lượng hiện tại chưa cung cấp đủ thông tin, việc sử dụng các dấu ấn sinh học không xâm lấn có thể giúp xác định sớm những trường hợp này. Ở người lớn khỏe mạnh, nồng độ AFP huyết thanh là 0 – 7 ng/mL. Nồng độ AFP huyết thanh 20 ng/mL là giá trị cắt (cut-off) thường được sử dụng nhất là để tầm soát bệnh nhân có và không có HCC. Trong nhóm bệnh nhân nhiễm HCC, khi so sánh mức độ biểu hiện của miRNA-29a-5p giữa 2 nhóm AFP ≤ 20 ng/ml và > 20 ng/ml, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,032$. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lin và cộng sự thực hiện một nghiên cứu đoàn hệ lồng ghép đa trung tâm quy mô lớn cho thấy miRNA-29a thuộc panel miRNA có khả năng phát hiện HCC giai đoạn sớm, kích thước nhỏ và không tăng AFP, giúp mở ra cơ hội phẫu thuật triệt căn cho bệnh nhân HCC.¹⁶

Các nghiên cứu trước đây cho thấy AFP có độ nhạy và độ đặc hiệu thấp, đặc biệt trong giai đoạn sớm của bệnh, dẫn đến bỏ sót nhiều trường hợp trong chẩn đoán HCC. Điều này là do nồng độ AFP trong máu không tăng cao ở một số bệnh nhân HCC hoặc tăng trong các bệnh lý gan khác như viêm gan mạn và xơ gan. Do đó, việc kết hợp AFP với các microRNA (miRNA) – những phân tử RNA nhỏ điều hòa biểu hiện gen, giúp cải thiện độ chính xác trong phát hiện sớm HCC, đặc biệt trong các trường hợp AFP âm tính hoặc AFP < 20 ng/ml.

Nghiên cứu hiện tại vẫn còn một số hạn chế nhất định. Thứ nhất, cỡ mẫu còn nhỏ, đặc biệt là số lượng bệnh nhân ung thư gan (HCC) ở

giai đoạn sớm còn hạn chế, làm giảm khả năng tổng quát hóa kết quả. Thứ hai, chưa bao gồm nhóm chứng là người khỏe mạnh, do đó chưa thiết lập được mức biểu hiện nền của miRNA-29a-5p trong dân số bình thường để so sánh đối chiếu. Để khắc phục các hạn chế trên, hướng phát triển trong tương lai nên bao gồm nghiên cứu theo dõi dọc (cohort) nhằm đánh giá vai trò tiên lượng của miRNA-29a-5p đối với HCC. Việc xây dựng panel các miRNA phối hợp với AFP hoặc các dấu ấn sinh học khác như DCP, GPC3 cũng được khuyến nghị để nâng cao độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán. Cuối cùng, cần triển khai các nghiên cứu đa trung tâm với quy mô bệnh nhân lớn hơn để tăng cường độ tin cậy và khả năng ứng dụng lâm sàng của kết quả nghiên cứu.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên 300 bệnh nhân chia thành 3 nhóm (viêm gan B mạn, xơ gan và HCC do HBV) cho thấy miRNA-29a-5p có giá trị trong chẩn đoán HCC, đặc biệt ở giai đoạn sớm. Khi kết hợp với AFP, hiệu quả chẩn đoán được cải thiện. Với khả năng phân biệt rõ giữa HCC và nhóm không ác tính, miRNA-29a-5p có thể được khuyến nghị là chỉ dấu bổ sung trong sàng lọc ung thư gan ở nhóm nguy cơ cao, đặc biệt là bệnh nhân xơ gan.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của quỹ đổi mới sáng tạo Vin-Group (VINIF) mã số VINIF2021.DA00212. Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn Bệnh viện Bệnh viện Trung ương Quân Đội 108, Bệnh viện Nhiệt đới Trung ương đã hỗ trợ để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Torresi J, Locarnini S. Antiviral chemotherapy for the treatment of hepatitis

B virus infections. *Gastroenterology*. 2000; 118(2 Suppl 1): S83-103. doi:10.1016/s0016-5085(00)70008-4.

2. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012; 142(6): 1264-1273.e1. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.061.

3. Yang YL, Chang YH, Li CJ, et al. New Insights into the Role of miR-29a in Hepatocellular Carcinoma: Implications in Mechanisms and Theragnostics. *J Pers Med*. 2021; 11(3): 219. doi:10.3390/jpm11030219.

4. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104(40): 15805-15810. doi:10.1073/pnas.0707628104.

5. Dương ĐC. Nghiên cứu biểu hiện microRNA-21, microRNA-122 huyết tương ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan nhiễm vi rút viêm gan B. *Trang Luận Văn Luận Án Bộ Giáo Dục Và Đào Tạo*. Published online 2020. Accessed October 22, 2022. <https://thuvienso.quochoi.vn/handle/11742/57673>.

6. Bộ Y tế. Quyết định 3310/QĐ-BYT 2019 hướng dẫn chẩn đoán điều trị bệnh viêm gan vi rút B. 2019. Accessed March 13, 2024. <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/The-thao-Y-te/Quyết-dinh-3310-QĐ-BYT-2019-huong-dan-chan-doan-dieu-tri-benh-viem-gan-vi-rut-B-419819.aspx>.

7. Bộ Y tế. Quyết định 3129/QĐ-BYT 2020 tài liệu Hướng dẫn chẩn đoán điều trị ung thư biểu mô tế bào gan. Published online 2020.

8. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update - PubMed. Accessed March 6, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34801630/>

9. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time

quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* 2001; 25(4): 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

10. Reig M, Forner A, Rimola J, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol.* 2022; 76(3): 681-693. doi:10.1016/j.jhep.2021.11.018.

11. Licursi V, Conte F, Fiscon G, Paci P. MIENTURNET: an interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis. *BMC Bioinformatics.* 2019; 20(1): 545. doi:10.1186/s12859-019-3105-x.

12. Han X, Zheng J, Wang Y, Gao Z. miRNA-29a inhibits colon cancer growth by regulation of the PTEN/Akt/GSK3 β and Wnt/ β -catenin signaling pathways. *Oncol Lett.* 2018; 16(2): 2638-2644. doi:10.3892/ol.2018.8905.

13. Upregulated MicroRNA-29a by Hepatitis B Virus X Protein Enhances Hepatoma Cell Migration by Targeting PTEN in Cell Culture Model | *PLOS One*. Accessed March 5, 2025. <https://journals.plos.org/plosone/>

article?id=10.1371/journal.pone.0019518.

14. Xiao Z, Wang Y, Ding H. XPD suppresses cell proliferation and migration via miR-29a-3p-Mdm2/PDGF-B axis in HCC. *Cell Biosci.* 2019; 9(1): 6. doi:10.1186/s13578-018-0269-4.

15. Li Y, Ma H, Shi C, Feng F, Yang L. Mutant *ACTB* mRNA 3'-UTR promotes hepatocellular carcinoma development by regulating miR-1 and miR-29a. *Cell Signal.* 2020; 67: 109479. doi:10.1016/j.cellsig.2019.109479.

16. Lin XJ, Chong Y, Guo ZW, et al. A serum microRNA classifier for early detection of hepatocellular carcinoma: a multicentre, retrospective, longitudinal biomarker identification study with a nested case-control study. *Lancet Oncol.* 2015; 16(7): 804-815. doi:10.1016/S1470-2045(15)00048-0.

17. Zhu HT, Dong QZ, Sheng YY, et al. MicroRNA-29a-5p Is a Novel Predictor for Early Recurrence of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma after Surgical Resection. *PLOS ONE.* 2012; 7(12): e52393. doi:10.1371/journal.pone.0052393.

Summary

EVALUATION OF MIRNA-29A-5P EXPRESSION AND ITS ASSOCIATION WITH CLINICAL AND PARACLINICAL CHARACTERISTICS IN HBV-RELATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA, LIVER CIRRHOSIS AND CHRONIC HEPATITIS PATIENTS

This study aimed to evaluate the diagnostic value of miRNA-29a-5p in hepatocellular carcinoma (HCC), particularly in early-stage disease and in the context of chronic liver disease caused by HBV infection. A cross-sectional descriptive study was conducted, quantifying serum miRNA-29a-5p levels using qPCR in two phases: screening (30 patients) and validation (300 patients). The results showed that miRNA-29a-5p was significantly overexpressed in the HCC group compared to the hepatitis B and cirrhosis groups, with corresponding fold-changes of 2.69 and 2.07 ($p < 0.001$). The area under the curve (AUC) of miRNA-29a-5p for distinguishing HCC from chronic hepatitis B was 0.677 ($p < 0.001$), and for distinguishing HCC from cirrhosis was 0.758, which was higher than AFP (AUC = 0.729). In patients with HCC, when comparing the expression levels of miRNA-29a-5p between the two groups with AFP ≤ 20 ng/mL and > 20 ng/mL, the difference was statistically significant ($p = 0.032$).

Keywords: miRNA, hepatocellular carcinoma, cirrhosis, chronic hepatitis B, hepatitis B virus.