

Nghiên cứu biểu hiện của ISG20 ở bệnh nhân ung thư biểu mô gan có liên quan đến HBV

Expression of ISG20 in patients with HBV related hepatocellular carcinoma

Phạm Văn Dũng*, Nguyễn Việt Phương*,
Nguyễn Quang Duật*, Nguyễn Thị Thanh*,
Trần Thị Phương Thảo**, Đào Thị Phụng***,
Nguyễn Ngọc Uyển****, Hoàng Văn Tổng**

*Bệnh viện Quân y 103,
**Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự,
***Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải
Dương,
****Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Interferon stimulated gene 20 (ISG20) là một trong những ISG có tác dụng ức chế quá trình nhân lên của một số virus như Hepatitis B virus (HBV) và có mối liên quan đến một số bệnh lý ác tính trong đó có ung thư biểu mô tế bào gan (UTBG). **Đối tượng và phương pháp:** 41 bệnh nhân chẩn đoán UTBG được khai thác lâm sàng, cận lâm sàng và được điều trị bằng phẫu thuật sau đó lấy tổ chức khối u và tổ chức mô cạnh u RNA toàn phần được tách từ các mẫu mô sau đó chuyển thành cDNA và đánh giá mức độ biểu hiện ISG20 mRNA bằng phương pháp qRT-PCR. So sánh mức độ biểu hiện của ISG20 ở khối u và tổ chức mô cạnh u và đánh giá mối liên quan với một số chỉ số cận lâm sàng ở nhóm nghiên cứu. **Kết quả:** Biểu hiện ISG20 mRNA không khác nhau ở giữa trung tâm khối u so với tổ chức mô lành cạnh u ($p=0,22$), biểu hiện ISG20 mRNA khối u có mối tương quan chặt chẽ với chỉ số bilirubin toàn phần và không có mối liên quan đến nồng độ AFP với $p>0,05$. **Kết luận:** Không có sự khác biệt giữa biểu hiện ISG20 ở mô khối u và mô cạnh khối u. Biểu hiện ISG20 có liên quan đến một số biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân UTBG.

Từ khóa: Ung thư biểu mô tế bào gan, ISG20, viêm gan virus B.

Summary

Objective: Interferon stimulated gene 20 (ISG20) has been shown to inhibit the replication of several viruses including hepatitis B virus (HBV) and to be associated with a number of malignancies such as cervical cancer, glioma and hepatocellular carcinoma (HCC). **Subject and method:** 41 patients were diagnosed with HCC and treated with surgery. HCC tumor tissues and adjacent non-tumour liver tissues were collected to for RNA isolation. The expression levels of ISG20 mRNA were assessed by qRT-PCR method. **Result:** ISG20 mRNA expression was lower in tumor tissues compared to adjacent non-tumor liver tissues, but the difference was not statistically significant ($p=0.22$), ISG20 mRNA expression in tumor tissues which was associated with total bilirubin levels and was not significantly with AFP levels with $p>0.05$. **Conclusion:** No

Ngày nhận bài: 17/10/2020, ngày chấp nhận đăng: 16/12/2020

Người phản hồi: Hoàng Văn Tổng, Email: hoangvantong@vmmu.edu.vn - Bệnh viện Quân y 103

significant difference expression of ISG20 was observed between tumour and non-tumor tissues. ISG20 expression was associated with clinicals expression of HCC patients.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, ISG20, hepatitis B virus.

1. Đặt vấn đề

Ung thư biểu mô tế bào gan (UTBG) là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong các bệnh lý ác tính tại Việt Nam và trên thế giới. Theo GLOBOCAN năm 2018 tại Việt Nam số ca mới mắc và tử vong đều hơn 25.000 ca và nó đứng đầu trong các bệnh lý ác tính [1]. Các yếu tố nguy cơ chính gây UTBG là nhiễm virus viêm gan (HBV và HCV), uống rượu, xơ gan và bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, trong đó nhiễm HBV là yếu tố nguy cơ hàng đầu. Theo một số nghiên cứu, tỷ lệ bệnh nhân UTBG có nhiễm HBV là hơn 80% và người mang HBV có nguy cơ bị UTBG cao hơn gấp 100 lần so với người không nhiễm HBV [2].

Trong số các ISG đã được tìm thấy, ISG20 có bản chất là protein có trọng lượng phân tử 20kDA nằm trên nhiễm sắc thể số 15q26 ở người có phần hoạt động là đoạn exoluclease 3'-5' biểu hiện bởi cả IFN type I và II. ISG20 đã được chứng minh là có tác dụng ức chế một số virus RNA như virus sốt vàng (YFN), virus gây viêm loét miệng (VSV), virus sinbis (SINV), virus HIV, virus viêm gan C (HCV)... Với HBV là virus DNA nhưng nhân lên thông qua quá trình phiên mã ngược sử dụng một RNA làm trung gian của quá trình phiên mã. Hoạt tính exoluclease 3'-5' của ISG20 gắn trực tiếp vào miền thân dưới (vòng lặp ϵ) của các đoạn RNA nhỏ làm chúng bị thoái biến và không tham gia quá trình đóng vòng để tạo các cccDNA giúp ngăn chặn quá trình nhân lên của HBV.

ISG20 cũng đã được chứng minh là có liên quan đến một số bệnh lý ung thư. Một nghiên cứu đã chứng minh ISG20 tăng biểu hiện trong tế bào ung thư cổ tử cung ở chuột thông qua sự điều chỉnh của hormon estrogen [3]. ISG20 giảm biểu hiện ở nhóm có xuất hiện gen đột biến IDH

đây là gene có liên quan đến tiên lượng xấu và tiến triển ác tính ở bệnh lý u thần kinh đệm [4]. Trong UTBG ISG20 tăng biểu hiện ở nhóm có tăng sinh mạch máu trong khối u thông qua sự điều chỉnh tăng của hormon tuyến giáp T_3 [5]. Một nghiên cứu gần đây trên nhóm bệnh nhân người Việt Nam cũng chứng minh ISG20 mRNA tăng biểu hiện trong khối u so với mô liền kề khối u [6]. Như vậy, các nghiên cứu đã cho thấy ISG20 có mối liên quan đến một số bệnh lý ung thư, để làm rõ hơn mối liên quan của ISG20 với UTBG chúng tôi tiến hành: *Đánh giá mức độ biểu hiện của ISG20, mối liên quan giữa các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân UTBG có HBV.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Gồm 41 bệnh nhân được chẩn đoán UTBG có HBV (+) với tiêu chuẩn chẩn đoán theo Bộ Y tế năm 2012: Khối u lớn hơn 1cm có hình ảnh chụp cắt lớp vi tính điển hình tăng ngấm thuốc ở thì động mạch và thoát thuốc nhanh ở thì tĩnh mạch hoặc thì muộn, có mức độ xơ gan Child-Pugh A hoặc B. Chúng tôi sử dụng phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang có đối chứng so sánh. Các chỉ tiêu nghiên cứu bao gồm biểu hiện chung tuổi, giới và biểu hiện cận lâm sàng, mức độ xơ gan theo Child-Pugh, giai đoạn bệnh theo BCLC. 41 mẫu mô trong khối u và tổ chức liền kề cạnh u của các bệnh nhân được phẫu thuật cắt một phần gan được tách RNA toàn phần bằng Kit (Rneasy Mini Kit - Qiagen, Đức) quy trình theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA tổng số sau đó được phiên mã ngược thành cDNA bằng bộ Kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis, Thermo, USA).

2.2. Định lượng tương đối biểu hiện ISG20 bằng phương pháp qRT-PCR

Biểu hiện ISG20 mRNA được xác định thông qua định lượng ISG20cDNA bằng phương pháp

qRT-PCR sử dụng Master Mix Maxima SYBR Green/ROX qPCR (Thermo, USA). Sử dụng đoạn gen ISG20 và gen GAPDH làm gen tham chiếu với trình tự mỗi theo Bảng 1:

Bảng 1. Trình tự mỗi gen ISG20 và GAPDH

Tên gene	Trình tự mỗi	Độ dài mỗi (bp)
ISG20_F	5'- ATC TCT GAG GGT CCC CAA GGA -3'	21
ISG20_R	5'- TTC AGT CTG ACA CAG CCA GGC G -3'	22
GAPDH_F	5'- CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA -3'	24
GAPDH_R	5'- TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC -3'	24

Tổng thể tích của phản ứng là 25µl trong đó: master Mix SYBR 12,5µl, nước nuclease-free 9,5µl, Mỗi F+R 1µl và cDNA đầu vào 3µl. Chu trình nhiệt: Giai đoạn kích hoạt enzyme tại 95°C trong 10 phút tiếp theo sau là 45 chu kỳ biến tính ở 95°C 15 giây, gắn mỗi ở 58°C 30 giây, tổng hợp tại 72°C 40 giây và kết thúc bằng phân tích đường cong nóng chảy từ 58°C đến 99°C. Tất cả các phản ứng được lặp lại 2 lần bằng máy real-time PCR Rotor-gene (Qiagen, Đức). Biểu hiện tương đối của gene ISG20 được tính toán dựa trên gene tham chiếu GAPDH bằng phương pháp tính ΔC_t theo công thức: $\Delta C_t = C_t(\text{ISG20}) - C_t(\text{GAPDH})$. Biểu hiện tương đối của gen ISG20 được tính toán là $2^{-\Delta C_t}$.

2.3. Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được nhập và quản lý bằng Excel 2007 và được phân tích bằng phần mềm SPSS v.22. Biến định tính được trình bày bằng tần số và giá trị %, biến định lượng trình bày bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn hoặc giá trị trung vị.

Biểu hiện tương đối của gene ISG20 ở khối u và tổ chức liền kề cạnh u được so sánh bằng Wilcoxon signed ranks test. Phân tích mối tương quan giữa gene và các chỉ số cận lâm sàng sử dụng hệ số tương quan Spearman. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm chung, lâm sàng của nhóm nghiên cứu

Kết quả cho thấy tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là $57,1 \pm 12,2$, số lượng bệnh nhân UTBG nam cao gấp 3,6 lần so với nữ. Các xét nghiệm sinh hóa và huyết học hầu hết trong giới hạn bình thường. Số lượng bệnh nhân có AFP trong giới hạn bình thường ($< 20\text{ng/ml}$) chiếm tỷ lệ cao nhất với 43,9% (18 bệnh nhân). Có 95,1% (39 bệnh nhân) xơ gan Child A. Tỷ lệ bệnh nhân ở giai đoạn trung gian là 63,4% (26 bệnh nhân), chỉ có 2 bệnh nhân (4,9%) ở giai đoạn tiến triển (Bảng 2).

Bảng 2. Đặc điểm chung, cận lâm sàng của nhóm nghiên cứu

Đặc điểm chung	($\bar{x} \pm SD$)	Nhỏ nhất - lớn nhất
Tuổi	$57,1 \pm 12,2$	29 - 82
Giới tính	n	Tỷ lệ %

Nam	32	78
Nữ	9	22
Cận lâm sàng	Trung vị	Nhỏ nhất - lớn nhất
Hồng cầu (T/L)	4,7	3 - 7,8
Bạch cầu (G/L)	7	4,1 - 46
Tiểu cầu (G/L)	184	101 - 400
Tỷ lệ prothrombin (%)	92,5	39 - 119
AST (U/L)	36	16 - 204

Bảng 2. Đặc điểm chung, cận lâm sàng của nhóm nghiên cứu (Tiếp theo)

Cận lâm sàng		Trung vị	Nhỏ nhất-lớn nhất
ALT (U/L)		35	8,5 - 257,7
Bilirubin toàn phần ($\mu\text{mol/L}$)		9,9	5,1 - 71,8
Bilirubin trực tiếp ($\mu\text{mol/L}$)		4,3	2,4 - 49,1
Protein toàn phần (g/L)		76	57 - 84
Albumin (g/L)		40,8	27 - 49
Đặc điểm khác		n	Tỷ lệ %
AFP (ng/ml)	< 20	18	43,9
	20 - < 400	12	29,3
	≥ 400	11	26,8
Child Pugh	A	39	95,1
	B	2	4,9
BCLC	Sớm	13	31,7
	Trung gian	26	63,4
	Tiến triển	2	4,9

3.2. Biểu hiện ISG20 ở mô khối u và tổ chức cạnh khối u

Biểu hiện ISG20 mRNA trong tế bào khối u là 21,5 thấp hơn biểu hiện ISG20 mRNA trong tế bào mô lân cận với giá trị 26,6, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p=0,22$ (Bảng 3).

Bảng 3. Biểu hiện ISG20 mRNA trong tế bào khối u và mô lân cận khối u ở bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan

Biểu hiện ISG20	khối u ($2^{\Delta\text{Ct}}$)	cạnh khối u ($2^{\Delta\text{Ct}}$)	p
Trung vị	21,5	26,6	0,22
Nhỏ nhất	4,3	0,03	
Lớn nhất	1448,2	121,1	

3.3. Mối tương quan biểu hiện ISG20 mRNA với biểu hiện cận lâm sàng bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan

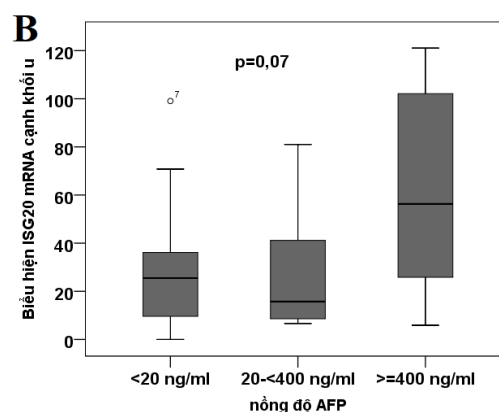
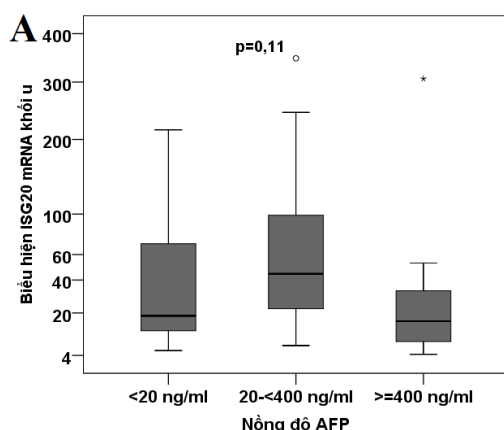
Tỷ lệ biểu hiện của ISG20 khối u và cạnh khối u không có mối tương quan với AST, ALT, prothrombin, số lượng tiểu cầu và albumin. Biểu hiện ISG20 trong khối u có mối tương quan chặt chẽ với nồng độ Bilirubin toàn phần huyết thanh với ($r = 0,41$, $p=0,01$) (Bảng 4). Biểu hiện ISG20 mRNA trong tế bào khối u và cạnh khối u không có mối tương quan với nồng độ AFP huyết thanh ở bệnh nhân UTBG với $p>0,05$ (Hình 1A, B).

Bảng 4. Tương quan giữa biểu hiện ISG20 với đặc điểm cận lâm sàng

Biểu hiện ISG20		Trong khối u ($2^{\Delta Ct}$)	Cạnh khối u ($2^{\Delta Ct}$)
AST	Hệ số Spearman's	0,07	-0,17
	p	0,65	0,3
	n	41	41

Bảng 4. Tương quan giữa biểu hiện ISG20 với đặc điểm cận lâm sàng (Tiếp theo)

Biểu hiện ISG20		Trong khối u ($2^{\Delta Ct}$)	Cạnh khối u ($2^{\Delta Ct}$)
ALT	Hệ số Spearman's	-0,09	-0,09
	p	0,58	0,58
	n	41	41
BilirubinTP	Hệ số Spearman's	0,41	0,1
	p	0,01	0,53
	n	41	41
Albumin	Hệ số Spearman's	0,2	0,2
	p	0,23	0,2
	n	37	37
Tỷ lệ prothrombin	Hệ số Spearman's	-0,23	0,12
	p	0,17	0,49
	n	38	38
Tiểu cầu	Hệ số Spearman's	-0,06	-0,23
	p	0,15	0,15
	n	40	40



Hình 1. Liên quan biểu hiện ISG20 mRNA khối u và cạnh khối u với nồng độ AFP

4. Bàn luận

UTBG là bệnh lý ác tính tiến triển thầm lặng, triệu chứng lâm sàng mờ nhạt, tỷ lệ chẩn đoán ở giai đoạn tiến triển và muộn còn cao vì vậy tỷ lệ bệnh nhân được điều trị triệt để khối u hiện nay vẫn còn hạn chế. Bệnh chủ yếu xuất hiện trên nền xơ gan trong đó tỷ lệ UTBG có nhiễm HBV tại Việt Nam còn khá cao (80 - 90%). Hiện nay có nhiều phương pháp điều trị trong đó phẫu thuật cắt bán phần gan vẫn mang lại hiệu quả tốt và nghiên cứu của chúng tôi thực hiện ở nhóm bệnh nhân UTBG có chỉ định phẫu thuật cắt gan, đây là nhóm bệnh nhân hầu hết được chẩn đoán lần đầu, vì vậy tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân nghiên cứu là $57,1 \pm 12,2$. Tuổi trung bình trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu của tác giả Ngô Đắc Sáng với tuổi trung bình là 51,7 [7], trong một số nghiên cứu dịch tễ cho thấy tuổi trung bình phát hiện bệnh nhân UTBG ở Việt Nam là trên 50, độ tuổi này thường thấp hơn so với độ tuổi tại các nước châu Âu và Nhật Bản do sự khác biệt của yếu tố nguy cơ mắc bệnh [8]. Về giới tính trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ nam/nữ là 3,6, kết quả này cũng tương đồng với một vài nghiên cứu gần đây. Tỷ lệ mắc UTBG theo giới tính có sự chênh lệch là do ở nam giới ngoài nhiễm HBV còn có nhiều yếu tố nguy cơ khác như uống rượu, béo phì và hút thuốc gây tổn thương gan lâu dài dẫn đến nguy cơ mắc bệnh cao hơn.

Trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi hầu hết các xét nghiệm cận lâm sàng như enzyme gan, tỷ lệ prothrombin, albumin đều trong giới hạn bình thường và chưa có triệu chứng xơ gan trên lâm sàng với tỷ lệ xơ gan Child-Pugh A là 95,1%. Tỷ lệ bệnh nhân UTBG ở giai đoạn sớm và giai đoạn trung gian là 95,1%. Trong các phương pháp điều trị UTBG chỉ định phẫu thuật được đặt ra khi bệnh nhân ở giai đoạn sớm và chức năng gan còn tốt. Nếu không đạt các điều kiện trên thì cần điều trị bằng các phương pháp

tạm thời và tại chỗ khối u và có thể xem xét chỉ định phẫu thuật nếu đủ điều kiện.

Kết quả nghiên cứu cho thấy ISG20 mRNA ở khối u thấp hơn so với vùng mô lân cận khối u, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Trong một nghiên cứu gần đây chúng tôi thấy biểu hiện ISG20 mRNA ở khối u cao hơn tổ chức mô lành cạnh u [6]. Trong một vài nghiên cứu trước đó người ta cũng đã chứng minh ISG20 tăng biểu hiện trong tế bào ung thư cổ tử cung chuột và tế bào ung thư vú ở người [3], tuy nhiên nó giảm biểu hiện ở bệnh lý u thần kinh đệm có tính chất ác tính [4]. Trong nghiên cứu của chúng tôi chưa tìm thấy sự khác biệt này, điều này có thể được giải thích là do cỡ mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi chưa đủ lớn, vì vậy cần có những nghiên cứu tiếp theo với những cỡ mẫu lớn hơn.

Về mối tương quan biểu hiện giữa ISG20 với các biểu hiện cận lâm sàng ở bệnh nhân UTBG, chúng tôi nhận thấy biểu hiện ISG20mRNA khối u có mối tương quan thuận chặt chẽ với nồng độ bilirubin toàn phần. Chúng tôi không nhận thấy mối tương quan của các chỉ số khác về chức năng gan như AST, ALT, bilirubin gián tiếp, prothrombin, protein... với biểu hiện ISG20 mRNA khối u và mô cạnh khối u. Một nghiên cứu đã nhận thấy mối tương quan của biểu hiện ISG20 với AST, ALT, bilirubin toàn phần và trực tiếp [6]. Tiên lượng bệnh nhân UTBG dựa vào khá nhiều yếu tố trong đó có chỉ số AFP, trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy có tới 43,9% số bệnh nhân có nồng độ AFP trong giới hạn bình thường và mức độ biểu hiện ISG20 mRNA khối u và cạnh khối u không có mối liên quan với nồng độ AFP huyết thanh, trong một nghiên cứu khác nhận thấy biểu hiện ISG20 khối u có mối liên quan với nồng độ AFP ở bệnh nhân UTBG [5], tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi chưa nhận thấy mối liên quan này.

5. Kết luận

Biểu hiện ISG20 mRNA khối u và cạnh khối u không có sự khác biệt. Biểu hiện ISG20 mRNA khối u có mối tương quan thuận chặt chẽ với nồng độ bilirubin toàn phần huyết thanh ở bệnh nhân UTBG. Như vậy, biểu hiện ISG20 có thể là yếu tố tham gia vào quá trình hình thành và tiên lượng bệnh nhân UTBG.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.02-2017.15.

Tài liệu tham khảo

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al (2018) *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA A Cancer Journal for Clinicians 68(6): 394-424.
2. Diep Luu Minh and Long Dao Van (2007) *Study on some clinical characteristics, alpha fetoprotein and image of HCC after radio frequency heat treatment*. Vietnamese medicine.
3. Pentecost BT (1998) *Expression and estrogen regulation of the HEM45 MRNA in human tumor lines and in the rat uterus*. J Steroid Biochem Mol Biol 64(1-2): 25-33.
4. Gao M, Lin Y, Liu X et al (2019) *ISG20 promotes local tumor immunity and contributes to poor survival in human glioma*. Oncoimmunology 8(2): 1534038.
5. Lin SL, Wu SM, Chung IH et al (2018) *Stimulation of interferon-stimulated gene 20 by thyroid hormone enhances angiogenesis in liver cancer*. Neoplasia 20(1): 57-68.
6. Van Tong H, Hoan NX, Binh MT et al (2018) *Interferon-stimulated gene 20 kDa protein serum levels and clinical outcome of hepatitis B virus-related liver diseases*. Oncotarget 9(45): 27858-27871.
7. Ngô Đắc Sáng (2018) *Nghiên cứu các biến chứng sau phẫu thuật cắt gan do ung thư theo phương pháp Tôn Thất Tùng*. Luận án Tiến sĩ, tr. 63.
8. Le VQ, Nguyen VH, Nguyen VH et al (2019) *Epidemiological characteristics of advanced hepatocellular carcinoma in the northern region of Vietnam*. Cancer Control 26(1): 1073274819862793.