

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REALTIME RT - PCR ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG SERPINE1 - MRNA NGUỒN GỐC NHAU THAI TRONG HUYẾT TƯƠNG CỦA THAI PHỤ VÀ KHẢO SÁT MỐI LIÊN QUAN VỚI TIỀN SẢN GIẬT - SẢN GIẬT

Cao Ngọc Thành, Nguyễn Việt Nhân, Nguyễn Vũ Quốc Huy, Hà Thị Minh Thi, Lê Phan Tường Quỳnh, Đoàn Hữu Nhật Bình, Trần Thị Hạ Thị, Lê Tuấn Linh, Trần Mạnh Linh
Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Khảo sát mRNA nhau thai trong huyết tương thai phụ là một phương pháp không xâm nhập, có giá trị dự báo nguy cơ tiền sản giật – sản giật.

Nghiên cứu này nhằm mục tiêu: (1) Bước đầu áp dụng kỹ thuật Realtime RT-PCR để định lượng mRNA của gene SERPINE1 trong huyết tương của các phụ nữ mang thai; (2) Khảo sát mối liên quan giữa sự biểu hiện gene SERPINE1 ở mức mRNA với tiền sản giật – sản giật. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 180 thai phụ có tuổi thai từ 16-24 tuần được theo dõi đến lúc sinh và 6 tuần sau sinh. mRNA của gene SERPINE1 (gene đích) và gene GAPDH (gene chứng) được định lượng bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR với RNA được tách từ huyết tương của thai phụ.

Kết quả: 98,9% mẫu có GAPDH mRNA dương tính với nồng độ trung bình $4,45 \times 10^5 \pm 1,40 \times 10^6$ copy/ml; 21,9% mẫu có SERPINE1 mRNA dương tính, nồng độ trung bình $2,71 \times 10^4 \pm 4,57 \times 10^4$ copy/ml. Thai phụ có SERPINE1 mRNA dương tính có nguy cơ mắc TSG – SG cao gấp 4,8 lần (95%CI: 1,8 – 12,9) so với thai phụ có SERPINE1 mRNA âm tính. Nếu xem xét thêm yếu tố nồng độ mRNA gene chứng GAPDH cao từ 10^4 copy/ml trở lên thì nguy cơ này cao gấp 4,9 lần (95%CI: 1,3 – 17,7). Tỷ số SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA ở nhóm có TSG – SG là $0,120 \pm 0,125$; cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có TSG – SG ($0,036 \pm 0,029$), $p = 0,0012$. Xác suất dự báo đúng TSG – SG cho một thai phụ có tỷ số này cao là 81,5% (95%CI: 65,8 – 92,1%), với điểm cắt của tỷ số này $> 0,0596$ thì độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 75% và 77,42%.

Kết luận: Chúng tôi đã ứng dụng thành công quy trình định lượng SERPINE1 mRNA bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR. Sự biểu hiện gene SERPINE1 ở mức mRNA có thể là một yếu tố giúp dự báo nguy cơ TSG – SG.

Từ khóa: Tiền sản giật, SERPINE1 mRNA.

Abstract

APPLYING REALTIME RT-PCR FOR QUANTIFYING

PLACENTAL SERPINE1 – MRNA IN MATERNAL PLASMA AND IDENTIFYING ASSOCIATION WITH PREECLAMPSIA

Background: Detection of placental mRNA expression in maternal plasma seems noninvasive method by which to predict the risk of preeclampsia. This study aimed to: (1) Applying Realtime RT-PCR to quantify SERPINE1 mRNA in maternal plasma; (2) Survey the association between SERPINE1 mRNA expression and preeclampsia.

Patients and methods: 180 pregnant women at 16-24 gestational weeks were followed until delivery and 6 weeks after. mRNA expression of SERPINE1 gene (target gene) and GAPDH gene (control gene) were evaluated by Realtime RT-PCR in with mRNA extracted from maternal plasma.

Results: 98.9% samples were GAPDH mRNA positive, mean concentration was $4.45 \times 10^5 \pm 1.40 \times 10^6$ copies/ml; 21.9% samples were SERPINE1 mRNA positive, mean concentration was $2.71 \times 10^4 \pm 4.57 \times 10^4$ copies/ml. The presence of SERPINE1 mRNA in maternal plasma increased the risk of developing preeclampsia (RR: 4.8, 95%CI: 1.8 – 12.9). In group having GAPDH mRNA concentration higher than 10^4 copies/ml, the presence of SERPINE1 mRNA in maternal plasma also increased the risk of developing preeclampsia (RR: 4.9, 95%CI: 1.3 – 17.7). Ratio of SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA in preeclamptic pregnant women was significantly higher than normal group, 0.120 ± 0.125 and 0.036 ± 0.029 , respectively ($p = 0.0012$). The preeclampsia-predictive value was 81.5% (95%CI: 65.8 – 92.1%), the cut-off value > 0.0596 gave a sensitivity of 75% and specificity of 77.42%, respectively.

Conclusion: The procedure for quantifying SERPINE1 mRNA by Realtime RT-PCR was successfully applied. Increasing SERPINE1 mRNA expression in maternal plasma could be a risk factor of preeclampsia.

Keywords: Preeclampsia, SERPINE1 mRNA.

1. Đặt vấn đề

Tiền sản giật – sản giật (TSG – SG) chiếm tỷ lệ khoảng 3-7% các phụ nữ mang thai trên toàn thế giới với nhiều biến chứng cho cả thai nhi và bà mẹ [12]. Biến chứng ở thai nhi bao gồm trọng lượng khi sinh thấp, sinh non hoặc tử vong chu sinh. Biến chứng ở thai phụ bao gồm suy thận, hội chứng HELLP (tan máu, tăng enzyme gan, giảm tiểu cầu), suy gan, phù não với triệu chứng co giật và có thể tử vong, đây là nguyên nhân tử vong thứ hai ở các bà mẹ mang thai, chỉ đứng sau băng huyết sau sinh. Ngoài ra, hậu quả của tiền sản giật còn kéo dài dai dẳng sau khi sinh, với biến chứng đáng lưu ý là rối loạn chức năng nội mạc làm người mẹ có nguy cơ cao mắc các bệnh lý tim mạch.

Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của tiền sản giật – sản giật cho đến nay vẫn chưa được hiểu biết một cách rõ ràng, vì vậy biện pháp điều trị và chiến lược dự phòng đang còn hạn chế. Tuy nhiên, nhau thai đã được xác nhận là đóng một vai trò rất quan trọng trong cơ chế bệnh sinh vì những dấu hiệu của tiền sản giật – sản giật vẫn có thể xảy ra trên một thai trứng (không có thai) và bệnh lý này chỉ có thể được giải quyết triệt để một khi đưa được nhau thai ra ngoài. Sự phát triển của nhau thai tùy thuộc vào sự xâm nhập thích hợp của lá nuôi phôi, sự tái tạo mạch máu và luồng máu ở khoang giữa các nhung mao [13]. Những người bị tiền sản giật – sản giật thường biểu hiện tình trạng tăng đông máu bao gồm đông máu nội mạch, vi huyết khối và suy giảm tuần hoàn tử cung – nhau thai [6]. Những nghiên cứu gần đây cho thấy trong quá trình mang thai bình thường, lá nuôi phôi (trophoblast) tổng hợp và tiết ra một lượng lớn các cytokine đóng vai trò quan trọng trong đông máu và tiêu sợi huyết hệ thống cũng như của nhau thai như các yếu tố hoạt hóa plasminogen (t-PA và u-PA). Các yếu tố này làm biến đổi plasminogen bất hoạt trở thành plasmin hoạt hóa có hoạt tính proteinase, do đó làm tiêu fibrin. Để duy trì sự cân bằng hệ thống tiêu sợi huyết và đông máu, nhau thai cũng tiết ra yếu tố ức chế hoạt hóa plasminogen 1 (PAI-1: plasminogen activator inhibitor 1). Sự quá biểu hiện PAI-1 có thể làm ức chế giải phóng fibrin, từ đó dẫn đến hiện tượng tập trung fibrin quanh các nhung mao màng đệm và giảm trao đổi chất dinh dưỡng trong nhau thai, đây là những mắc xích quan trọng trong cơ chế bệnh sinh tiền sản giật – sản giật [14]. Nhiều tác giả như Estelles (1994) đã xác nhận một sự gia tăng có ý nghĩa của nồng độ PAI-1 trong huyết tương của các phụ nữ tiền sản giật – sản giật so với phụ nữ mang

thai bình thường [2]. PAI-1 là sản phẩm mã hóa của gene SERPINE1 (serine peptidase inhibitor, clade E, member 1) nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 7 (7q22.1), gene dài 12,2 kb gồm 9 exon và 8 intron [7].

Năm 2000, Poon và cs đã phát hiện được những sản phẩm phiên mã RNA đặc hiệu thai trong huyết tương mẹ bằng kỹ thuật RT-PCR [10]. Năm 2003, Ng và cộng sự đã thành công trong việc sử dụng kỹ thuật Realtime PCR để định lượng các mRNA nguồn gốc nhau thai lưu hành trong máu mẹ (các mRNA của các gen hPL, β hCG) [9]. Các tác giả trên cũng đã chứng minh được những mRNA này là mRNA tự do ngoài tế bào (cell-free mRNA) thông qua việc sử dụng phương pháp lọc, đồng thời các mRNA nhau thai này thanh thải khỏi máu mẹ rất nhanh sau khi sinh. Như vậy, việc khảo sát biểu hiện mRNA nhau thai trong huyết tương mẹ được xem như là một phương pháp để theo dõi chức năng nhau thai [11]. Purwosunu và cs năm 2007 và 2009 đã định lượng nồng độ mRNA của gene SERPINE1 trong huyết thanh của những phụ nữ mang thai từ 15-20 tuần và nhận thấy có sự gia tăng có ý nghĩa thống kê trong nhóm phụ nữ sau đó bị tiền sản giật – sản giật, đồng thời mức biểu hiện mRNA này có mối liên quan chặt chẽ với mức độ trầm trọng của bệnh [11], [12].

Để góp phần tìm hiểu các yếu tố dự báo nguy cơ tiền sản giật – sản giật ở mức độ phân tử, nhằm hỗ trợ xây dựng chiến lược dự phòng bệnh lý này, chúng tôi thực hiện đề tài này với các mục tiêu sau:

(1) Bước đầu áp dụng kỹ thuật Realtime RT – PCR để định lượng mRNA của gene SERPINE1 có nguồn gốc nhau thai trong huyết tương của các phụ nữ mang thai.

(2) Khảo sát mối liên quan giữa sự biểu hiện gene SERPINE1 ở mức mRNA với tiền sản giật – sản giật.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

180 thai phụ có tuổi thai từ 16-24 tuần đến khám thai định kỳ và tham gia chương trình sàng lọc nguy cơ tiền sản giật – sản giật tại bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế trong thời gian từ tháng 11 năm 2013 đến tháng 1 năm 2015.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu theo phương pháp tiến cứu: 180 thai phụ sau khi được khám thai và thu thập các thông tin và xác định nguy cơ tiền sản giật – sản giật đều được theo dõi đến lúc sinh và thêm 6 tuần sau đó để xác định có hay không có tiền sản giật – sản giật.

2.2.2. Tiêu chuẩn chẩn đoán

Tiền sản giật – sản giật được chẩn đoán theo Hướng dẫn chuẩn quốc gia về các dịch vụ chăm sóc sức khỏe sinh sản như sau:

- Chẩn đoán tiền sản giật khi có các triệu chứng sau:
 - + Huyết áp tâm thu > 140 mmHg hoặc huyết áp tâm trương > 90 mmHg, đo ít nhất hai lần, khi tuổi thai trên 20 tuần.
 - + Protein niệu > 3 g/l.
 - Tiền sản giật nặng khi có ít nhất một trong các triệu chứng sau:
 - + Huyết áp tâm thu > 160 mmHg hoặc huyết áp tâm trương > 110 mmHg, đo ít nhất hai lần, khi tuổi thai trên 20 tuần.
 - + Protein niệu \geq 5 g/24 giờ hoặc \geq 3 g trên hai mẫu nước tiểu được lấy cách nhau ít nhất 4 giờ.

Ngoài ra có thể có thêm các dấu hiệu: thiếu niệu (lượng nước tiểu < 400 ml/24 giờ), đau đầu nhưng không đáp ứng với các thuốc giảm đau thông thường, rối loạn thị giác và tri giác, phù phổi hoặc xanh tím, đau vùng thượng vị hoặc phần tư trên của hạ sườn phải.

- Sản giật: Có cơn giật với 4 giai đoạn điển hình (xâm nhiễm, giật cứng, giật giãn cách và hôn mê), kèm theo một số dấu hiệu tiền sản giật nặng.

2.2.3. Tiêu chuẩn loại trừ

- Các thai phụ từ chối tham gia nghiên cứu mRNA.
- Các thai phụ không theo dõi được đến hết 6 tuần sau sinh để phân nhóm có và không có tiền sản giật – sản giật.
- Các thai phụ được phát hiện có kèm chữa trứng.

2.2.4. Quy trình định lượng SERPINE1 mRNA

- Tách chiết RNA toàn phần: Lấy 7 ml máu tĩnh mạch của các thai phụ, chống đông trong EDTA, tách lấy huyết tương rồi quay ly tâm với vận tốc 1600g trong 10 phút ở 4°C. RNA toàn phần được tách từ 800 μ l huyết tương (được chia thành 4 phần ứng tách chiết) theo phương pháp PHENOL/CHCL₃. Nồng độ RNA và A260/A280 của mẫu được đo bằng máy Nano drop.

- Tổng hợp cDNA: Phản ứng RT-PCR để tổng hợp cDNA gồm 8 μ l RT-Mix, 15 μ l dịch chiết RNA toàn phần cho vào ống có chứa sẵn 1 enzyme RT (kit cDNA-H Synthesis). Cho ống phản ứng vào máy luân nhiệt Sure Cyclor 8800 (Agilent Technologies), với chu kỳ nhiệt là 25°C trong 5 phút; 42°C trong 30 phút; 85°C trong 5 phút; giữ ở 04°C. Mỗi lần đều có chạy kèm với 1 ống chứng dương và 1 ống chứng âm.

- Thực hiện phản ứng Realtime PCR: Mỗi ống phản ứng gồm 12,5 μ l iPremium qPCR Master Mix 2X; 1,2 μ l primer-probe(*) tương ứng, 11,3 μ l dung dịch cDNA đã được tổng hợp ở trên. Cho ống phản ứng vào máy

Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies), với chu kỳ nhiệt là biến tính ở 95°C trong 15 giây, gắn mỗi ở 60°C trong 1 phút (đọc kết quả tại bước này). Mỗi lần chạy phản ứng đều có chạy kèm một bộ chuẩn với 3 nồng độ là 10², 10⁴ và 10⁶ copy/ μ l.

(*): Sử dụng TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) gồm có PCR primer không đánh dấu và TaqMan MGB probe đánh dấu FAM.

+ Đối với gene SERPINE1: Human assay ID là Hs00167155_m1

+ Đối với gene GAPDH: Human assay ID là Hs99999905_m1

- Đọc kết quả bằng phần mềm MxPro v4.10 được tích hợp theo máy Realtime PCR. Nồng độ đo được biểu thị theo đơn vị số copy/ml huyết tương, sau khi đã hiệu chỉnh với hệ số pha loãng.

2.2.5. Xử lý số liệu

Các nồng độ mRNA của gene đích SERPINE1 và gene chứng GAPDH được biểu thị theo số copy/ml. Tính tỷ số SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA để so sánh giữa các nhóm có và không có TSG – SG. Sử dụng phần mềm thống kê y học MedCalc v.12 để thực hiện các kiểm định: t-test để so sánh trị trung bình, tính nguy cơ tương đối (RR: Relative risk), vẽ đường cong ROC cùng các trị số liên quan để đánh giá giá trị dự báo của chỉ điểm.

3. Kết quả nghiên cứu

Trong 180 thai phụ được đưa vào nghiên cứu và theo dõi đến hết thời kỳ hậu sản, đã có 14 trường hợp xuất hiện TSG – SG, chiếm tỷ lệ 7,9%.

3.1. Đánh giá quy trình định lượng mRNA của gene SERPINE1 trong huyết tương của các phụ nữ mang thai bằng kỹ thuật Realtime PCR

3.1.1. Chất lượng RNA toàn phần được tách từ huyết tương

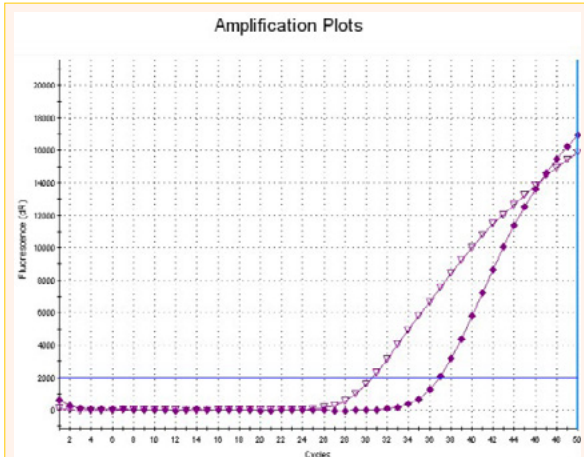
Bảng 3.1. Nồng độ RNA toàn phần được tách chiết (ng/ μ l)

Nồng độ RNA trung bình (ng/ μ l)	Độ lệch chuẩn	Tỷ lệ A260/A280 đạt tiêu chuẩn 1,8 - 2,0
65,8	79,8	100%

Nhận xét: Nồng độ RNA toàn phần trong huyết tương các thai phụ trung bình là 65,8 ng/ml với 100% số mẫu có A260/A280 trong khoảng 1,8 – 2,0, đạt tiêu chuẩn để thực hiện các kỹ thuật phân tích RNA.

3.1.2. Kết quả định lượng GAPDH mRNA (gene chứng) bằng kỹ thuật Realtime PCR

Nhận xét: Tỷ lệ mẫu định lượng được GAPDH mRNA bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR rất cao, đến 98,9% (178/180). Nồng độ GAPDH mRNA cũng rất cao.



Hình 1: Hình ảnh kết quả định lượng GAPDH mRNA và SERPINE1 mRNA bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR (mẫu 56)

Bảng 3.2. Nồng độ GAPDH mRNA

Nồng độ mRNA của gene GAPDH (copy/ml)	Nhóm thai phụ (n = 180)	
	Số mẫu	Tỷ lệ %
0	2	1,1
Dưới 10 ¹	2	1,1
Từ 10 ¹ - dưới 10 ²	8	4,4
Từ 10 ² - dưới 10 ³	17	9,4
Từ 10 ³ - dưới 10 ⁴	37	20,6
Từ 10 ⁴ - dưới 10 ⁵	39	21,7
Từ 10 ⁵ - dưới 10 ⁶	61	33,9
Từ 10 ⁶ - dưới 10 ⁷	13	7,2
Từ 10 ⁷ trở lên	1	0,6
X ± SD	4,45 x 10 ⁵ ± 1,40 x 10 ⁶	

3.1.3. Kết quả định lượng mRNA của gene SERPINE1 (gene đích) bằng kỹ thuật Realtime PCR

Nồng độ SERPINE1 mRNA của nhóm các thai phụ được trình bày trên 178 mẫu có kết quả định lượng GAPDH mRNA.

3.1.3.1. Nồng độ SERPINE1 – mRNA

Bảng 3.3. Nồng độ SERPINE1 mRNA trung bình và tỷ lệ dương tính theo các mức nồng độ GAPDH mRNA

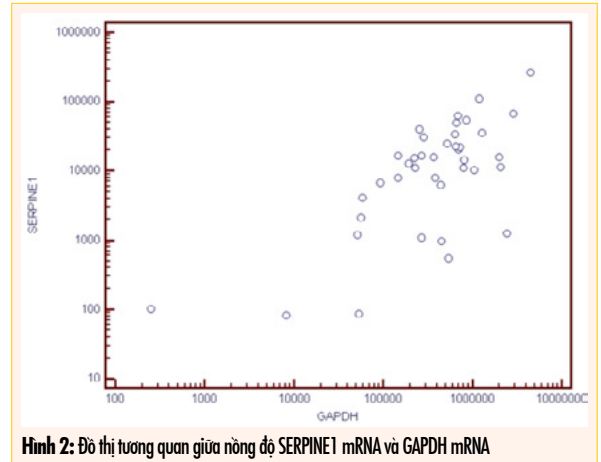
Nồng độ GAPDH mRNA (copy/ml)	SERPINE1 – mRNA dương tính	
	Số mẫu	Tỷ lệ %
Từ 10 ⁰ - dưới 10 ¹ (n = 2)	0	0,0
Từ 10 ¹ - dưới 10 ² (n = 8)	0	0,0
Từ 10 ² - dưới 10 ³ (n = 17)	1	5,9
Từ 10 ³ - dưới 10 ⁴ (n = 37)	1	2,7
Từ 10 ⁴ - dưới 10 ⁵ (n = 39)	5	12,8
Từ 10 ⁵ - dưới 10 ⁶ (n = 61)	24	39,3
Từ 10 ⁶ - dưới 10 ⁷ (n = 13)	8	61,5
Từ 10 ⁷ trở lên (n = 1)	0	0,0
Tổng (n = 178)	39	21,9
Nồng độ SERPINE1 mRNA trung bình của 39 mẫu dương tính	2,71 x 10 ⁴ ± 4,57 x 10 ⁴	

Nhận xét: Tỷ lệ mẫu đạt SERPINE1 mRNA dương tính có xu hướng tăng dần theo nồng độ GAPDH mRNA tương ứng. Ở các mẫu nồng độ GAPDH mRNA dưới 10⁴ copy/ml, tỷ lệ SERPINE1 mRNA dương tính chỉ đạt 2/64

= 3,1%; trong khi ở các mẫu nồng độ GAPDH mRNA từ 10⁴ copy/ml trở lên, tỷ lệ SERPINE1 mRNA dương tính đạt đến 37/114 = 32,5%. Nồng độ SERPINE1 mRNA của các mẫu dương tính cũng khá cao, trung bình là 2,71 x 10⁴ copy/ml.

3.1.3.2. Tương quan giữa nồng độ SERPINE1 mRNA và nồng độ GAPDH mRNA

Hệ số tương quan r = 0,7152; p < 0,0001; 95%CI = 0,5162 – 0,8410



Hình 2: Đồ thị tương quan giữa nồng độ SERPINE1 mRNA và GAPDH mRNA

Nhận xét: Có mối tương quan thuận và chặt giữa nồng độ SERPINE1 mRNA với nồng độ GAPDH mRNA.

3.2. Mối liên quan giữa sự biểu hiện gene SERPINE1 ở mức mRNA với tiền sản giật – sản giật

3.2.1. Tỷ lệ các thai phụ được phát hiện TSG – SG trong nhóm nguy cơ cao

Bảng 3.4. Tỷ lệ các thai phụ được phát hiện TSG - SG trong nhóm nguy cơ cao

Phân nhóm theo nồng độ GAPDH mRNA (copy/ml)	Phát hiện tiền sản giật – sản giật	
	Số thai phụ	Tỷ lệ %
Dưới 10 ⁴ (n = 64)	4	6,3
Từ 10 ⁴ trở lên (n = 114)	10	8,8
Tổng (n = 178)	14	7,9

Nhận xét: Sau khi theo dõi các thai phụ được sàng lọc nguy cơ cao TSG – SG cho đến ngày sinh và kéo dài thêm 6 tuần sau sinh, phát hiện có 14 bà mẹ bị TSG – SG, chiếm tỷ lệ 7,9%.

3.2.2. Nguy cơ tương đối mắc TSG – SG theo chỉ điểm SERPINE1 mRNA dương tính

Bảng 3.5. Nguy cơ tương đối mắc TSG – SG theo chỉ điểm SERPINE1 mRNA dương tính

Nồng độ GAPDH mRNA (copy/ml) của các thai phụ được khảo sát	RR	TSG - SG	Không TSG - SG	RR (95%CI)
Từ 10 ⁴ trở lên (n = 114)	SERPINE1 mRNA (+)	7	30	4,9 (1,3 - 17,7) p = 0,017
	SERPINE1 mRNA (-)	3	74	
Từ 10 ⁴ trở lên (n = 178)	SERPINE1 mRNA (+)	8	31	4,8 (1,8 - 12,9) p = 0,002
	SERPINE1 mRNA (-)	6	133	

Nhận xét: Phân tích nguy cơ tương đối (RR: relative risk) cho thấy nguy cơ mắc TSG – SG khi có một thai phụ

có SERPINE1 mRNA dương tính cao gấp 4,9 lần so với thai phụ có SERPINE1 mRNA âm tính, nếu chỉ xét khi kết quả định lượng mRNA gene chứng GAPDH cao từ 104 copy/ml trở lên. Nguy cơ này cũng cao gấp 4,8 lần nếu xét trên toàn bộ thai phụ có mRNA gene chứng dương tính.

3.2.3. Tỷ số SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA ở nhóm có và không có TSG – SG

Bảng 3.6. So sánh tỷ số SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA ở nhóm có và không có TSG – SG

SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA	TSG – SG (n = 8)	Không TSG – SG (n = 31)	p (t-test)
Trung bình	0,120	0,036	0,0012
Độ lệch chuẩn	0,125	0,029	

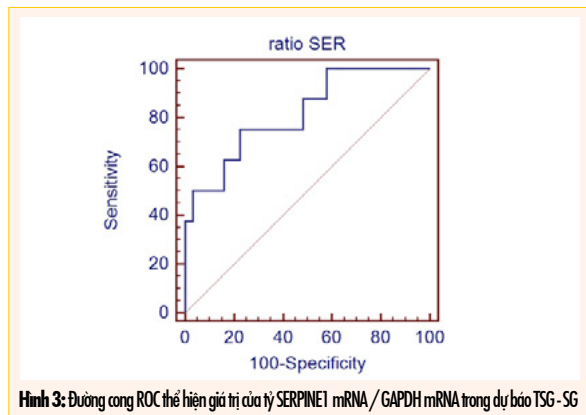
Nhận xét: Tỷ số SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA ở nhóm có TSG – SG cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có TSG – SG ($0,120 \pm 0,125$ so với $0,036 \pm 0,029$).

3.2.3. Khảo sát đường cong ROC đối với chỉ điểm là tỷ SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA

- Diện tích dưới đường cong ROC (AUC) = 0,815 (95%CI: 0,658 – 0,921)

- Điểm cắt tối ưu: > 0,0596.

- Độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng tại điểm cắt này lần lượt là 75% và 77,42%.



Hình 3: Đường cong ROC thể hiện giá trị của tỷ SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA trong dự báo TSG-SG

4. Bàn luận

4.1. Đánh giá quy trình định lượng mRNA của gene SERPINE1 trong huyết tương của các phụ nữ mang thai bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR.

4.1.1. Chất lượng RNA toàn phần

Trong những năm đầu thế kỷ 21, nhiều nhà nghiên cứu đã chứng minh được sự hiện diện của RNA trong huyết tương của người [10]. Trước đây, phát hiện này được ứng dụng chủ yếu trong chẩn đoán và theo dõi bệnh lý ung thư. Về sau, nhiều tác giả đã chứng minh mRNA nguồn gốc nhau thai cũng hiện diện trong huyết thanh mẹ với sự ổn định đáng kể và nhanh chóng được

thanh thải sau khi sinh [9]. Điều này đã mở ra những hứa hẹn chẩn đoán và theo dõi trước sinh không xâm nhập cho nhiều tình trạng bệnh lý khác nhau, trong đó có TSG – SG [3], [8], [11]. Trong phạm vi đề tài này, với mục đích khảo sát mRNA của gene SERPINE1 (một gene được biểu hiện ở nhau thai) trong huyết tương mẹ, bước đầu chúng tôi đã tách RNA toàn phần trong huyết tương của 180 phụ nữ mang thai với tuổi thai từ 16 – 24 tuần tuổi. Kết quả ở bảng 3.1 cho thấy nồng độ RNA được chiết tách ở các mẫu là $65,8 \pm 79,8$ ng/ μ l. Giá trị nồng độ như vậy là đủ để thực hiện các kỹ thuật phân tích RNA. Việc tách RNA thường khó khăn hơn so với tách DNA vì RNA dễ bị phân hủy bởi nhiều loại nuclease hơn so với DNA. Ngoài ra, RNA tự do trong huyết tương có nồng độ thường rất thấp nhưng chúng tôi đã chiết tách được với các nồng độ trên là một thành tích khá khả quan, tạo điều kiện cho việc phân tích biểu hiện gene ở mức RNA. Về chất lượng RNA được tách chiết, chúng tôi đánh giá bằng tỷ số A260/A280 (đo trên máy Nano drop), kết quả các mẫu của chúng tôi có tỷ số này nằm trong giới hạn 1,8 – 2,0, chứng tỏ mẫu rất tinh sạch, hầu như không lẫn protein.

4.1.2. Kết quả định lượng GAPDH mRNA (gene chứng) bằng kỹ thuật Realtime PCR

Trong qui trình định lượng mRNA bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR, chúng tôi thực hiện song song các phản ứng đặc hiệu với gene đích và gene GAPDH, trong đó GAPDH được sử dụng làm chứng dương cho quy trình này. Hầu hết các nghiên cứu đều sử dụng gene GAPDH để làm chứng dương [8], [11], [14]. Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy tỷ lệ thành công của phản ứng Realtime RT-PCR đối với gene GAPDH của chúng tôi là 98,9%. Tỷ lệ dương tính với GAPDH mRNA trong các mẫu nghiên cứu rất cao như vậy cho phép khẳng định độ tin cậy cao trong việc ứng dụng kỹ thuật Realtime RT-PCR tại phòng thí nghiệm của chúng tôi. Khi khảo sát nồng độ trung bình của GAPDH mRNA trong các mẫu dương tính chúng tôi thu được giá trị nồng độ $X \pm SD$ là $4,45 \times 10^5 \pm 1,40 \times 10^6$ copy/ml. Nồng độ GAPDH mRNA trong nghiên cứu của chúng tôi khá cao, trong khi trong nghiên cứu của Ng (2003) thì khá thấp, kết quả định lượng trên 6 mẫu huyết tương thai phụ với tuổi thai từ 7-14 tuần chỉ đạt mức $1,08 \times 10^2$ copy/ml [9]. Sự khác biệt này là tuổi thai trong nghiên cứu của Ng chỉ từ 7-14 tuần, trong khi đó tuổi thai trong nghiên cứu của chúng tôi lớn hơn, từ 16-24 tuần.

4.1.3. Kết quả định lượng mRNA của gene SERPINE1 (gene đích) bằng kỹ thuật Realtime RT - PCR

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy trong 178 mẫu huyết tương thai phụ được khảo sát có 39 mẫu có nồng độ SERPINE1 mRNA dương tính, chiếm tỷ lệ 21,9%. Nghiên cứu của Poon năm 2000 cho thấy tỷ lệ phát hiện RNA

thai trong máu mẹ ở nhóm tuổi thai 11-19 tuần là 22% và ở nhóm 26-40 tuần là 63% [10]. Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện với mRNA của gene SERPINE1 có nguồn gốc nhau thai ở nhóm thai phụ có tuổi thai 16-24 tuần với tỷ lệ phát hiện 21,9% là phù hợp. Trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy ở các mẫu có nồng độ GAPDH mRNA thấp dưới 104 copy/ml thì hầu như không phát hiện được SERPINE1, chỉ 2/54 mẫu. Trong khi đó tỷ lệ phát hiện ở nhóm có nồng độ GAPDH mRNA cao trên 10⁴ copy/ml thì tỷ lệ phát hiện cao hơn nhiều đến 37/124 mẫu (32,5%). Đồ thị tương quan giữa hai nồng độ SERPINE1 mRNA và GAPDH mRNA cũng cho thấy mối tương quan thuận và chặt, với $r = 0,7152$, $p < 0,0001$. Từ kết quả này, chúng tôi cho rằng muốn khảo sát mối liên quan giữa SERPINE1 mRNA với TSG – SG thì không thể sử dụng nồng độ tuyệt đối mà phải xem xét trong mối liên quan với tỷ SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA. Tác giả Teng và Farina cũng sử dụng một khái niệm tương tự và biểu thị dưới dạng “ $-\Delta\Delta Ct$ ” (Ct: số chu kỳ ngưỡng) [14] và nồng độ tương đối [3].

4.2. Mối liên quan giữa sự biểu hiện gene SERPINE1 ở mức mRNA với tiền sản giật – sản giật

Chúng tôi đã theo dõi các thai phụ được sàng lọc nguy cơ cao TSG – SG cho đến ngày sinh và kéo dài thêm 6 tuần sau sinh, phát hiện có 14 bà mẹ bị TSG – SG, chiếm tỷ lệ 7,9%; trong đó có 4 bà mẹ TSG – SG thuộc nhóm nồng độ GAPDH mRNA dưới 10⁴ copy/ml và 10 bà mẹ TSG – SG thuộc nhóm nồng độ GAPDH mRNA từ 10⁴ copy/ml trở lên. Như vậy, chúng tôi sẽ sử dụng nhóm 14 bà mẹ TSG – SG và 164 không mắc TSG – SG để phân tích nguy cơ. Ngoài ra chúng tôi xét thêm yếu tố có nồng độ mRNA gene chúng GAPDH được định lượng ở mức cao từ 10⁴ copy/ml trở lên, khi đó nhóm có TSG – SG là 10 người và nhóm không có TSG – SG là 104 người.

Kết quả phân tích nguy cơ tương đối (RR: relative risk) ở bảng 3.5 cho thấy nguy cơ mắc TSG – SG khi có một thai phụ có SERPINE1 mRNA dương tính cao gấp 4,8 lần (95%CI: 1,8 – 12,9) so với thai phụ có SERPINE1 mRNA âm tính. Nếu xem xét thêm yếu tố nồng độ mRNA gene chúng GAPDH cao từ 10⁴ copy/ml trở lên thì nguy cơ này cao gấp 4,9 lần (95%CI: 1,3 – 17,7). Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy SERPINE1 mRNA là một yếu tố giúp dự báo nguy cơ mắc TSG – SG rất có giá trị.

Như đã phân tích ở phần 4.1.3, chúng tôi nhận thấy nồng độ SERPINE1 mRNA tương quan chặt và thuận với nồng độ GAPDH mRNA (gene chúng) nên chúng tôi không so sánh nồng độ tuyệt đối của SERPINE1 mRNA giữa hai nhóm có và không có TSG – SG. Thay vào đó, chúng tôi sử dụng tỷ số SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA để so sánh. Kết quả ở bảng 3.6 cho thấy tỷ số SERPINE1

mRNA / GAPDH mRNA ở nhóm có TSG – SG là $0,120 \pm 0,125$; cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có TSG – SG (chỉ $0,036 \pm 0,029$) với $p = 0,0012$. Một nghiên cứu của Purwosunu (Nhật Bản, 2007) thực hiện trên 43 thai phụ TSG – SG và 41 thai phụ bình thường có tuổi thai từ 35 – 41 tuần cho thấy MoM của SERPINE1 mRNA (còn gọi là PAI-1 mRNA) ở nhóm TSG – SG cao gấp 2,48 lần so với nhóm bình thường, $p < 0,001$ [11]. Nghiên cứu khác của Purwosunu và cs năm 2009 trên 372 thai phụ có tuổi thai từ 15 – 20 tuần cho thấy trung bình của nồng độ SERPINE1 mRNA (tác giả sử dụng log₁₀ scale của số copy/ml) ở nhóm TSG – SG ($n = 62$) là $2,66 \pm 0,57$, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ở nhóm không TSG – SG ($n = 310$) là $2,27 \pm 0,39$, với $p = 0,001$ [12]. Bên cạnh đó, vẫn có một nghiên cứu của Farina (2006) theo dõi trên 36 phụ nữ mang thai có 6 người TSG – SG và 30 người bình thường, kết quả nồng độ tương đối (RC: relative concentration) của SERPINE1 mRNA ở nhóm TSG – SG thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm bình thường, giá trị trung bình của RC là 2.257.443 so với 3.071.068, $p < 0,05$ [3]. Tuy nhiên, sau đó cũng chính Farina đã tham gia trong các nghiên cứu của Purwosunu năm 2007, 2009 và cũng có nhận định tương tự chúng tôi.

Trước đây, nhiều nghiên cứu ở mức biểu hiện protein cũng có nhận định protein PAI-1 (sản phẩm mã hóa của gene SERPINE1 ở nhau thai) tăng cao ở nhóm TSG – SG so với nhóm bình thường. Năm 1989, Feinberg đã tìm thấy PAI-1 trong lá nuôi phôi người [4]. Từ đó mở ra hàng loạt các nghiên cứu về protein này trong các bệnh lý liên quan nhau thai mà đặc biệt là TSG – SG. Đầu tiên là nghiên cứu của Halligan năm 1994 [5] và sau đó Estelles khẳng định lại vào năm 1998 [2] về nồng độ PAI-1 huyết tương mẹ tăng cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm TSG – SG so với nhóm bình thường. Năm 2009, Teng và cs đã định lượng SERPINE1 mRNA trong tổ chức nhau thai và nhận thấy nồng độ của nhóm TSG – SG cao hơn nhóm bình thường có ý nghĩa thống kê, giá trị $-\Delta\Delta Ct$ của hai nhóm lần lượt là $66,15 \pm 27,70$ và $59,52 \pm 47,29$, $p < 0,05$ [14]. Những nghiên cứu này đã cho thấy kết quả nghiên cứu của chúng tôi là phù hợp. Có nhiều giả thuyết có thể giải thích cho sự thay đổi của RNA trong huyết tương mẹ này. Sự biến đổi liên quan apoptosis trong lá nuôi của nhung mao nhau thai trong các phụ nữ TSG – SG là một nguyên nhân làm phóng thích các acid nucleic trong máu mẹ [1]. Hiện tượng nhồi máu lan rộng trong nhau thai của bệnh nhân TSG – SG cũng liên quan với hoạt tính miễn dịch có tính chỉ điểm cho hệ thống hoạt hóa plasminogen (PA) [2], [4].

Ngoài ra, trong nghiên cứu này chúng tôi còn khảo sát đường cong ROC dựa trên kết quả tỷ số SERPINE1

mRNA / GAPDH mRNA của 39 thai phụ, kết quả cho thấy diện tích dưới đường cong ROC (AUC) là 0,815, chúng tỏ tỷ số SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA có giá trị dự báo TSG – SG tốt, xác suất đúng là 81,5%. Theo chương trình thống kê MedCalc mà chúng tôi sử dụng, điểm cắt tối ưu được gợi ý cho dự báo là $> 0,0596$, với độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng lần lượt là 75% và 77,42%. Kết quả này một lần nữa khẳng định nồng độ tăng cao của SERPINE1 mRNA trong máu mẹ là một yếu tố dự báo TSG – SG.

5. Kết luận

Qua nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật Realtime RT-PCR để định lượng nồng độ mRNA của gene đích SERPINE1 và gene chứng GAPDH trong huyết tương của 180 thai phụ đã được sàng lọc có nguy cơ TSG – SG cao, chúng tôi có những kết luận như sau:

5.1. Về quy trình định lượng mRNA của gene SERPINE1 trong huyết tương thai phụ bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR:

Chúng tôi đã ứng dụng thành công quy trình định

lượng SERPINE1 mRNA bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR, cụ thể là:

- Tỷ lệ mẫu có mRNA của gene chứng GAPDH cao, lên đến 98,9% và nồng độ trung bình là $4,45 \times 10^5 \pm 1,40 \times 10^6$ copy/ml.

- Tỷ lệ mẫu có SERPINE1 mRNA dương tính là 21,9% với nồng độ trung bình là $2,71 \times 10^4 \pm 4,57 \times 10^4$ copy/ml.

5.2. Về mối liên quan giữa sự biểu hiện gene SERPINE1 ở mức mRNA với tiền sản giật – sản giật:

- Nguy cơ mắc TSG – SG khi có một thai phụ có SERPINE1 mRNA dương tính cao gấp 4,8 lần (95%CI: 1,8 – 12,9) so với thai phụ có SERPINE1 mRNA âm tính. Nếu xem xét thêm yếu tố nồng độ mRNA gene chứng GAPDH cao từ 104 copy/ml trở lên thì nguy cơ này cao gấp 4,9 lần (95%CI: 1,3 – 17,7).

- Tỷ số SERPINE1 mRNA / GAPDH mRNA ở nhóm có TSG – SG là $0,120 \pm 0,125$; cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có TSG – SG ($0,036 \pm 0,029$). Xác suất dự báo đúng TSG – SG cho một thai phụ có tỷ số này cao là 81,5% (95%CI: 65,8 – 92,1%), với điểm cắt của tỷ số này $> 0,0596$ thì độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 75% và 77,42%.

Tài liệu tham khảo

- DiFederico E., Genbacev O., Fisher S. J. (1999), "Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall", The American journal of pathology, 155(1), pp. 293-301.
- Estelles A., Gilabert J., Keeton M., Eguchi Y., Aznar J., Grancha S., Espna F., Loskutoff D., Schleaf R. (1994), "Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation", 84(1), pp. 143-150.
- Farina A., Sekizawa A., Purwosunu Y., Rizzo N., Banzola I., Concu M., Morano D., Giommi F., Bevini M., Mabrook M. (2006), "Quantitative distribution of a panel of circulating mRNA in preeclampsia versus controls", Prenatal diagnosis, 26(12), pp. 1115-1120.
- Feinberg R., Kao L.-C., Haimowitz J., Queenan Jr J., Wun T., Strauss 3rd J., Kliman H. (1989), "Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts. PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts", Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 61(1), pp. 20-26.
- Halligan A., Bonnar J., Sheppard B., Darling M., Walshe J. (1994), "Haemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal pregnancies and pre-eclampsia", BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 101(6), pp. 488-492.
- Lanir N., Aharon A., Brenner B. (2003), "Haemostatic mechanisms in human placenta", Best Practice & Research Clinical Haematology, 16(2), pp. 183-195.
- Loskutoff D. J., Linders M., Keijer J., Veerman H., Van Heerikhuizen H., Pannekoek H. (1987), "Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: nonrandom distribution of introns", Biochemistry, 26(13), pp. 3763-3768.
- Ng E. K., Leung T. N., Tsui N. B., Lau T. K., Panesar N. S., Chiu R. W., Lo Y. D. (2003), "The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia", Clinical Chemistry, 49(5), pp. 727-731.
- Ng E. K., Tsui N. B., Lau T. K., Leung T. N., Chiu R. W., Panesar N. S., Lit L. C., Chan K.-W., Lo Y. D. (2003), "mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma", Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(8), pp. 4748-4753.
- Poon L. L., Leung T. N., Lau T. K., Lo Y. D. (2000), "Presence of fetal RNA in maternal plasma", Clinical Chemistry, 46(11), pp. 1832-1834.
- Purwosunu Y., Sekizawa A., Koide K., Farina A., Wibowo N., Wikjosastro G. H., Okazaki S., Chiba H., Okai T. (2007), "Cell-free mRNA concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia", Clinical chemistry, 53(3), pp. 399-404.
- Purwosunu Y., Sekizawa A., Okazaki S., Farina A., Wibowo N., Nakamura M., Rizzo N., Saito H., Okai T. (2009), "Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free messenger RNA in maternal plasma", American Journal of Obstetrics and Gynecology, 200(4), pp. 386.e1-386.e7.
- Redman C. W., Sargent I. L. (2005), "Latest advances in understanding preeclampsia", Science, 308(5728), pp. 1592-1594.
- Teng Y.-C., Lin Q.-D., Lin J.-H., Ding C.-W., Zuo Y. (2009), "Coagulation and fibrinolysis related cytokine imbalance in preeclampsia: the role of placental trophoblasts", Journal of perinatal medicine, 37(4), pp. 343-348.