



Nghiên cứu

PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN GEN CLCA2, HMGB3 VÀ B-ACTIN TRONG DNA HUYẾT TƯƠNG BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ

Lê Hoàng Phương¹, Nguyễn Việt Gia Thịnh², Lê Hữu Tùng³, Phạm Nguyễn Huy Hoàng¹, Nguyễn Như Hoàng Oanh¹, Nguyễn Văn Hương¹

¹Đại học Nguyễn Tất Thành, ²Trường Y, Đại học Y Dược TP.HCM, ³Bệnh viện Lê Văn Thịnh

TÓM TẮT:

Ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC) là loại ung thư phổi phổ biến nhất. Việc phát hiện sớm thông qua các dấu ấn sinh học như CLCA2, HMGB3 và β -actin trong huyết tương có ý nghĩa quan trọng. Nghiên cứu này nhằm khảo sát vai trò của các gen CLCA2, HMGB3 và β -actin trong chẩn đoán NSCLC bằng xét nghiệm real-time PCR. **Phương pháp:** Nghiên cứu thực hiện trên 40 bệnh nhân NSCLC và 40 người khỏe mạnh. CLCA2, HMGB3 và β -actin được tách chiết từ huyết tương và phân tích bằng kỹ thuật multiplex PCR và qPCR. Các chỉ số thống kê được phân tích bằng SPSS, đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu qua đường cong ROC. **Kết quả:** Nồng độ CLCA2, HMGB3 và β -actin ở bệnh nhân cao hơn rõ rệt so với người bình thường ($p < 0,0001$). AUC của β -actin là 0,71; CLCA2 là 0,86 và HMGB3 là 0,85. Độ nhạy và độ đặc hiệu đạt 100% tại các ngưỡng biểu hiện xác định. **Kết luận:** CLCA2, HMGB3 và β -actin là những dấu ấn sinh học tiềm năng trong phát hiện sớm NSCLC bằng real-time PCR. Phát hiện này góp phần nâng cao hiệu quả chẩn đoán không xâm lấn ung thư phổi.

Từ khóa: Ung thư phổi không tế bào nhỏ, CLCA2, HMGB3, β -actin, realtime PCR, dấu ấn sinh học.

Abstract: ANALYSIS OF CLCA2, HMGB3 AND B-ACTIN GENE EXPRESSION IN PLASMA DNA OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer. Early detection through biomarkers such as CLCA2, HMGB3 và β -actin in plasma is significant. This study aims to investigate the role of CLCA2, HMGB3 and β -actin genes in the diagnosis of NSCLC by real-time PCR test. **Methods:** The study was conducted on 40 NSCLC patients and 40 healthy people. CLCA2, HMGB3 và β -actin is extracted from plasma and analyzed by multiplex PCR and qPCR techniques. Statistical indicators are analyzed using SPSS, which evaluates sensitivity and specificity via the ROC curve. **Results:** The levels of CLCA2, HMGB3 and β -actin in patients were significantly higher than those in normal people ($p < 0.0001$). The AUC of β -actin is 0.71; CLCA2 is 0.86 and HMGB3 is 0.85. Sensitivity and specificity reach 100% at defined expression thresholds. **Conclusions:** CLCA2, HMGB3 and β -actin are potential biomarkers in the early detection of NSCLC by real-time PCR. This finding contributes to improving the effectiveness of non-invasive diagnosis of lung cancer.

Keywords: Non-small cell lung cancer, CLCA2, HMGB3, β -actin, realtime PCR, biomarker.



1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là một trong những bệnh lý ác tính thường gặp và gây tử vong hàng đầu trên toàn cầu, đứng thứ hai về tỷ lệ mắc (sau ung thư vú) nhưng lại chiếm tỷ lệ tử vong cao nhất trong tất cả các loại ung thư (chiếm 18%) [4]. Mỗi năm có khoảng 1,8 triệu người tử vong vì ung thư phổi, cho thấy đây là một gánh nặng lớn đối với hệ thống y tế toàn cầu. Trong số các biến thể, ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC) chiếm khoảng 85% tổng số ca [13]. Đây là thể bệnh có đặc điểm tiến triển âm thầm, triệu chứng không đặc hiệu và thường được chẩn đoán ở giai đoạn muộn, khi khối u đã xâm lấn hoặc di căn xa. Tại Việt Nam, NSCLC cũng đang có xu hướng tăng nhanh, đặc biệt ở nhóm tuổi 50-69, với tỷ lệ mắc bệnh cao ở cả hai giới. Một số yếu tố nguy cơ được xác định bao gồm hút thuốc lá, tiếp xúc với bụi mịn, amiăng, ô nhiễm không khí, yếu tố di truyền và thay đổi nội tiết. Bên cạnh các yếu tố môi trường, sự tiến triển của NSCLC còn gắn liền với các thay đổi di truyền và biểu sinh trong tế bào biểu mô phổi [7].

Trong những năm gần đây, nghiên cứu về các biến đổi gen liên quan đến cơ chế sinh ung và tiến triển của NSCLC đã mở ra hướng tiếp cận mới trong chẩn đoán và điều trị. Nhiều gen như EGFR, ALK, ROS1, KRAS, BRAF, MET, PIK3CA,... được xác định là có vai trò quan trọng trong hoạt hóa các con đường tín hiệu thúc đẩy tăng sinh, chống apoptosis và di căn [9]. Việc xác định đặc điểm genotype của bệnh nhân, thông qua phân tích biểu hiện gen và đột biến đặc hiệu, đang trở thành một phần thiết yếu trong điều trị ung thư hiện đại, nhất là khi cá thể hóa điều trị ngày càng được chú trọng [11]. Trong bối cảnh đó, CLCA2, HMGB3 và β -actin trong huyết tương được xem là nguồn thông tin di truyền có giá trị. Những đoạn DNA chứa CLCA2, HMGB3 và β -actin ngấn giải phóng từ tế bào chết vào máu ngoại vi, có thể phản ánh hoạt động sinh học của khối u cũng như các phản ứng sinh lý khác của cơ thể [3]. Ở bệnh nhân ung thư, hàm lượng CLCA2, HMGB3 và β -actin tăng cao, trong đó chứa các dấu vết phân tử đặc hiệu liên quan đến bệnh lý, bao gồm cả các gen sinh ung, gen ức chế khối u hoặc các gen điều hòa phiên mã [12].

Kỹ thuật realtime PCR là một phương pháp sinh học phân tử có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, cho phép định lượng chính xác số lượng bản sao gen từ DNA trong huyết tương [6]. Đây là công cụ hữu hiệu trong việc đánh giá sự biểu hiện bất thường của các gen đích ở bệnh nhân ung thư, từ đó hỗ trợ công tác chẩn đoán, tiên lượng và theo dõi điều trị [6].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định tải lượng DNA trong huyết tương và phân tích biểu hiện một số gen có liên quan đến quá trình sinh ung và di căn ở bệnh nhân NSCLC, cụ thể là CLCA2, HMGB3 và β -actin. Nghiên cứu hướng đến việc xác định mối liên quan giữa tải lượng gen với các yếu tố lâm sàng - mô học của bệnh nhân NSCLC. Kết quả kỳ vọng sẽ góp phần cung cấp thêm bằng chứng khoa học trong việc ứng dụng xét nghiệm phân tử vào hỗ trợ chẩn đoán và theo dõi NSCLC, đồng thời mở ra tiềm năng phát triển các công cụ phát hiện sớm dựa trên các chỉ dấu gen trong DNA.



2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu được thực hiện trên 80 bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn I-III từ ngày 01/06/2023 - 31/03/2025. Tất cả các bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu và được thông qua Hội đồng Y đức. 80 bệnh nhân được thực hiện các xét nghiệm sinh hóa thường quy kết hợp nhằm chẩn đoán ung thư, trong đó 40 bệnh nhân mắc ung thư phổi không tế bào nhỏ và 40 bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến. Mẫu chứng được thực hiện đồng thời trên 40 người bình thường.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Xử lý và bảo quản mẫu:

Tiến hành thu 5-8 ml máu ngoại vi của bệnh nhân vào các ống EDTA, ổn định mẫu trong 30 phút. Mẫu máu toàn phần được phân tách huyết tương bằng cách ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch nổi. Dịch nổi được tiếp tục ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ hoàn toàn tạp chất, thu 1ml huyết tương tinh sạch. Huyết tương sau đó được bảo quản ở -80°C cho đến khi được sử dụng [2].

2.2.2. Tách chiết DNA của tế bào máu ngoại vi:

Tách chiết DNA tinh khiết từ mẫu huyết thanh bằng bộ tách chiết DNA/RNA virus PrimeWay Kit (KIT-9010-50, 1st Base, Singapore) (PrimeWay, 2023).

Chuẩn bị buffer ly giải, cho 200μl huyết tương tinh sạch vào tube 1,5ml. Thêm 400μl buffer ly giải đã chuẩn bị, vortex trong 5s sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Thêm 400μl buffer BS và trộn đều. Chuyển hỗn hợp qua cột PrimeWay VNA, ly tâm 14000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch. Cho phần buffer ly giải còn lại vào cột PrimeWay VNA, ly tâm 14000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch. Thêm 400μl buffer WBA, ly tâm 14000 vòng/phút trong 30 giây, bỏ dịch. Thêm 600μl buffer WBB, ly tâm 14000 vòng/phút trong 30 giây, bỏ dịch, tiếp tục ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 3 phút để làm khô cột. Thêm 50μl nước không chứa DNase vào cột để yên trong 3 phút, sau đó ly tâm 14000 vòng/phút trong 1 phút, thu nhận DNA. Bảo quản ở 4°C hoặc -20°C.

2.2.3. Nhận diện gen CLCA2 và HMGB3 bằng xét nghiệm multiplex PCR:

Nhận diện CLCA2 và HMGB3 bằng phương pháp PCR: Cho 25μL cho một phản ứng PCR bao gồm TaqMan Buffer 1X, MgCl₂ 5 mM, dCTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dUTP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, UNG 0,01 U/ml, Taq Polymerase 0,0375 U, 300 nM cho mỗi đoạn mồi CLCA2 - 2IS: F 5'-ATGGCAGAGGCTGACAGACTC-3'; R 5'-TTCAACC ACCTCAAATCCTTTCTTA-3', 50 nM cho mỗi đoạn mồi HMGB3-2IS: F 5'-GG CCACCGTCTGGATTCTTC-3'; R 5'-TCGACTTATAGTCAGCAACATCCTTCT-3', Free DNA water được thêm vào sao cho đủ 25 μL và 2 μL DNA.



Chu trình nhiệt có 50 chu kỳ bao gồm bước biến tính ban đầu ở 50°C trong 2 phút, 1 chu kỳ, 95°C trong 10 phút, 1 chu kỳ và 50 chu kỳ: 95°C trong 15 giây, 60°C trong 1 phút, 68°C trong 1 phút, với chứng âm là thành phần tham gia phản ứng PCR không chứa DNA và chứng dương là gen CLCA2 và HMGB3 với kích thước lần lượt là 249 bp và 204 bp. Tiến hành điện di các sản phẩm PCR trên gel agarose 4% có bổ sung ethidium bromide ở 70V trong 30 phút. Sau khi điện di, lấy gel đã chạy điện di cho vào máy đọc gel Dolphin - View. Lưu ảnh kết quả vào USB.

2.2.4. Nhận diện DNA β - actin bằng xét nghiệm PCR:

Quá trình khuếch đại đoạn DNA bộ gen β -actin của người với sản phẩm có kích thước 99 bp bằng đoạn mồi có trình tự: Mồi xuôi: 5'-CCA CAC TGT GCC CAT CTA CG-3'; Mồi ngược: 5'-AGG ATC TTC ATG AGG TAG TCA GTC AG-3'; Thành phần tham gia phản ứng PCR nhận diện DNA β -actin có tổng thể tích 45 μ L gồm: PCR buffer 1X, dCTP 300 nM, dATP 300 nM, dUTP 300 nM, dGTP 300 nM, UNG 0,01 U/ml, MgCl₂ 3,5 mM, Taq Polymerase 0,06 U/ μ L, mỗi mồi PCR 500 nM. Free DNA water được thêm vào sao cho đủ 45 μ L và 5 μ L DNA β -actin. Điều kiện thực hiện phản ứng PCR gồm 40 chu kỳ: 95°C trong 12 phút, 95°C trong 15 giây, 64°C trong 1 phút. Chứng âm là thành phần tham gia phản ứng PCR không chứa DNA β -actin, chứng dương là DNA β -actin. Mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần và điện di các sản phẩm PCR trên gel agarose 4% có bổ sung ethidium bromide ở 70V trong 30 phút. Sau khi điện di, lấy gel đã chạy điện di cho vào máy đọc gel Dolphin - View. Lưu ảnh kết quả vào USB.

2.2.5. Khảo sát nồng độ gen CLCA2 và HMGB3 trong huyết tương bằng xét nghiệm qPCR:

Xác định nồng độ gen CLCA2 và HMGB3 trong huyết tương: Sử dụng dung dịch đệm qPCR gồm TaqMan buffer 1X, MgCl₂ 5 mM, dCTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dUTP 0,2 mM, dGTP 0,2 mM, UNG 0,01 U/ml, Taq Polymerase 0,0375 U, glycerol 8% v/v, Gelatin 0,05% v/v, Tween 20 0,01% v/v, Free DNA water được thêm vào sao cho đủ 25 μ L dung dịch đệm qPCR và 2 μ L DNA tự do. Đối với đoạn gen CLCA2, thêm vào dung dịch đệm qPCR 300 nM mỗi đoạn mồi khuếch đại đoạn gen mục tiêu: CLCA2-2ISF: 5'-ATGGCAGAGGCTGACAGACTC-3'; CLCA2-2ISR: 5'-TTCAACCACCTCAAATCCTTTACCGTCTGGATTCTTC-3'; và 3 pmol của đầu dò: CLCA2 5'-6HEX-TCGACAGCAAAGGAGAGATCAG AGCCC-3'-TAMRA; Đối với đoạn gen HMGB3, thêm vào dung dịch đệm qPCR 50 nM mỗi đoạn mồi khuếch đại đoạn gen mục tiêu: CLCA2-2ISF: 5'-ATGGCAGAGGCTGACAGACTC-3'; CLCA2-2ISR: 5'-TTCAACCACCTCAAATCCTTTACCGTCTGGATTCTTC-3' và 3 pmol của đầu dò: HMGB3 5'-6FAM-CCGCCCCAAGATCA AATCCACAAACC-3'-TAMRA.

Chu trình nhiệt có 50 chu kỳ bao gồm bước biến tính ban đầu ở 50°C trong 2 phút, 1 chu kỳ, 95°C trong 10 phút, 1 chu kỳ và 50 chu kỳ: 95°C trong 15 giây, 60°C trong 1 phút, 68°C trong 1 phút, với chứng âm là thành phần tham gia phản ứng PCR không chứa DNA và chứng dương là gen CLCA2 và HMGB3. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.6. Khảo sát nồng độ DNA β -actin trong huyết tương bằng xét nghiệm qPCR:



Xác định nồng độ DNA β -actin trong huyết tương: Sử dụng dung dịch đệm qPCR gồm PCR buffer 1X, $MgCl_2$ 3,5 mM, dCTP 300 nM, dATP 300 nM, dUTP 300 nM, dGTP 300 nM, UNG 0,01 U/ml, Taq Polymerase 0,06 U, glycerol 8% v/v, Gelatin 0,05% v/v, Tween 20 0,01% v/v, 3 pmol đầu dò Actin 5'-6 FAM CAGTCGGTTGGAGCGAGCATC CC- 3'-TAMRA; Mỗi đoạn mỗi 500 nM: Mỗi xuôi: 5'-CCA CAC TGT GCC CAT CTA CG-3'; Mỗi ngược: 5'-AGG ATC TTC ATG AGG TAG TCA GTC AG-3'; Free DNA water được thêm vào sao cho đủ 45 μ L dung dịch đệm qPCR và 5 μ L DNA tự do. Điều kiện thực hiện phản ứng gồm 40 chu kỳ: 95°C trong 12 phút, 95°C trong 15 giây, 64°C trong 1 phút. Chứng âm là thành phần tham gia phản ứng PCR không chứa DNA β -actin, chứng dương là DNA β -actin. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

2.3. Phân tích thống kê

Tất cả các phân tích thống kê đã được thực hiện bằng phần mềm SPSS. Khoảng tin cậy (CI) được tính toán ở mức 95%. Một mặt, các nhóm được so sánh bằng kiểm định χ^2 -test, ở mặt khác khi so sánh tỷ lệ ta dùng Z-test. Các giá trị $p < 0.05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Độ tuổi và giới tính ảnh hưởng đến bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ

Ung thư phổi không tế bào nhỏ là căn bệnh ung thư có nguồn gốc từ các vị trí khác nhau ở phổi và chiếm tỷ lệ đến 85% các trường hợp mắc ung thư phổi. Tình trạng trẻ hoá ở các bệnh nhân mắc bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ đang ngày càng phổ biến với tỷ lệ tăng dần do các yếu tố ngoại sinh như lối sống thiếu khoa học, hút thuốc, uống rượu, chế độ dinh dưỡng không hợp lý, quan hệ tình dục không an toàn, ô nhiễm môi trường.... Hoặc các yếu tố nội sinh như tuổi tác, giới tính, rối loạn chuyển hoá, di truyền...

Xét về yếu tố tuổi tác, kết quả ở Bảng 1 cho thấy tỷ lệ bệnh nhân ung thư phổi ở tế bào nhỏ xuất hiện chủ yếu ở độ tuổi trên 50 chiếm tỷ lệ 65% ($p < 0,05$) trong các độ tuổi khảo sát, trong đó độ tuổi > 70 chiếm tỷ lệ cao nhất là 30% ($p < 0,05$) và tỷ lệ mắc bệnh là như nhau ở (20-30) là 7,5%, (40-50) là 12,5% cho cả 2 giới. Ở độ tuổi ≤ 20 và > 70 , tỷ lệ nam giới (lần lượt là 5% và 32,5%, $p < 0,05$) mắc bệnh cao hơn nữ giới (lần lượt là 0% và 27,5%, $p < 0,05$).

Xét về yếu tố giới tính, ở nam giới có khả năng mắc bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ cao hơn nữ giới, khả năng mắc bệnh của nam giới xuất hiện ở hầu hết các độ tuổi. Trong khi ở nữ giới trong độ tuổi ≤ 20 không thấy xuất hiện bệnh. Ở nam giới và nữ giới có tỷ lệ mắc bệnh ung thư cao nhất ở độ tuổi > 70 (32,5% ở nam giới và 27,5% ở nữ giới, $p < 0,05$). Tuy nhiên, tỷ lệ nam giới mắc bệnh (10%, $p < 0,05$) ở độ tuổi (30-40) thấp hơn ở nữ giới (15%, $p < 0,05$). Còn ở độ tuổi (50-70), cũng có sự chênh lệch ở nam và nữ nhưng không đáng kể.

**Bảng 1.** Sự tương quan của độ tuổi với bệnh nhân nam và nữ

Độ tuổi	Tổng bệnh nhân		Bệnh nhân nam		Bệnh nhân nữ	
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
≤20	2	2,5	2	5	0	0
(20-30)	6	7,5	3	7,5	3	7,5
(30-40)	10	12,5	4	10	6	15
(40-50)	10	12,5	5	12,5	5	12,5
(50-60)	13	16,25	6	15	7	17,5
(60-70)	15	18,75	7	17,5	8	20
>70	24	30	13	32,5	11	27,5
Tổng	80	100	40	100	40	100

Dựa vào kết quả nghiên cứu phân tích sàng lọc ung thư phổi ở Bắc Mỹ cho thấy tỷ lệ mắc ung thư phổi không tế bào nhỏ ở phụ nữ cao hơn so với nam giới ở cùng độ tuổi (tỷ lệ chênh lệch 1,9, khoảng tham chiếu 95%: 1,5-2,5) [10]. Năm 2022, Linda Willéa và cộng sự đã công bố ung thư phổi không tế bào nhỏ có tỷ lệ mắc bệnh cao nhất ở độ tuổi >70 là nam giới và ở độ tuổi ≤69, nữ giới mắc bệnh nhiều hơn nam giới trong giai đoạn 2002 - 2016 [14]. Jemal A và cộng sự cho rằng độ tuổi mắc ung thư ở phụ nữ trẻ hơn nam giới và nằm trong lứa tuổi [30-49]. Tại Hoa Kỳ, Anish Thomas và cộng sự nhận định rằng ung thư phổi không phải tế bào nhỏ vẫn là căn bệnh phổ biến ở người lớn tuổi và ở độ tuổi <40 vẫn có bệnh nhân mắc phải căn bệnh này nhưng với tỷ lệ thấp [1]. Từ đó cho thấy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với các nghiên cứu trong những năm gần đây. Vì vậy, tùy thuộc vào giới tính, chủng tộc, khu vực và điều kiện sinh sống mà độ tuổi mắc bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ sẽ khác nhau, đây cũng là một điểm cần lưu ý về dịch tễ.

3.2. Tác nhân thuốc lá và rượu ảnh hưởng đến bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ

Hút thuốc lá được xem là nguyên nhân của 30% trong tổng số các loại ung thư ở người, bao gồm ung thư phổi không tế bào nhỏ [8]. Từ kết quả Bảng 2 cho thấy, tất cả đối tượng <20 tuổi không uống rượu. Tỷ lệ hút thuốc và uống rượu ở nam giới (35% và 47,5%, $p<0,05$) cao hơn ở nữ giới (5% và 7,5%, $p<0,05$), trong đó nam giới ở độ tuổi <70 có tỷ lệ hút thuốc vào uống rượu cao nhất (10% và 12,5%, $p<0,05$). Ở nữ giới, ở độ tuổi (20-30] không có bệnh nhân uống rượu và >50 tuổi không có bệnh nhân hút thuốc và uống rượu. Từ kết quả cho thấy, bệnh nhân nữ mắc bệnh có sử dụng rượu và thuốc lá đang có xu hướng trẻ hoá với độ tuổi từ 30-50, có tỷ lệ 2,5% ($p<0,05$) so với các bệnh nhân không sử dụng.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của thuốc lá và rượu ảnh hưởng đến bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ

Độ tuổi	Bệnh nhân nam				Bệnh nhân nữ			
	Uống rượu	Tỷ lệ (%)	Hút thuốc	Tỷ lệ (%)	Uống rượu	Tỷ lệ (%)	Hút thuốc	Tỷ lệ (%)
≤20	0	0	1	2,5	0	0	0	0
(20-30)	1	2,5	2	5	0	0	1	2,5
(30-40)	1	2,5	2	5	1	2,5	1	2,5
(40-50)	3	7,5	3	7,5	1	2,5	1	2,5
(50-60)	3	7,5	3	7,5	0	0	0	0
(60-70)	2	5	3	7,5	0	0	0	0
>70	4	10	5	12,5	0	0	0	0
Tổng	14	35	19	47,5	2	5	3	7,5

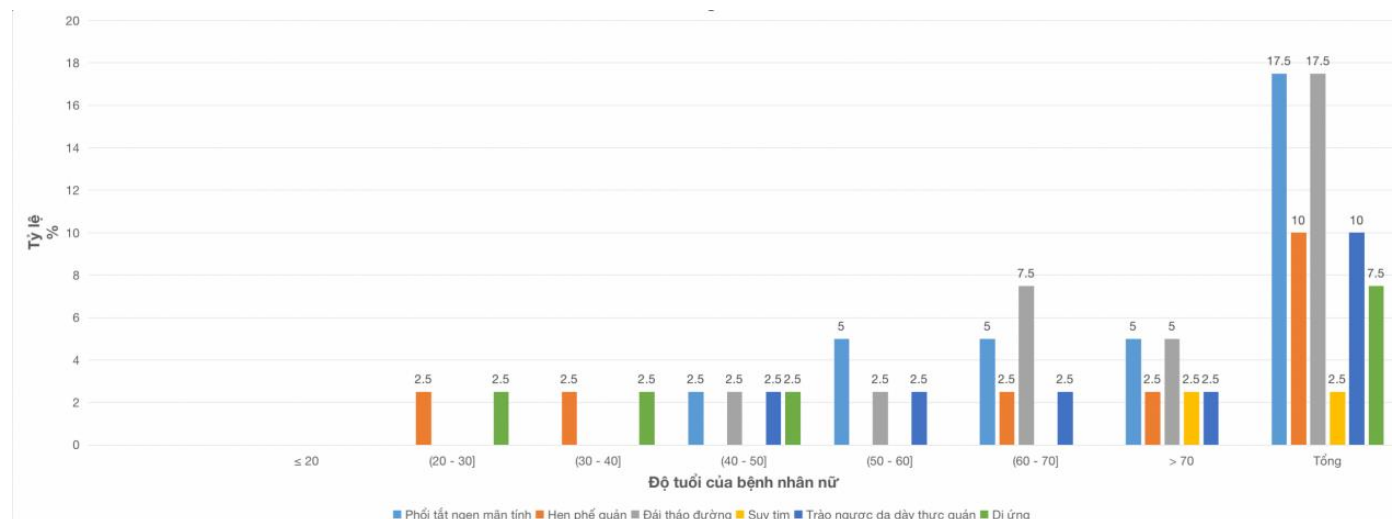
Theo số liệu thống kê của The North American Association of Central Cancer Registries vào năm 2018, tỷ lệ nam giới và nữ giới người Mỹ gốc La tinh ở độ tuổi (30-50) mắc bệnh liên quan đến thuốc lá tăng từ 0,88 (CI 95%: 0,84-0,92) thành 1,17 (CI 95%: 1,11-1,23) trong 10 năm và đang có xu hướng trẻ hoá ở nữ giới cao hơn nam giới. Năm 2021, theo thống kê của Hoa Kỳ, 80% những người mắc ung thư phổi đều liên quan đến thuốc lá. Một người hút một gói thuốc mỗi ngày có nguy cơ mắc ung thư phổi cao gấp 20 lần so với những người bình thường. Những người hít phải khói thuốc lá thường xuyên có tỷ lệ mắc bệnh cao hơn 30% so với những người bình thường. Hiệp hội đột biến ung thư phổi nhận định rằng nguy cơ ung thư phổi không tế bào nhỏ khác nhau theo tuổi, cường độ hút thuốc, thời gian hút thuốc và sẽ giảm sau khi ngừng hút thuốc, nhưng không bao giờ trở về mức bình thường như ở người không bao giờ hút thuốc. Có khoảng 15 đến 20% những người bị ung thư phổi chưa bao giờ hút thuốc hoặc hút thuốc không thường xuyên. Tỷ lệ hút thuốc ở phụ nữ đã tăng lên ở các nước đang phát triển. Ngoài ra, hút thuốc lá và uống rượu là hai yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phát triển của ung thư phổi không tế bào nhỏ. Tỷ lệ tiêu thụ rượu từ thấp (0,80, CI 95%, 0,70-0,90 đến trung bình 0,82, CI 95%, 0,69-0,99) có nguy cơ ung thư phổi cao hơn so với người không uống rượu (0,79, CI 95%, 0,65-0,96) tương ứng với mức tiêu thụ lần lượt là > 0-4,9g/ngày, 5-9,9g/ ngày và 10-19,9g/ngày [10]. Từ đó cho thấy, thuốc lá và rượu là những yếu tố tác động đến quá trình phát triển của tế bào ung thư và trẻ hoá của các bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ, cần hạn chế trong quá trình điều trị và trong chẩn đoán lâm sàng.

3.3. Tác động của tiền sử bệnh lý ảnh hưởng đến bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ

Tiền sử bệnh lý được khảo sát trong thử nghiệm bao gồm: phổi tắc nghẽn mãn tính, hen phế quản, đái tháo đường, suy tim, trào ngược dạ dày và dị ứng được khảo sát ở nhóm tuổi khác nhau của nam giới và nữ giới. Đối với nữ giới, tác nhân đái tháo đường chiếm tỷ lệ cao nhất (7,5%, $p < 0,05$) trong các bệnh lý tiền sử trong độ tuổi (60-70), tỷ lệ bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính là 5% trong độ tuổi >50 và không có tiền sử bệnh lý ở độ tuổi <20. Không xuất hiện các tình trạng phổi tắc nghẽn

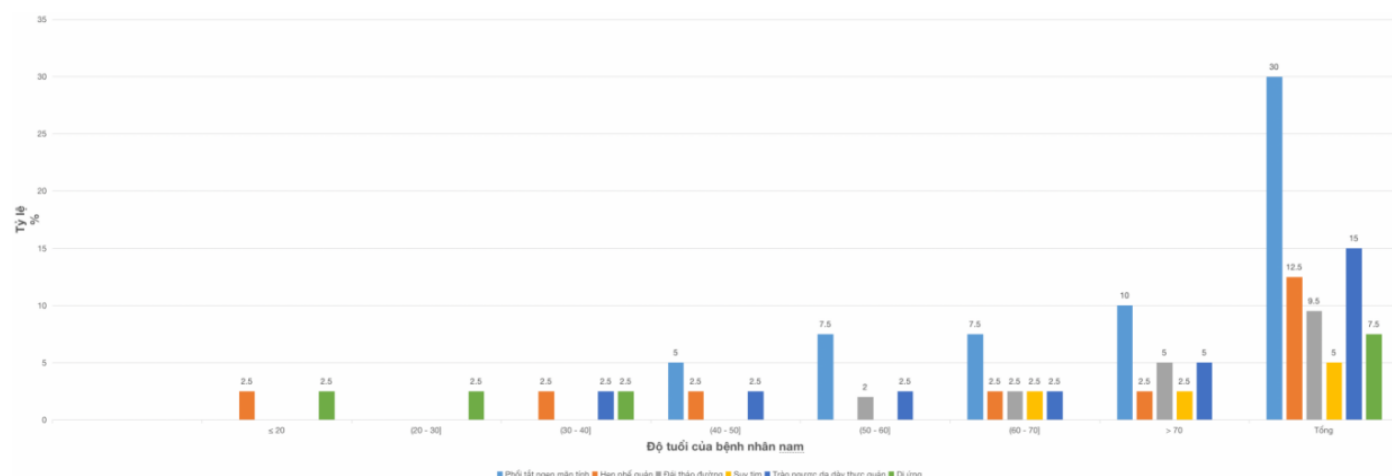


mãn tính, suy tim, trào ngược dạ dày, đái tháo đường trong độ tuổi (20-40). Đặc biệt tình trạng suy tim chỉ xuất hiện ở nữ >70 tuổi với tỷ lệ thấp (2,5%, $p < 0,05$). (Hình 1)



Hình 1. Tác động của tiền sử bệnh lý trên bệnh nhân nữ ung thư phổi không tế bào nhỏ

Đối với nam giới, tác nhân phổi tắc nghẽn mãn tính chiếm tỷ lệ cao nhất trong độ tuổi >70 chiếm 10% và (50-70) là 7,5%. Ngoài ra, độ tuổi >70, bệnh nhân còn có tiền sử đái tháo đường và trào ngược dạ dày (5%, $p < 0,05$) lớn hơn các độ tuổi khác. Không xuất hiện tiền sử phổi tắc nghẽn, đái tháo đường, suy tim ở độ tuổi <40 và tiền sử dị ứng >40 tuổi. (Hình 2). Từ các kết quả cho thấy rằng, tiền sử bệnh lý được khảo sát trong thử nghiệm xuất hiện ở các nhóm tuổi khác nhau ở nam giới và nữ giới dẫn đến sự tác động khác nhau đến tình trạng của bệnh nhân.



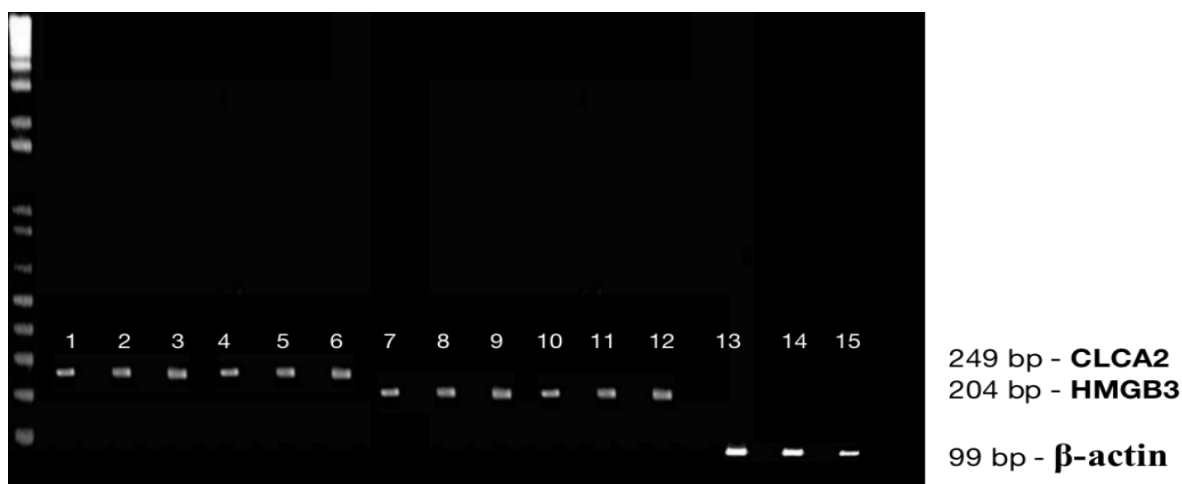
Hình 2. Tác động tiền sử bệnh lý trên bệnh nhân nam ung thư phổi không tế bào nhỏ

Qua các nghiên cứu dịch tễ học, Linda Willén và cộng sự đã nhận định rằng tỷ lệ phát sinh ung thư phổi không tế bào nhỏ do các rối loạn nội sinh chiếm ít hơn 10% và có trên 80% ung thư phát sinh liên quan đến yếu tố ngoại giới tính, tuổi tác, thuốc lá [10].

3.4. Nồng độ DNA tự do của người bình thường và bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ

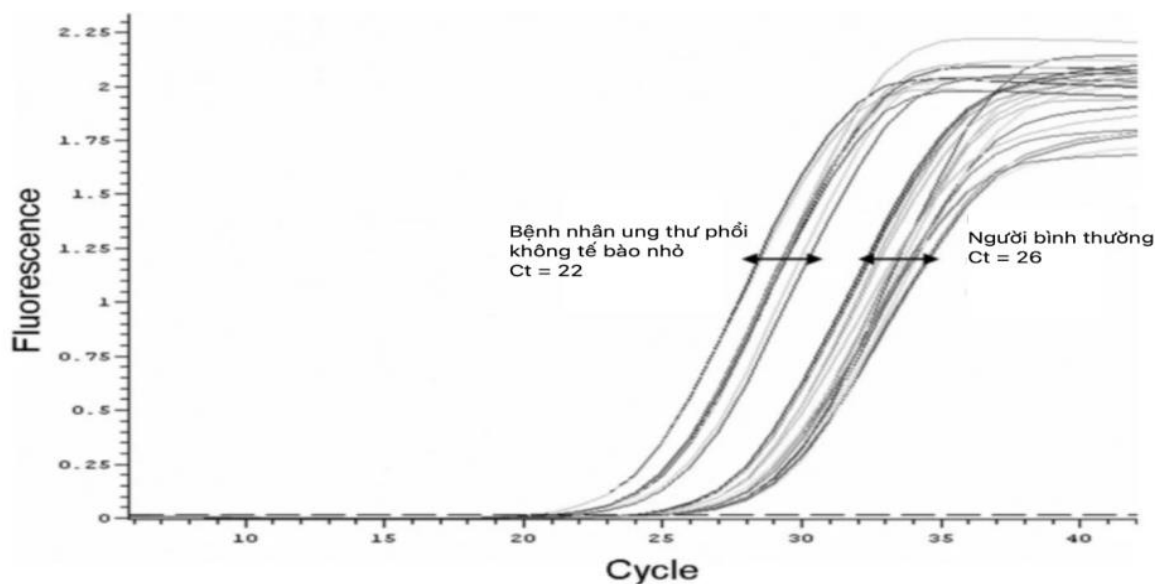
Gen CLCA2 và HMGB3 được xem là dấu ấn sinh học nhận diện ung thư phổi không tế bào nhỏ. Sự tăng biểu hiện của các gen ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển protein, sự phân chia tế bào và quá trình sao chép DNA trong tế bào. Gần đây, việc nghiên cứu về mức độ biến đổi di truyền kết hợp giữa xét nghiệm sinh học phân tử nhận diện kiểu gen trong ung thư phổi không tế bào nhỏ đang được ứng dụng phổ biến trong lâm sàng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát vai trò của CLCA2 và HMGB3 trong quá tiến triển bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ.

DNA tự do sau tách chiết được tiến hành PCR và nhận diện sơ bộ bằng phương pháp điện di trên gel agarose 4%. CLCA2 và HMGB3 đều xuất hiện trong DNA tự do của người bình thường và bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ với kích thước lần lượt là 249 bp và 204 bp (Hình 3), tỷ lệ gia tăng biểu hiện ở DNA tự do bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ cao hơn DNA tự do của người bình thường. Các xét nghiệm được thực hiện đồng thời với mẫu β -actin - đoạn gen có biểu hiện ổn định trong các xét nghiệm chẩn đoán biểu hiện gen của tế bào ung thư.



Hình 3. Kích thước gen CLCA2 và HMGB3 so với mẫu đối chứng

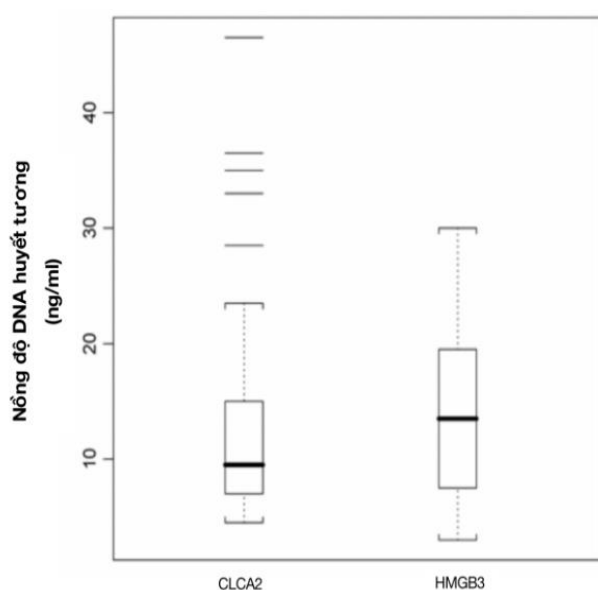
40 mẫu huyết tương được thu thập từ bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ được phân tích, so sánh với 40 mẫu huyết tương ở người bình thường - mẫu đối chứng. Nồng độ gen β -actin trung bình trong huyết tương bệnh nhân khi chưa điều trị nằm trong khoảng 18 ng/ml (2,6 đến 63,4) ng/ml ($P < 0,0001$, $n = 40$) và cao hơn so với người khỏe mạnh là 10,5 ng/ml (1,2 đến 14) ng/ml ($P < 0,0001$, $n = 40$). Khi sử dụng 18 ng/ml làm ngưỡng thì tần suất xuất hiện bệnh nhân có nồng độ β -actin trên ngưỡng là 45%, hiệu suất 100% (Hình 4).



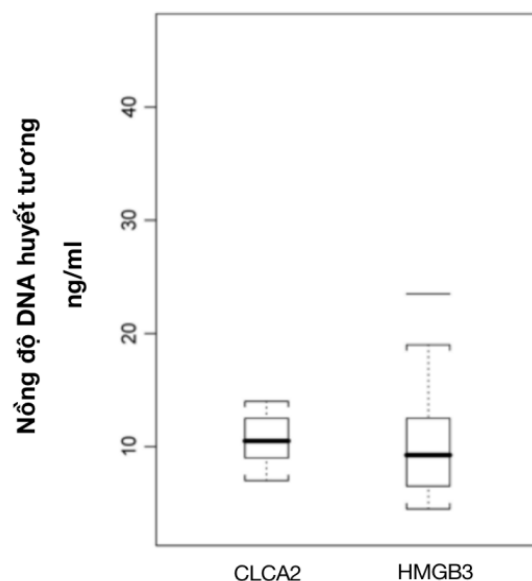
Hình 4. Kết quả khảo sát β -actin bằng xét nghiệm qPCR

Nồng độ gen CLCA2 trung bình trong huyết tương bệnh nhân khi chưa điều trị nằm trong khoảng 13,3 ng/ml ($P > 0,0001$, $n = 40$), gen HMGB3 có nồng độ trung bình là 14,9 ng/ml ($P > 0,0001$, $n = 40$) (Hình 5), cao hơn so với người bình thường 10,5 ng/ml ($P > 0,0001$, $n = 40$ /CLCA2) và 10,6 ng/ml ($P > 0,0001$, $n = 40$ /HMGB3) (Hình 6).

Đối với CLCA2, sử dụng 13,3 ng/ml làm ngưỡng thì tần suất xuất hiện bệnh nhân có nồng độ trên ngưỡng là 23,7%, hiệu suất 100%. Khi khảo sát trên HMGB3, sử dụng 14,9 ng/ml làm ngưỡng thì tần suất xuất hiện bệnh nhân có nồng độ trên ngưỡng là 48%, hiệu suất 100% (Hình 5).



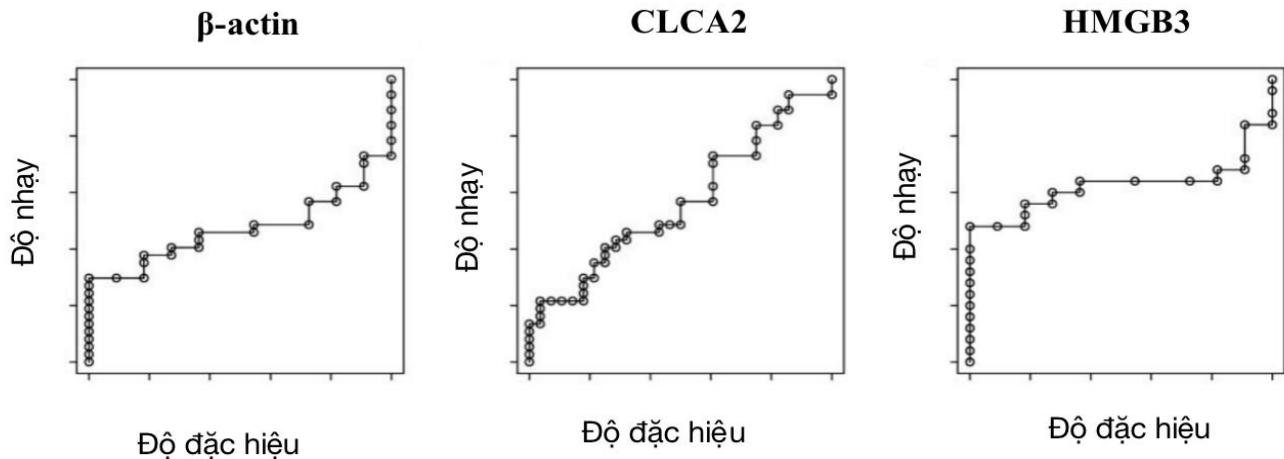
Hình 5. Nồng độ CLCA2, HMGB3 trong huyết tương bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (trái)



Hình 6. Nồng độ CLCA2 và HMGB3 trong huyết tương người bình thường (phải)

3.5. Khảo sát độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm realtime PCR

Đường cong ROC được xây dựng để đánh giá khả năng nhận diện và định lượng DNA dựa vào độ nhạy và độ đặc hiệu. Độ nhạy và độ đặc hiệu của các xét nghiệm định lượng DNA có giá trị 100%. Khi so sánh giữa người bình thường và bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ, kết quả xét nghiệm khảo sát trên gen β -actin có diện tích dưới đường cong ROC là 0,71 (CI 95%, $P < 0,0001$), CLCA 2 là 0,86 (CI 95%, $P < 0,0001$) và HMGB3 là 0,85 (CI 95%, $P < 0,0001$) (Hình 7).



Hình 7. Độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm realtime PCR trong định lượng CLCA2, HMGB3 và β -actin

Paci và cộng sự nhận thấy nồng độ DNA cao hơn khoảng bốn lần trong xét nghiệm gồm 151 bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ so với 79 đối chứng khỏe mạnh (12,8 ng/ml và 2,9 ng/ml). Diện tích dưới đường cong ROC là 0,79 (CI 95%, 0,71-0,83). Đối với giá trị ngưỡng 2 ng/ml, độ nhạy 86% và độ đặc hiệu 47%. Trong nghiên cứu của Ludovini và cộng sự nồng độ DNA của 76 bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (trung bình 60 ng/ml, SD 99,8) được tìm thấy cao hơn so với 66 mẫu đối chứng (trung bình 6,0 ng/ml, SD 8,8; $P < 0,0001$). Độ chính xác cao nhất của xét nghiệm realtime PCR đạt được tại ngưỡng 3,25 ng/ml, tương ứng với độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 80% và 61%. Ngoài ra, một nghiên cứu sâu hơn của Sozzi và cộng sự [15] đã áp dụng phương pháp realtime PCR định lượng gen hTERT trong tế bào ung thư và phân biệt bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ ($n = 100$) có hút thuốc và không hút thuốc với người khỏe mạnh ($n = 100$). Nồng độ trung bình của DNA ở bệnh nhân cao hơn nhóm chứng (75 ng/ml; 4,6 ng/ml). Độ nhạy đạt 90%, độ đặc hiệu (86%), giá trị tiên lượng dương tính (90%) và giá trị tiên lượng âm tính (90%) với nồng độ ngưỡng DNA là 9,0 ng/ml. Tuy nhiên, khi sử dụng giá trị ngưỡng 25 ng/ml thì độ nhạy giảm xuống còn 46%.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã bước đầu ứng dụng thành công kỹ thuật Real-time PCR trong định lượng và phân tích biểu hiện các gen CLCA2, HMGB3 và β -actin trong huyết tương ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Kết quả cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa trong biểu hiện các gen này giữa nhóm bệnh và nhóm chứng, đồng thời gợi mở mối liên hệ giữa tải lượng gen với một số đặc điểm lâm sàng. Những phát hiện này góp phần khẳng định tiềm năng của các chỉ dấu phân tử trong huyết



tương như một công cụ hỗ trợ chẩn đoán và theo dõi NSCLC. Trong tương lai, các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn và phân tích sâu hơn về giá trị tiên lượng của các gen đích sẽ giúp hoàn thiện quy trình ứng dụng xét nghiệm phân tử vào thực hành lâm sàng.

Địa chỉ tác giả liên hệ: Email: huongnv@ntt.edu.vn

Ngày nhận: 28/08/2025

Ngày chấp nhận: 28/09/2025

Phản biện: PGS. TS. BS. Tạ Bá Thắng, GS. TS. BS. Đỗ Quyết

Tài liệu tham khảo

1. Anish Thomas et al (2005), Trends and Characteristics of Young Non-Small Cell Lung Cancer Patients in the United States *Front Oncol.* 2015; 5: 113. Published online 2015 May 26. doi: 10.3389/fonc.2015.00113
2. Athina Efthymiou et al (2022). Isolation and freezing of human peripheral blood mononuclear cells from pregnant patients. *STAR Protoc.* 2022 Mar 18; 3(1): 101204
3. Arshad, Sjawal, et al (2022). "Cell Free DNA; Diagnostic and Prognostic Approaches to Oncology." *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, vol. 5, Oct. 2022, article no. 100052. Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.acb.2022.100052>.
4. Bray et al (2024). "Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 74, no. 3, 2024, <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
5. Bicky Thapa et al (2023). Continuing Education Activity. *StatPearls [Internet]*. March 31, 2023.
6. Bohers et al (2021). "cfDNA Sequencing: Technological Approaches and Bioinformatic Issues." *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 14, no. 6, 21 June 2021, article no. 596. MDPI, <https://doi.org/10.3390/ph14060596>.
7. Combating Lung Cancer Asia Pacific. "Vietnam Case Study." Roche Foundation for Patient Asia (FPA), 2025, <https://combatinglungcancerasiapacific.com/roche-fpa/vietnam-case-study/>.
8. El Osta et al (2019). "Characteristics and Outcomes of Patients with Metastatic KRAS Mutant Lung Adenocarcinomas: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience." *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 14, no. 5, 5 Feb. 2019, pp. 876-889. Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.01.020>.
9. El Zaitouni, S. et al (2024).. "Genetic Profiling of Non-Small Cell Lung Cancer in Moroccan Patients by Targeted Next-Generation Sequencing." *Technology in Cancer Research & Treatment*, vol. 23, 2024, p. 15330338241288907. SAGE Publications, <https://doi.org/10.1177/15330338241288907>.
10. International Early Lung Cancer Action Program Investigators, Henschke CI, Yip R, Miettinen OS. Women's Susceptibility to Tobacco Carcinogens and Survival After Diagnosis of Lung Cancer. *JAMA* 2006;296:180-4. 10.1001/jama.296.2.180



11. Jamalnia, Mohamad, and Ralf Weiskirchen (2025). "Advances in Personalized Medicine: Translating Genomic Insights into Targeted Therapies for Cancer Treatment." *Annals of Translational Medicine*, vol. 13, no. 2, 29 Apr. 2025, p. 18. AME Publishing, <https://doi.org/10.21037/atm-25-34>.
12. LaFramboise et al (2025). "Cell-Free DNA, Tumor Molecular Concordance, and Clinical Correlates of Patients with Cancer Treated in a Large Community Health Care Network." *The Journal of Molecular Diagnostics*, in press, corrected proof, 25 June 2025. Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2025.06.005>.
13. Li, Chao, et al (2023). "Global Burden and Trends of Lung Cancer Incidence and Mortality." *Chinese Medical Journal (English)*, vol. 136, no. 13, 28 Mar. 2023, pp. 1583-1590. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002529>.
14. Linda Willén et al (2022), Are older patients with non-small cell lung cancer receiving optimal care? A population-based study. *Acta Oncologica*, 61:3, 309-317, DOI: 10.1080/0284186X.2021.2000637.
15. Sozzi G et al (2003). Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003,21(21):3902-8. 10.1200/JCO.2003.02.006