

INITIAL STUDY TO DISTINGUISH LUNG CANCER AND BENIGN LUNG DISEASE USING SHOX2 GENE METHYL MARKER FROM LUNG BIOPSY AND LIQUID BIOPSY SAMPLE

Phuong Ngoc Anh^{1,2}, Dao Thuy Trang², Nguyen Van Ba³, Ho Huu Tho^{2*}

¹National Lung Hospital - No. 463 Hoang Hoa Tham Street, Ba Dinh District, Hanoi, Vietnam

²Military Medical and Pharmaceutical Research Institute, Vietnam Military Medical Academy - 160 Phung Hung, Phuc La Ward, Ha Dong, Hanoi, Vietnam

³Department of Military Science, Vietnam Military Medical Academy - 160 Phung Hung, Phuc La Ward, Ha Dong, Hanoi, Vietnam

Received: 26/02/2024

Revised: 18/03/2024; Accepted: 14/04/2024

ABSTRACT

This study explores the potential of SHOX2 DNA methylation as a biomarker to distinguish lung cancer from benign lung diseases. We conducted analyzes on both lung tissue samples and plasma samples from lung cancer patients and the control group. Using Realtime PCR technology with extendable lock probes and TaqMan probes, we aimed to increase the sensitivity and specificity of the method, which is important in handling samples with low tumor DNA concentrations. Results showed significant detection of SHOX2 methylation in lung cancer patients compared with controls, both in tissue and plasma samples, demonstrating the potential of this marker in early and non-invasive diagnosis of cancer. lung cancer. Statistical analysis confirmed significant differences between the two groups, reinforcing the role of SHOX2 as an effective biomarker. Although the results are promising, further research is needed to confirm the broad applicability of the method. Improving the chances of diagnosing and treating lung cancer, the study highlights the importance of developing new biomarkers and precise analysis technology.

Keywords: DNA methylation; SHOX2; Lung cancer; Liquid biopsy; Realtime PCR.

*Corresponding author

Email address: Huhuutho@vmmu.edu.vn

Phone number: (+84) 916932768

<https://doi.org/10.52163/yhc.v65iCD3.1133>

NGHIÊN CỨU BƯỚC ĐẦU PHÂN BIỆT UNG THƯ PHỔI VÀ BỆNH PHỔI LẠNH TÍNH SỬ DỤNG DẤU ẤN METHYL HÓA GEN SHOX2 TỪ MẪU SINH THIẾT PHỔI VÀ MẪU SINH THIẾT LÒNG

Phuong Ngọc Anh^{1,2}, Đào Thùy Trang², Nguyễn Văn Ba³, Hồ Hữu Thọ^{2*}

¹Bệnh viện Phổi Trung ương - Số 463 đường Hoàng Hoa Thám, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y - 160 Đ. Phùng Hưng, P. Phúc La, Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

³Phòng Khoa học Quân sự, Học viện Quân y - 160 Đ. Phùng Hưng, P. Phúc La, Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 26/02/2024

Chỉnh sửa ngày: 18/03/2024; Ngày duyệt đăng: 14/04/2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu này góp phần khám phá tiềm năng của methyl hóa DNA SHOX2 như một dấu ấn sinh học để phân biệt ung thư phổi từ các bệnh phổi lạnh tính. Chúng tôi đã tiến hành phân tích trên cả mẫu mô tổ chức phổi và mẫu huyết tương từ bệnh nhân ung thư phổi và nhóm chứng. Sử dụng công nghệ Realtime PCR với mẫu dò khóa có khả năng kéo dài và mẫu dò TaqMan, chúng tôi nhằm tăng độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp, quan trọng trong việc xử lý mẫu có nồng độ DNA khối u thấp. Kết quả cho thấy sự phát hiện đáng kể của methyl hóa SHOX2 trong bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm chứng, cả trong mẫu mô và mẫu huyết tương, chứng minh tiềm năng của dấu ấn này trong chẩn đoán sớm và không xâm lấn ung thư phổi. Phân tích thống kê xác nhận sự khác biệt có ý nghĩa giữa hai nhóm, củng cố vai trò của SHOX2 như một dấu ấn sinh học hiệu quả. Dù kết quả hứa hẹn, nghiên cứu sâu hơn cần thiết để xác nhận tính ứng dụng rộng rãi của phương pháp. Cải thiện cơ hội chẩn đoán và điều trị ung thư phổi, nghiên cứu nhân mạnh tâm quan trọng của việc phát triển dấu ấn sinh học mới và công nghệ phân tích chính xác.

Từ khóa: Methyl hóa DNA; SHOX2; Ung thư phổi; Sinh thiết lỏng; Realtime PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi (UTP) là loại ung thư phổ biến và gây tử vong hay gặp nhất trên thế giới, với tỷ lệ mắc mới và tỷ lệ tử vong do ung thư lần lượt là 11,4% và 18% theo GLOBOCAN 2020 [1].

Dù có sự tiến bộ trong điều trị, tiên lượng sống còn của bệnh nhân ung thư phổi vẫn còn nhiều thách thức, đặc biệt là khi bệnh được phát hiện ở giai đoạn muộn [2]. Tiên lượng sống còn toàn bộ có sự khác biệt rõ rệt giữa các giai đoạn của UTP không tế bào nhỏ, với sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ sống trên 5 năm giữa các giai đoạn [3]. Cụ thể, tỷ lệ sống trên 5 năm cho giai đoạn IA1 đạt 92%, IA2 là 83%, IA3 là 77%, trong khi giai đoạn IB giảm xuống còn 68%. Tỷ lệ này tiếp tục giảm ở giai đoạn II, với IIA là 60% và IIB là 53%. Đối với nhóm IIIA - nhóm có ranh giới quan trọng giữa khả năng phẫu thuật và không, tỷ lệ sống chỉ còn 36%. Tỷ lệ sống giảm mạnh trong nhóm không thể phẫu thuật (IIIB, IIIC, IVA, IVB), lần lượt là 26%, 13%, 10% và

0%, nhấn mạnh tầm quan trọng của việc sàng lọc chẩn đoán sớm ung thư phổi để cải thiện tiên lượng bệnh.

Sàng lọc chẩn đoán sớm ung thư phổi bằng chụp cắt lớp vi tính liều thấp (CLVT) đã cho thấy giảm tỷ lệ tử vong nhưng vẫn còn hạn chế với tỷ lệ cao dương tính giả [4], làm nổi bật nhu cầu cấp thiết về việc tìm kiếm và phát triển các phương pháp sàng lọc mới với độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn.

Methyl hóa DNA, cơ chế quan trọng trong quá trình hình thành và phát triển ung thư, bao gồm ung thư phổi, khi methyl hóa quá mức có thể bất hoạt các gen ức chế khối u [5],[6],[7],[8]. Đặc biệt, sự methyl hóa gen Short Stature Homebox 2 (SHOX2) đã được chứng minh có mối liên hệ mật thiết với ung thư phổi [9],[10],[11]. Phát hiện này mở ra hướng nghiên cứu mới về việc sử dụng dấu ấn methyl hóa DNA như một công cụ chẩn đoán tiềm năng.

Phát triển phương pháp mới trong phân tích DNA bị

*Tác giả liên hệ

Email: Hohuutho@vmmu.edu.vn

Điện thoại: (+84) 916932768

<https://doi.org/10.52163/yhc.v65iCD3.1133>

methyl hóa, với công nghệ mới giúp tăng độ nhạy gấp hàng chục lần trong phát hiện các biến thể DNA, là bước đột phá quan trọng trong nỗ lực phát hiện sớm ung thư [12]. Công nghệ này không chỉ hứa hẹn cải thiện khả năng chẩn đoán mà còn hỗ trợ việc lựa chọn phương pháp điều trị phù hợp và kịp thời cho bệnh nhân.

Trong bối cảnh này, mục tiêu của chúng tôi là tiến hành một nghiên cứu bước đầu nhằm khảo sát khả năng phát hiện dấu ấn methyl hóa DNA của gen SHOX2 của quy trình xét nghiệm mới trong các mẫu mô tổ chức phổi và, đặc biệt, trong các mẫu huyết tương. Nghiên cứu tập trung vào việc đánh giá và phân biệt giữa bệnh nhân ung thư phổi và những trường hợp mắc các bệnh phổi lành tính khác. Mục tiêu này không chỉ thúc đẩy việc phát triển quy trình xét nghiệm hỗ trợ phát hiện sớm ung thư phổi mà còn nhấn mạnh vào việc sàng lọc chẩn đoán sớm qua mẫu huyết tương, giúp tăng cơ hội điều trị thành công và cải thiện tiên lượng cho bệnh nhân.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu là một nghiên cứu tiến cứu. Bao gồm 2 nhóm bệnh nhân: Nhóm bệnh nhân mắc ung thư phổi và nhóm chứng bao gồm bệnh nhân mắc các bệnh lý phổi lành tính được thu nhận tại Bệnh viện Phổi Trung ương từ tháng 4.2021 đến tháng 11.2023.

Đối với nhóm bệnh ung thư phổi, chúng tôi tập trung vào 9 bệnh nhân có mẫu mô tổ chức phổi và 16 bệnh nhân có mẫu huyết tương, tất cả đều đã được xác định chẩn đoán dựa trên tiêu chuẩn mô bệnh học. Các bệnh nhân trong nhóm này đều từ 18 tuổi trở lên, sở hữu thông tin hành chính đầy đủ và đã chấp nhận tham gia vào nghiên cứu.

Đối với nhóm chứng, bao gồm 3 bệnh nhân với mẫu mô tổ chức phổi và 10 bệnh nhân với mẫu huyết tương, đây là những người có tổn thương dạng u phổi nhưng được loại trừ khả năng mắc ung thư phổi. Điều kiện tham gia tương tự như nhóm bệnh nhân ung thư phổi: Độ tuổi từ 18 trở lên, có thông tin cá nhân đầy đủ và đồng ý tham gia nghiên cứu.

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm khảo sát và xác định giá trị của việc phát hiện dấu ấn methyl hóa DNA SHOX2 trong chẩn đoán ung thư phổi thông qua cả mẫu sinh thiết phổi và huyết tương, đồng thời khám phá khả năng của dấu ấn này trong việc phân biệt ung thư phổi với các bệnh phổi lành tính.

2.2. Lấy mẫu và xử lý bệnh phẩm

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu thập và xử lý bệnh phẩm từ hai nhóm bệnh nhân, bao gồm mẫu mô tổ chức phổi và mẫu máu tĩnh mạch ngoại vi. Cụ thể, mẫu mô từ

9 bệnh nhân ung thư phổi và 3 bệnh nhân mắc bệnh phổi lành tính được thu thập dưới dạng mẫu mô tươi trong dung dịch bảo quản trước khi vận chuyển đến phòng nghiên cứu trong vòng 6 giờ. Sau đó, chúng được bảo quản ở nhiệt độ -80°C trong ngân hàng mẫu. Đối với mẫu máu, chúng tôi lấy 8-10 ml máu tĩnh mạch ngoại vi từ 16 bệnh nhân ung thư và 10 bệnh nhân bệnh phổi lành tính, sử dụng ống chứa chất chống đông K2 EDTA và bảo quản mẫu máu dưới điều kiện tối ưu ($<6\text{h}$) trước khi tách huyết tương và bảo quản ở -80°C .

DNA từ huyết tương được tách chiết sử dụng QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit của Qiagen, với thể tích huyết tương và DNA tách chiết lần lượt là 2 mL và 50 μL . Chất lượng và nồng độ DNA được đánh giá bằng phương pháp đo phổ Nanodrop và kỹ thuật điện di. Mẫu mô được xử lý tương tự, với 15 lát cắt mỗi lát dày 5 μm , DNA được tách chiết sử dụng QIAamp Tissue Kit của Qiagen.

Sau đó, DNA tách chiết được xử lý qua phản ứng bisulfite và methyl hóa in vitro, sử dụng EZ DNA Methylation-Gold™ Kit.

Quy trình kỹ thuật này nhằm mục đích xác định sự hiện diện và mức độ methyl hóa của gen SHOX2 trong mẫu mô và huyết tương của bệnh nhân, từ đó đánh giá khả năng phân biệt ung thư phổi và bệnh phổi lành tính thông qua dấu ấn methyl hóa DNA này.

2.3. Thiết kế mẫu dò khóa và mẫu dò TaqMan

Trong quy trình này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật Real-time PCR nhằm mục đích khuếch đại/phát hiện chọn lọc DNA bị methyl hóa ở gen SHOX2, qua đó tăng cường độ chính xác và độ đặc hiệu của phân tích. Để đạt được điều này, mỗi đặc hiệu cho DNA đã qua xử lý bisulfite và methyl hóa được thiết kế nhằm khuếch đại một cách chọn lọc trình tự DNA bị methyl hóa. Đồng thời, mẫu dò khóa có khả năng kéo dài, được thiết kế dựa trên nguyên tắc khóa chọn lọc các trình tự DNA không bị methyl hóa, giúp loại trừ hiệu quả DNA không mong muốn khỏi phản ứng khuếch đại.

Bằng cách sử dụng mẫu dò khóa có khả năng kéo dài, chúng tôi nâng cao khả năng phân biệt và chọn lọc của phản ứng, tối ưu hóa việc phát hiện DNA methyl hóa mà không bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của DNA không bị methyl hóa. Mẫu dò này, với trình tự ngắn từ 15 đến 20 bp và không chứa gốc phosphate ở nucleotide cuối cùng của đầu 3' như các phương pháp thiết kế mẫu dò khóa được sử dụng trước đây, cho phép DNA polymerase kéo dài mẫu dò khóa khi bắt cặp với DNA không bị methyl hóa, giảm thiểu nguy cơ tách sợi do nhiệt động học như các mẫu dò khóa thông thường.

Ngoài ra, mẫu dò TaqMan với trình tự bổ sung đặc hiệu với vùng DNA bị methyl hóa được thiết kế để cải thiện thêm độ đặc hiệu của phản ứng Realtime PCR trong việc khuếch đại DNA bị methyl hóa gen SHOX2. Sự

► CHUYÊN ĐỀ BỆNH KHÔNG NHIỄM TRÙNG ◀

kết hợp giữa mẫu dò khóa có khả năng kéo dài và mẫu dò TaqMan tối ưu hóa quy trình phân tích, mang lại kết quả chính xác cao trong việc phát hiện và định lượng dấu ấn methyl hóa DNA, mở đường cho việc áp dụng trong chẩn đoán và nghiên cứu ung thư phổi.

2.4. Quy trình realtime PCR

Quy trình thực nghiệm thực hiện phản ứng Realtime PCR: Phản ứng PCR được tiến hành trên hệ thống máy Rotor-Gene Q với thể tích phản ứng là 20 μ L và 5 μ L DNA sau khi xử lý bisulfite được sử dụng làm khuôn. Dữ liệu realtime PCR được thu thập bởi hệ thống Rotor-Gene Q và lưu trong máy tính sau đó sẽ được phân tích bằng phần mềm Rotor-Gene Q Software (hãng Qia-gen).

Mỗi mẫu được chạy 02 lần lặp lại: Mỗi lần chạy luôn kèm theo các chứng âm không chứa khuôn DNA và chứng dương DNA bị methyl hóa, DNA không bị methyl hóa gen SHOX2.

Tiến hành đồng thời phản ứng realtime PCR định lượng DNA tổng số gen SHOX2 đối với tất cả các mẫu DNA cần phân tích để làm chứng cho hiệu quả quá trình tách chiết, bisulfite và khả năng phát hiện DNA methyl hóa gen SHOX2.

2.5. Phân tích và xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện phân tích

thống kê để bước đầu đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của dấu ấn methyl hóa DNA gen SHOX2 trong việc phân biệt ung thư phổi và bệnh phổi lành tính. Số liệu thu được từ mẫu mô tổ chức phổi và mẫu huyết tương của 9 bệnh nhân ung thư phổi và 3 bệnh nhân bệnh phổi lành tính (mẫu mô), cùng với 16 bệnh nhân ung thư và 10 bệnh nhân lành tính (mẫu huyết tương), được so sánh để xác định tỷ lệ phát hiện dấu ấn methyl hóa DNA của gen SHOX2. Phương pháp thống kê bao gồm kiểm định Chi square và/hoặc Fisher's exact test cho dữ liệu phân loại, nhằm cung cấp một cái nhìn sơ bộ về tiềm năng của dấu ấn trong chẩn đoán sớm ung thư phổi.

3. KẾT QUẢ

3.1. Phân tích methyl hóa gen SHOX2 trong mô sinh thiết tổ chức phổi

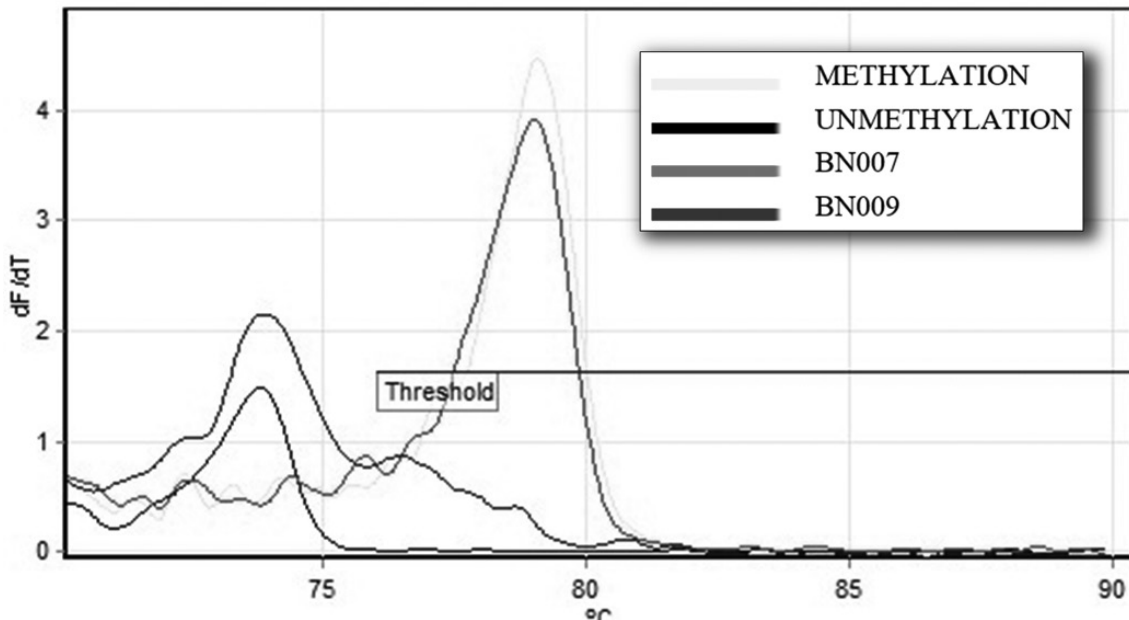
Nghiên cứu chúng tôi tập trung vào việc xác định sự có mặt của methyl hóa gen SHOX2 trong các mẫu sinh thiết tổ chức phổi từ tổng số 12 bệnh nhân, bao gồm 9 bệnh nhân mắc ung thư phổi và 3 bệnh nhân bệnh phổi lành tính. Kết quả cho thấy dấu ấn methyl hóa DNA của gen SHOX2 được phát hiện ở tất cả mẫu sinh thiết từ bệnh nhân ung thư phổi, trong khi đó, không phát hiện thấy dấu ấn methyl hóa này trong mẫu từ những người mắc bệnh phổi lành tính. (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả phân tích methyl hóa gen SHOX2 trong mẫu mô sinh thiết tổ chức phổi

STT	Mã bệnh nhân nghiên cứu	Nhóm bệnh nhân	Kết quả phát hiện dấu ấn methyl hóa DNA của gen SHOX2
1	BN001	Ung thư phổi	Dương tính
2	BN002	Ung thư phổi	Dương tính
3	BN003	Ung thư phổi	Dương tính
4	BN004	Bệnh phổi lành tính	Âm tính
5	BN005	Ung thư phổi	Dương tính
6	BN006	Ung thư phổi	Dương tính
7	BN007	Ung thư phổi	Dương tính
8	BN008	Ung thư phổi	Dương tính
9	BN009	Bệnh phổi lành tính	Âm tính
10	BN010	Bệnh phổi lành tính	Âm tính
11	BN011	Ung thư phổi	Dương tính
12	BN012	Ung thư phổi	Dương tính

Để đánh giá sự khác biệt giữa hai nhóm một cách thống kê, chúng tôi đã sử dụng kiểm định Fisher's Exact Test. Kết quả cho thấy giá trị p-value là khoảng 0.0045, điều này chứng tỏ có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ phát hiện methyl hóa DNA của gen SHOX2 trong mẫu mô sinh

thiết giữa nhóm bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm bệnh phổi lành tính. Kết quả này bước đầu hỗ trợ cho giả thuyết rằng methyl hóa DNA của gen SHOX2 có thể là một dấu ấn sinh học quan trọng trong việc phân biệt ung thư phổi với các bệnh phổi không phải ung thư.



Biểu đồ này minh họa sự khác biệt về nhiệt độ nóng chảy giữa mẫu ung thư phổi dương tính với methyl hóa SHOX2 (đỏ), mẫu bệnh phổi lành tính âm tính với SHOX2 (xanh), chứng dương DNA bị methyl hóa (vàng), và chứng âm DNA không bị methyl hóa (đen). Đỉnh của chứng dương và mẫu ung thư cao hơn so với mẫu lành tính và chứng âm, chỉ ra sự phát hiện chính xác của methyl hóa SHOX2.

Hình 1. Biểu đồ DNA melting phân tích methyl hóa gen SHOX2.

Biểu đồ DNA melting phân tích methyl hóa gen SHOX2 trong Hình 1 thể hiện sự khác biệt rõ ràng giữa mẫu ung thư phổi dương tính với methyl hóa SHOX2 và mẫu bệnh phổi lành tính âm tính với methyl hóa SHOX2. Cụ thể, đỉnh nhiệt độ (nhiệt độ nóng chảy) của mẫu ung thư phổi dương tính với methyl hóa SHOX2 thể hiện ở mức nhiệt độ cao hơn so với mẫu lành tính âm tính với methyl hóa SHOX2. Sự khác biệt này phản ánh tính đặc hiệu của dấu ấn methyl hóa gen SHOX2 trong việc phân biệt ung thư phổi từ các tình trạng phổi khác, đồng thời nêu bật tiềm năng của phương pháp phân tích biểu đồ DNA melting như một công cụ chẩn đoán có giá trị.

Mẫu ung thư phổi, thể hiện sự methyl hóa gen SHOX2, cho thấy đỉnh nhiệt độ nóng chảy cao hơn, điều này chứng tỏ sự hiện diện của DNA bị methyl hóa. Trái lại, mẫu bệnh phổi lành tính, không thể hiện sự methyl hóa của gen SHOX2, có đỉnh nhiệt độ nóng chảy thấp hơn, phản ánh sự vắng mặt của dấu ấn methyl hóa DNA đặc trưng.

Thông qua việc so sánh nhiệt độ nóng chảy giữa các mẫu, biểu đồ DNA melting cung cấp một phương tiện trực quan và chính xác để phát hiện sự methyl hóa gen SHOX2, đóng góp vào nỗ lực chẩn đoán và phân biệt ung thư phổi với các bệnh phổi lành tính.

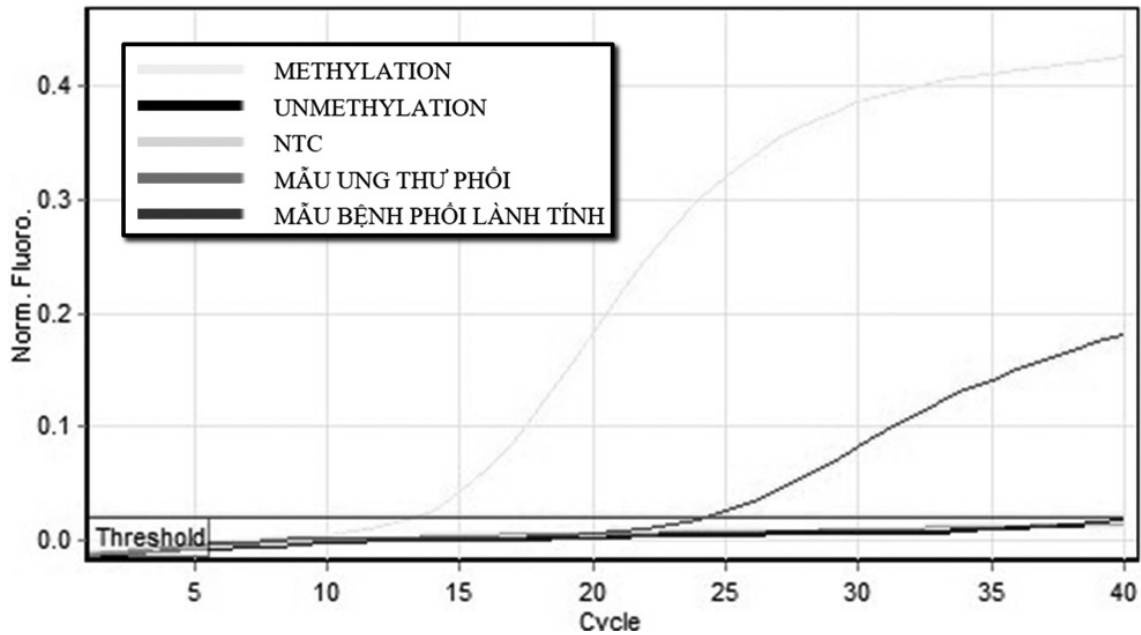
Kết quả trên đây tuy số lượng còn hạn chế nhưng cho thấy tính đặc hiệu của methyl hóa gen SHOX2 trong việc phân biệt ung thư phổi so với các tình trạng phổi lành tính, qua đó tiếp tục hướng nghiên cứu mới về việc

sử dụng dấu ấn này trong phân tích mẫu huyết tương.

3.2. Đánh giá methyl hóa gen SHOX2 trong mẫu huyết tương

Từ những kết quả hứa hẹn thu được từ việc phân tích phát hiện dấu ấn methyl hóa gen SHOX2 ở các mẫu sinh thiết tổ chức phổi, chúng tôi đã mở rộng phạm vi nghiên cứu để bao gồm phân tích các mẫu huyết tương. Điều này được thực hiện trên một nhóm bệnh nhân độc lập, bao gồm cả bệnh nhân ung thư phổi và bệnh nhân mắc bệnh phổi lành tính, với mục đích kiểm tra sự tồn tại của dấu ấn methyl hóa gen SHOX2 trong hệ thống tuần hoàn. Phương pháp này không chỉ cung cấp một cái nhìn sâu sắc vào khả năng phát hiện sớm ung thư phổi mà còn hỗ trợ việc chẩn đoán không xâm lấn, qua đó tăng cơ hội điều trị thành công cho bệnh nhân.

Nhận thức được rằng nồng độ DNA đặc hiệu khối u trong máu ngoại vi thường rất thấp, đòi hỏi phải áp dụng kỹ thuật phân tích có độ nhạy và độ đặc hiệu cao để phát hiện chính xác [13]. Vì lý do này, chúng tôi đã bổ sung mẫu dò TaqMan vào phản ứng PCR nhằm nhận diện trình tự DNA bị methyl hóa gen SHOX2 một cách đặc hiệu. Sử dụng mẫu dò TaqMan cho phép chúng tôi tối ưu hóa phương pháp phân tích, nhấn mạnh sự cần thiết của việc áp dụng công nghệ chính xác khi làm việc với mẫu huyết tương có nồng độ thấp của DNA cần phát hiện (Hình 2).



Biểu đồ so sánh kết quả khuếch đại Real-time PCR trong mẫu huyết tương, sử dụng mẫu dò TaqMan đặc hiệu cho methyl hóa gen SHOX2. Mẫu từ bệnh nhân ung thư phổi (màu đỏ) thể hiện tín hiệu mạnh, trong khi mẫu từ bệnh phổi lành tính (màu xanh) cho thấy tín hiệu dưới ngưỡng (threshold). Chứng dương (màu vàng) và chứng âm (màu đen) minh họa tiêu chuẩn so sánh, chứng tỏ độ chính xác cao của phương pháp trong việc phát hiện và phân biệt ung thư phổi.

Hình 2. Biểu đồ khuếch đại Realtime PCR sử dụng mẫu dò TaqMan đặc hiệu cho methyl hóa gen SHOX2 trong phân tích mẫu huyết tương.

Kết quả phân tích mẫu huyết tương cho thấy tỷ lệ đáng kể sự methyl hóa gen SHOX2 trong bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm bệnh nhân mắc bệnh phổi lành tính (Bảng 2). Điều này củng cố thêm về tiềm năng của dấu

án sinh học này trong việc phân biệt ung thư phổi từ các tình trạng phổi khác.

Bảng 2. Kết quả phân tích methyl hóa DNA của gen SHOX2 trong mẫu huyết tương

Nhóm bệnh nhân	Kết quả phân tích methyl hóa DNA của gen SHOX2	
	Dương tính	Âm tính
Ung thư phổi (n = 16)	12	4
Bệnh phổi lành tính (n = 10)	2	8

Phân tích thống kê của kết quả phân tích methyl hóa DNA của gen SHOX2 trong mẫu huyết tương từ bệnh nhân ung thư phổi và bệnh nhân mắc bệnh phổi lành tính cho thấy sự khác biệt đáng kể. Cụ thể, 12 trên 16 mẫu từ bệnh nhân ung thư phổi thể hiện sự methyl hóa của gen SHOX2, trong khi chỉ có 2 trên 10 mẫu từ nhóm bệnh phổi lành tính cho kết quả dương tính với methyl hóa DNA của gen này. Kiểm định Chi-square cho kết quả là 5.44 với giá trị p là 0.0197, chứng tỏ sự khác biệt giữa hai nhóm là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Sự khác biệt này không chỉ nêu bật tiềm năng của dấu ấn methyl hóa gen SHOX2 trong việc phân biệt ung thư phổi từ các bệnh phổi lành tính mà còn cho thấy sự cần thiết của việc áp dụng các kỹ thuật phân tích có độ nhạy cao

như mẫu dò TaqMan trong nghiên cứu sinh học phân tử.

Phân tích mẫu huyết tương đã cho thấy tỷ lệ đáng chú ý của methyl hóa gen SHOX2 trong bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm bệnh nhân mắc bệnh phổi lành tính, đánh dấu một bước tiến quan trọng trong việc sử dụng dấu ấn sinh học này như một công cụ phân biệt hiệu quả. Sự thành công này phần lớn nhờ vào việc kết hợp mẫu dò khóa có khả năng kéo dài với mẫu dò TaqMan đặc hiệu của quy trình Realtime PCR, nâng cao độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp phân tích trong điều kiện nồng độ DNA khối u rất thấp trong máu ngoại vi.

Hình 2 cho thấy rõ sự phân biệt giữa nhóm ung thư phổi

và bệnh phổi lành tính dựa trên tín hiệu khuếch đại, với mẫu từ bệnh nhân ung thư phổi thể hiện tín hiệu mạnh mẽ, trong khi mẫu từ bệnh phổi lành tính cho thấy tín hiệu yếu hoặc không có tín hiệu. Điều này không chỉ chứng tỏ hiệu quả của việc áp dụng công nghệ mới trong nghiên cứu sinh học phân tử mà còn mở ra cơ hội cho việc chẩn đoán sớm và không xâm lấn ung thư phổi, cải thiện cơ hội điều trị và quản lý bệnh nhân.

4. BÀN LUẬN

Khi so sánh kết quả phân tích methyl hóa gen SHOX2 trong mẫu mô sinh thiết tổ chức phổi: Nghiên cứu của tác giả Võ Thị Thương Lan [14] cho thấy kết quả phân biệt giữa nhóm ung thư và không ung thư: Độ nhạy là 60% (95%CI: 50.7-68,8%); độ đặc hiệu là 90,4% (95%CI: 82.6 – 95,5%), trong khi đó trong nhóm bệnh nhân của chúng tôi thì độ nhạy và độ đặc hiệu là 100%. Điều này cho thấy tiềm năng của phương pháp của chúng tôi, nhưng cũng cần phải cần được tiên hành trên quy mô số mẫu lớn hơn để nâng cao hơn giá trị của xét nghiệm.

Khi so sánh kết quả phân tích methyl hóa gen SHOX2 trong mẫu huyết tương kết quả của chúng tôi cho thấy độ nhạy là 75% và độ đặc hiệu là 80%, kết quả này tương tự với kết quả của của nhóm tác giả Võ Thị Thương Lan [14] với độ nhạy là 83% (95% CI: 65-94%), độ đặc hiệu là 93% (95% CI: 76-99%).

Tuy nhiên, cần lưu ý rằng, mặc dù kết quả cho thấy tiềm năng lớn, việc áp dụng rộng rãi của phương pháp này trong lâm sàng đòi hỏi nhiều nghiên cứu bổ sung để xác định độ nhạy và độ đặc hiệu trong một quy mô lớn hơn và đa dạng hơn về mặt bệnh lý phổi. Bên cạnh đó, sự phức tạp của quy trình kỹ thuật cũng cần được đơn giản hóa để phù hợp với các phòng thí nghiệm lâm sàng thông thường, đồng thời giảm thiểu chi phí phân tích để tối ưu hóa khả năng tiếp cận cho mọi bệnh nhân.

Những kết quả khả quan này khuyến khích việc tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về dấu ấn methyl hóa SHOX2 và khả năng áp dụng của nó trong chẩn đoán sớm, theo dõi điều trị và phát hiện tái phát của ung thư phổi. Cuối cùng, những phát hiện này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc tiếp tục khám phá và phát triển các dấu ấn sinh học mới, cũng như công nghệ phân tích chính xác để tăng cường hiệu quả chẩn đoán và quản lý bệnh nhân mắc bệnh ung thư.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã cung cấp thêm bằng chứng sơ bộ về khả năng sử dụng methyl hóa DNA của gen SHOX2 như một dấu ấn sinh học hữu ích trong việc phân biệt ung thư phổi từ các bệnh phổi lành tính. Bằng

việc áp dụng công nghệ Realtime PCR sử dụng mẫu dò khóa có thể kéo dài kết hợp với mẫu dò TaqMan, chúng tôi đã tăng cường độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp với bệnh phẩm là mẫu mô tổ chức; với bệnh phẩm mẫu huyết tương khi so sánh với NC tương tự thì do số lượng còn ít nên kết quả còn hạn chế, hy vọng khi có kết quả với số lượng đủ lớn sẽ có độ nhạy và độ đặc hiệu tương xứng hơn. Kết quả phân tích từ cả mẫu mô tổ chức phổi và mẫu huyết tương phần nào đó cho thấy sự phát hiện đáng kể của dấu ấn methyl hóa SHOX2 trong bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm chứng, làm nổi bật tiềm năng của dấu ấn này trong chẩn đoán sớm và không xâm lấn của ung thư phổi. Dù kết quả là hứa hẹn, nhưng nghiên cứu sâu hơn, với số n đủ lớn cần thiết để xác nhận tính ứng dụng rộng rãi của phương pháp này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al., Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 2021, 209–249.
- [2] Wang S., Dong L., Wang X. et al., Classification of Pathological Types of Lung Cancer from CT Images by Deep Residual Neural Networks with Transfer Learning Strategy. *Open Med*, 15, 2020, 190–197.
- [3] Kalinke L., Thakrar R., Janes S.M., The promises and challenges of early non-small cell lung cancer detection: Patient perceptions, low-dose CT screening, bronchoscopy and biomarkers. *Mol Oncol*, 15(10), 2021, 2544–2564.
- [4] Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N Engl J Med*, 365(5), 2011, 395–409.
- [5] Kalari S., Jung M., Kernstine K.H. et al., The DNA methylation landscape of small cell lung cancer suggests a differentiation defect of neuroendocrine cells. *Oncogene*, 32(30), 2013, 3559–3568.
- [6] Rauch T., Wang Z., Zhang X. et al., Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(13), 2007, 5527–5532.
- [7] Rauch T.A., Zhong X., Wu X. et al., High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(1), 2008, 252–257.
- [8] Rauch T.A., Wang Z., Wu X. et al., DNA methylation biomarkers for lung cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*, 33(2), 2012, 287–296.
- [9] Kneip C., Schmidt B., Seegebarth A. et al., SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. *J Thorac*

- Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer, 6(10), 2011, 1632–1638.
- [10] Ilse P., Biesterfeld S., Pomjanski N. et al., Analysis of SHOX2 methylation as an aid to cytology in lung cancer diagnosis. *Cancer Genomics Proteomics*, 11(5), 2014, 251–258.
- [11] Schmidt B., Liebenberg V., Dietrich D. et al., SHOX2 DNA methylation is a biomarker
- [12] Ho T.H., Dang K.X., Lintula S. và cộng sự. (2015). Extendable blocking probe in reverse transcription for analysis of RNA variants with superior selectivity. *Nucleic Acids Res*, 43(1), 2010, e4.
- [13] Song P, Wu LR, Yan YH et al., Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics. *Nat Biomed Eng*. 2022 Mar;6(3):232-245. doi: 10.1038/s41551-021-00837-3. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35102279; PMCID: PMC9336539.
- [14] Vo T.T.L., Nguyen T.N., Nguyen T.T. et al., SHOX2 methylation in Vietnamese patients with lung cancer. *Mol Biol Rep*, 49(5), 2022, 3413–3421.

