

GIÁ TRỊ CHẨN ĐOÁN UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ CỦA DẤU ẤN METHYL HÓA SHOX2 TRONG MÁU NGOẠI VI

*Phương Ngọc Anh¹, Đinh Văn Lượng¹
Nguyễn Đức Hạnh¹, Nguyễn Văn Ba², Hồ Hữu Thọ^{3,4*}*

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá mức độ methyl hóa SHOX2 (mSHOX2) trong máu ngoại vi và giá trị chẩn đoán ung thư phổi không tế bào nhỏ (non-small cell lung cancer - NSCLC). **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu bệnh chứng trên mẫu máu của 149 bệnh nhân (BN) NSCLC và 100 người khỏe mạnh được phân tích bằng quy trình PCR bán lồng, định lượng, đặc hiệu methyl hóa (sqMSP). Giá trị chẩn đoán được đánh giá bằng đường cong ROC và hồi quy logistic đa biến. **Kết quả:** Giá trị ΔCt của mSHOX2 thấp hơn đáng kể ở nhóm NSCLC so với nhóm khỏe mạnh ($p < 0,001$), phản ánh mức methyl hóa cao hơn. Phân tích ROC cho thấy AUC = 0,715, độ nhạy 56,38%, độ đặc hiệu 82,00%. Hồi quy logistic đa biến khẳng định mSHOX2, tuổi và BMI là các yếu tố độc lập liên quan đến nguy cơ NSCLC, trong khi giới tính và tiền sử hút thuốc không còn ý nghĩa sau khi điều chỉnh. **Kết luận:** mSHOX2 là dấu ấn sinh học tiềm năng trong phát hiện NSCLC không xâm lấn. Tuy nhiên, cần nghiên cứu thêm để cải thiện độ chính xác khi kết hợp với các dấu ấn khác.

Từ khóa: Methyl hóa SHOX2; Ung thư phổi; Dấu ấn sinh học; Sinh thiết lồng; PCR đặc hiệu methyl hóa.

DIAGNOSTIC VALUE OF SHOX2 METHYLATION IN PLASMA FOR NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Abstract

Objectives: To evaluate the methylation status of SHOX2 (mSHOX2) in peripheral blood and its diagnostic value for non-small cell lung cancer (NSCLC).

¹Bệnh viện Phổi Trung ương

²Bệnh viện Quân y 175

³Phòng Công nghệ Gene & Di truyền, Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

⁴Bộ môn Vi sinh vật, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

*Tác giả liên hệ: Hồ Hữu Thọ (hohuutho@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 28/02/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 25/4/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i5.1239>

Methods: A case-control study was conducted on blood samples from 149 NSCLC patients and 100 healthy individuals were analyzed using semi-nested quantitative methylation-specific PCR (sqMSP). Diagnostic performance was assessed using ROC curve analysis and multivariate logistic regression. **Results:** mSHOX2 Δ Ct was significantly lower in NSCLC patients than in healthy controls ($p < 0.001$), indicating higher methylation levels. ROC analysis showed AUC = 0.715, sensitivity 56.38%, and specificity 82.00%. Multivariate logistic regression confirmed that mSHOX2, age, and BMI were independent factors associated with NSCLC risk, while gender and smoking history were no longer significant after adjustment. **Conclusion:** mSHOX2 is a promising non-invasive biomarker for NSCLC detection. Further studies are needed to enhance diagnostic accuracy by integrating additional biomarkers.

Keywords: SHOX2 methylation; Lung cancer; Biomarker; Liquid biopsy; Methylation-specific PCR.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu do ung thư trên toàn cầu, với tỷ lệ sống sót thấp do phần lớn BN được chẩn đoán ở giai đoạn muộn [1]. Hiện nay, phương pháp sàng lọc bằng chụp cắt lớp vi tính liều thấp (low-dose computed tomography - LDCT) đã được chứng minh có thể giúp phát hiện sớm ung thư phổi [2]. Tuy nhiên, phương pháp này có tỷ lệ dương tính giả cao, có thể dẫn đến can thiệp y khoa không cần thiết và gây lo lắng cho BN [3]. Do đó, nhu cầu cấp thiết đặt ra là phát triển các phương pháp chẩn đoán không can thiệp, có độ chính xác cao, giúp phát hiện ung thư phổi sớm và cải thiện tiên lượng BN.

Methyl hóa DNA, một dấu ấn sinh học ổn định và đặc hiệu, đã được nghiên

cứu rộng rãi trong chẩn đoán ung thư phổi [4]. Trong số đó, methyl hóa gene SHOX2 đã được ghi nhận có liên quan chặt chẽ với NSCLC [5]. SHOX2 là yếu tố phiên mã quan trọng, có vai trò trong sự phát triển của hệ hô hấp. Sự methyl hóa tại vùng promoter của gene này đã được báo cáo là xảy ra phổ biến trong các mô ung thư phổi, cũng như trong các mẫu huyết tương của BN mắc bệnh [6]. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra xét nghiệm SHOX2 trên mẫu máu có thể giúp phân biệt BN ung thư phổi với nhóm không mắc bệnh, với độ nhạy và độ đặc hiệu cao [7].

Trong nghiên cứu gần đây, chúng tôi đã phát triển và tối ưu phương pháp semi-nested PCR định lượng để phân tích mức độ mSHOX2 trên mẫu huyết tương, sử dụng mẫu dò khóa có thể kéo

dài chuỗi - extendable blocking probes (ExBPs) nhằm tăng cường độ nhạy và đặc hiệu [8]. Kết quả nghiên cứu sơ bộ cho thấy phương pháp này có thể phát hiện DNA mSHOX2 với giới hạn phát hiện thấp (0,01%) và có khả năng phân biệt rõ ràng giữa BN ung thư phổi và nhóm không mắc bệnh [8]. Tuy nhiên, cần có thêm các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để đánh giá giá trị chẩn đoán thực tế của xét nghiệm này trên lâm sàng.

Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm: *Xác định giá trị chẩn đoán của mức mSHOX2 trong máu ngoại vi để phân biệt BN NSCLC với nhóm khỏe mạnh, đồng thời kiểm tra mối liên quan giữa mức methyl hóa này với các yếu tố lâm sàng như tuổi, giới tính, chỉ số BMI và tiền sử hút thuốc.*

Ngoài ra, chúng tôi cũng tiến hành phân tích hồi quy logistic đa biến để đánh giá vai trò độc lập của SHOX2 methyl hóa trong phân biệt ung thư phổi. Kết quả nghiên cứu kỳ vọng sẽ góp phần cung cấp thêm bằng chứng về tiềm năng của mSHOX2 như một dấu ấn sinh học không can thiệp, có thể ứng dụng trong sàng lọc và hỗ trợ chẩn đoán ung thư phổi trên lâm sàng.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 149 BN NSCLC và 100 người khỏe mạnh, thu nhận từ tháng

4/2021 - 8/2024 tại Bệnh viện Phổi Trung ương.

** Tiêu chuẩn lựa chọn:*

Nhóm BN được chẩn đoán xác định bằng mô bệnh học và chưa qua điều trị, trong khi nhóm khỏe mạnh không có bệnh lý ác tính và tổn thương phổi trên chụp cắt lớp vi tính liều thấp (LDCT), được lựa chọn tương đồng về tuổi, giới tính và tiền sử hút thuốc.

** Tiêu chuẩn loại trừ:*

Những đối tượng mắc ung thư phổi tế bào nhỏ (SCLC), ung thư thứ phát, COPD, lao phổi, bệnh tự miễn hoặc không cung cấp đủ dữ liệu lâm sàng đều bị loại.

** Chọn mẫu:*

Cỡ mẫu được ước tính theo công thức so sánh hai trung bình độc lập, với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ và công suất thống kê 80%, cho thấy cần tối thiểu 90 đối tượng mỗi nhóm. Trong thực tế, nhóm bệnh được thu nhận nhiều hơn do số ca đủ điều kiện cao hơn và sự chênh lệch này không ảnh hưởng đến độ tin cậy của phân tích, nhờ áp dụng các phương pháp thống kê phù hợp với cỡ mẫu không đối xứng. Tất cả người tham gia đều được tư vấn và ký cam kết đồng ý trước khi tham gia nghiên cứu.

2. Phương pháp nghiên cứu

** Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu bệnh chứng được thiết kế nhằm đánh

giá trị chẩn đoán của mức mSHOX2 trong máu ngoại vi.

* *Xử lý số liệu:* Phương pháp phân tích mSHOX2 trong huyết tương bằng PCR bán lồng định lượng đặc hiệu methyl hóa (semi-nested quantitative methylation-specific PCR - sqMSP) đã được nhóm nghiên cứu công bố trước đó trên tạp chí quốc tế uy tín [8], sử dụng mẫu dò khóa có thể kéo dài (Extendable Blocking Probes - ExBPs) để tăng độ nhạy và đặc hiệu.

Phân tích thống kê được thực hiện trên SPSS 20.0 và MedCalc 20.019. So sánh giữa hai nhóm sử dụng kiểm định Mann-Whitney U (biến liên tục) và Chi-square (biến phân loại). Tương quan Spearman đánh giá mối liên quan giữa ΔC_t của mSHOX2 và tuổi. Giá trị chẩn đoán được phân tích bằng đường cong ROC, với AUC đánh giá độ chính xác xét nghiệm và điểm ngưỡng tối ưu xác định theo Youden Index. Hồi quy logistic đa biến được sử dụng để đánh giá vai trò độc lập của mSHOX2 trong phân biệt NSCLC với nhóm khỏe mạnh, điều chỉnh theo tuổi, giới tính, BMI và tiền sử hút thuốc. Mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

3. Đạo đức nghiên cứu

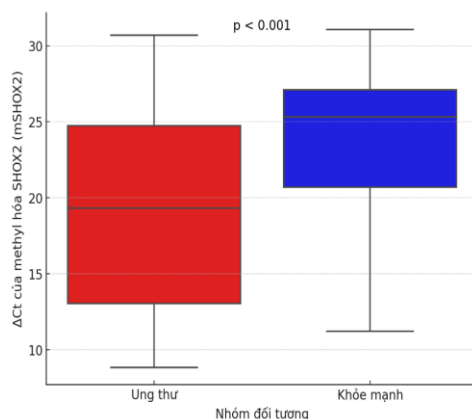
Nghiên cứu được Hội đồng Đạo đức trong Nghiên cứu Y Sinh học, Học viện Quân y phê duyệt theo quyết định số 182/2021/CNChT-HĐĐĐ, ngày 10/8/2021.

Nghiên cứu tuân thủ các nguyên tắc của Tuyên ngôn Helsinki và các quy định về nghiên cứu y sinh học tại Việt Nam. Toàn bộ thông tin cá nhân của người tham gia được bảo mật tuyệt đối và chỉ sử dụng cho mục đích nghiên cứu. Các đối tượng tham gia có quyền rút khỏi nghiên cứu bất kỳ lúc nào mà không ảnh hưởng đến quyền lợi điều trị của họ. Dữ liệu trong nghiên cứu này được thu thập và phân tích với sự chấp thuận của Bệnh viện Phổi Trung ương và Học viện Quân y, và các đơn vị này đã cho phép sử dụng, công bố kết quả nghiên cứu theo đúng quy định hiện hành. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích liên quan đến nghiên cứu này.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. So sánh mức độ methyl hóa gene SHOX2 giữa nhóm ung thư và nhóm khỏe mạnh

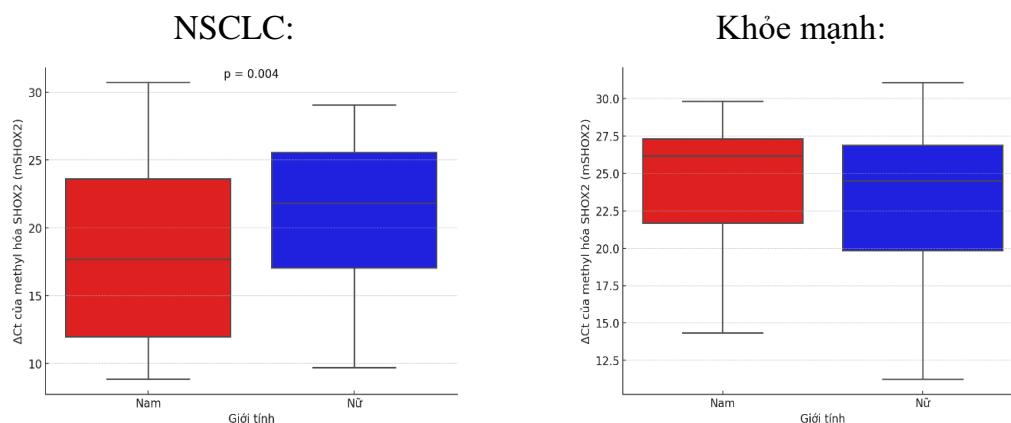
Phân tích mức methyl hóa DNA gene SHOX2 (mSHOX2) giữa nhóm NSCLC và nhóm khỏe mạnh cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Trung vị ΔC_t của mSHOX2 ở nhóm ung thư là 19,31 (IQR: 13,05 - 24,76), thấp hơn đáng kể so với nhóm khỏe mạnh, có trung vị là 25,32 (IQR: 20,71 - 27,10). Kiểm định Mann-Whitney U xác nhận sự khác biệt này với mức ý nghĩa thống kê cao ($p < 0,001$).



Hình 1. Biểu đồ boxplot so sánh mức Δ Ct của mSHOX2 giữa nhóm ung thư và nhóm khỏe mạnh.

2. Mối liên quan giữa mSHOX2 với tuổi, giới tính, BMI và tiền sử hút thuốc

Phân tích tương quan Spearman giữa Δ Ct của mSHOX2 và tuổi không cho thấy mối liên quan có ý nghĩa trong cả nhóm ung thư và nhóm khỏe mạnh ($p > 0,05$). So sánh giữa giới tính nam và nữ cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa trong nhóm ung thư ($p = 0,0035$), trong khi không có sự khác biệt đáng kể trong nhóm khỏe mạnh ($p = 0,059$). Trong nhóm ung thư, nam giới có Δ Ct thấp hơn, tức là mức mSHOX2 cao hơn so với nữ giới (Hình 2).



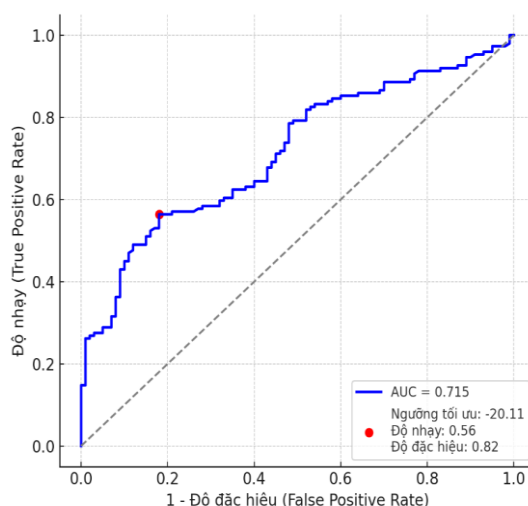
Hình 2. So sánh mức mSHOX2 theo giới tính trong nhóm NSCLC và nhóm khỏe mạnh.

So sánh mức mSHOX2 giữa các nhóm BMI không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa trong nhóm ung thư ($p = 0,625$). Trong nhóm khỏe mạnh, có xu hướng khác biệt giữa các nhóm BMI ($p = 0,051$), nhưng chưa đạt mức ý nghĩa thống kê.

Mức mSHOX2 giữa nhóm có và không có tiền sử hút thuốc có sự khác biệt đáng kể trong nhóm ung thư ($p = 0,018$), với nhóm có tiền sử hút thuốc có ΔCt thấp hơn, tức là mức mSHOX2 cao hơn so với nhóm không hút thuốc. Trong nhóm khỏe mạnh, không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa hai nhóm.

3. Phân tích ROC đánh giá giá trị chẩn đoán của mức mSHOX2

Kết quả cho thấy diện tích dưới đường cong (AUC) đạt 0,715, phản ánh giá trị chẩn đoán ở mức trung bình (Hình 3). Ngưỡng tối ưu của ΔCt của mSHOX2 được xác định là 20,11, với độ nhạy (sensitivity) đạt 56,38% và độ đặc hiệu (specificity) đạt 82,00%.



Hình 3. Đường cong ROC đánh giá giá trị chẩn đoán của mSHOX2.

Đường cong ROC đánh giá giá trị chẩn đoán của mức mSHOX2 (ΔCt của mSHOX2) trong việc phân biệt BN NSCLC và nhóm khỏe mạnh. Điểm ngưỡng tối ưu (20,11) được đánh dấu trên đường cong, với độ nhạy 56,38% và độ đặc hiệu 82,00%. Đường màu xám nét đứt biểu diễn đường phân loại ngẫu nhiên (AUC = 0,5).

4. Phân tích hồi quy logistic đa biến đánh giá vai trò độc lập của mSHOX2

Phân tích hồi quy logistic được thực hiện để đánh giá mối liên quan giữa mức mSHOX2 (ΔCt của mSHOX2) và nguy cơ NSCLC, đồng thời kiểm soát

ảnh hưởng của các yếu tố khác bao gồm tuổi, giới tính, BMI và tiền sử hút thuốc.

Phân tích đơn biến cho thấy ΔCt của mSHOX2, tuổi, giới tính và BMI có ý nghĩa thống kê, trong khi tiền sử hút thuốc có xu hướng liên quan nhưng chưa đạt ý nghĩa ($p = 0,075$). Trong mô

hình hồi quy đa biến, ΔCt của mSHOX2 vẫn là yếu tố dự báo độc lập có ý nghĩa cao ($p < 0,001$, $\beta = -0,1528$), khẳng định rằng mức mSHOX2 cao hơn liên quan đến nguy cơ ung thư phổi. Tuổi cũng là yếu tố nguy cơ đáng kể ($p < 0,001$, $\beta = 0,0595$), trong khi BMI thấp hơn có liên quan đến nguy cơ ung thư cao hơn ($p = 0,001$, $\beta = -0,9767$). Ngược lại, giới tính và tiền sử hút thuốc không còn ý nghĩa thống kê trong mô hình đa biến ($p > 0,05$), cho thấy tác động của chúng có thể đã được phản ánh qua mức mSHOX2, tuổi và BMI.

BÀN LUẬN

Nghiên cứu này cho thấy mức độ methyl hóa DNA của gene SHOX2 (mSHOX2) trong máu ngoại vi có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm BN NSCLC và nhóm khỏe mạnh. Kết quả cho thấy giá trị ΔCt của mSHOX2 thấp hơn ở nhóm ung thư, phản ánh mức methyl hóa gene SHOX2 cao hơn so với nhóm không mắc bệnh. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, trong đó mSHOX2 đã được ghi nhận có liên quan đến sự phát triển của ung thư phổi và có thể đóng vai trò như một dấu ấn sinh học tiềm năng [5, 6].

Phân tích mối liên quan giữa mSHOX2 với các đặc điểm của đối tượng nghiên cứu cho thấy mức độ mSHOX2 cao hơn ở nam giới mắc NSCLC so với nữ giới. Điều này có thể

phản ánh sự khác biệt về yếu tố môi trường (như tỷ lệ hút thuốc cao hơn ở nam giới) hoặc sự khác biệt về cơ chế sinh học giữa hai giới trong bệnh sinh của ung thư phổi. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa về mức độ mSHOX2 giữa các nhóm BMI trong nhóm ung thư, mặc dù có xu hướng khác biệt trong nhóm khỏe mạnh. Đáng chú ý, nhóm có tiền sử hút thuốc trong nhóm ung thư có mức mSHOX2 cao hơn so với nhóm không hút thuốc ($p = 0,018$). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, tất cả những người có tiền sử hút thuốc đều là nam giới, do đó sự khác biệt về mSHOX2 theo tiền sử hút thuốc có thể đồng thời phản ánh mối liên quan giữa giới tính và mức methyl hóa. Kết quả này có thể cho thấy hút thuốc góp phần điều hòa mức mSHOX2, nhưng cũng đặt ra câu hỏi về vai trò riêng biệt của yếu tố giới tính và hút thuốc trong quá trình methyl hóa, điều này cần được làm rõ hơn trong các nghiên cứu tiếp theo.

Phân tích đường cong ROC cho thấy mSHOX2 có giá trị chẩn đoán trung bình với AUC đạt 0,715, độ nhạy 56,38% và độ đặc hiệu 82,00%. Mặc dù xét nghiệm dựa trên mSHOX2 có thể hỗ trợ chẩn đoán ung thư phổi, nhưng độ nhạy chưa cao, điều này gợi ý rằng cần kết hợp với các dấu ấn sinh học khác để nâng cao hiệu quả phân loại BN. Một số nghiên cứu trước đây đã đề xuất việc kết

hợp SHOX2 với các gene khác, như PTGER4, có thể cải thiện độ chính xác chẩn đoán [7].

Phân tích hồi quy logistic đa biến khẳng định mSHOX2, tuổi và BMI là những yếu tố độc lập liên quan đến nguy cơ ung thư phổi, ngay cả khi đã điều chỉnh theo giới tính và tiền sử hút thuốc. MSHOX2 cao hơn (ΔCt thấp hơn) vẫn có ý nghĩa thống kê mạnh mẽ trong mô hình hồi quy ($p < 0,001$, $\beta = -0,1528$). Tuổi cũng là yếu tố dự báo đáng kể ($p < 0,001$, $\beta = 0,0595$), với nguy cơ ung thư tăng theo tuổi. BMI thấp hơn có liên quan đến nguy cơ ung thư cao hơn ($p = 0,001$, $\beta = -0,9767$). Ngược lại, giới tính và tiền sử hút thuốc không còn ý nghĩa thống kê trong mô hình đa biến, gợi ý rằng tác động của các yếu tố này đã được phản ánh qua mức mSHOX2, tuổi và BMI.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy mSHOX2 trong máu ngoại vi cao hơn đáng kể ở BN NSCLC, thể hiện qua ΔCt thấp hơn. Phân tích ROC xác định AUC = 0,715, với độ nhạy 56,38% và độ đặc hiệu 82,00%. Hồi quy logistic đa biến khẳng định mSHOX2, tuổi và BMI là các yếu tố độc lập liên quan đến nguy cơ NSCLC, trong khi giới tính và tiền sử hút thuốc không còn ý nghĩa sau khi điều chỉnh. Kết quả này cho thấy mSHOX2 là dấu ấn sinh học tiềm năng,

hỗ trợ phát hiện ung thư phổi không xâm lấn, nhưng cần nghiên cứu thêm để xác nhận và cải thiện độ chính xác khi kết hợp với các dấu ấn khác.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ kỹ thuật và cộng sự đã đóng góp tích cực trong quá trình xử lý mẫu và phân tích dữ liệu nghiên cứu. Chúng tôi trân trọng ghi nhận những ý kiến chuyên môn sâu sắc từ các nhà khoa học và đồng nghiệp, góp phần nâng cao chất lượng phân tích và trình bày kết quả nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Siegel RL, Miller KD, & Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2023; 73(1):17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.
2. National Lung Screening Trial Research Team. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365(5):395-409. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal102873>.
3. Pinsky PF. Lung cancer screening with low-dose CT: A world-wide view. *Transl Lung Cancer Res*. 2018 Jun; 7(3):234-242. DOI: 10.21037/tlcr.2018.05.12.
4. Herbst RS, Morgensztern D, & Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018; 553:446-454. <https://doi.org/10.1038/nature25183>.

5. Schmidt B, Liebenberg V, Dietrich D et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer*. 2010 Nov 3; 10:600. DOI: 10.1186/1471-2407-10-600.

6. Dietrich D, Kneip C, Raji O et al. Performance evaluation of the DNA methylation biomarker SHOX2 for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates. *Int J Oncol*. 2012 Mar; 40(3):825-832. DOI: 10.3892/ijo.2011.1264.

7. Weiss G, Schlegel A, Kottwitz D et al. Validation of the SHOX2/PTGER4 DNA methylation marker panel for plasma-based discrimination between patients with malignant and nonmalignant lung disease. *J Thorac Oncol*. 2017 Jan; 12(1):77-84. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.08.123.

8. Phuong NA, Dao TT, Pham PB et al. Novel semi-nested real-time PCR assay leveraging extendable blocking probes for improved SHOX2 methylation analysis in lung cancer. *Biomolecules* 2024; 14: 729. <https://doi.org/10.3390/biom14060729>.