

PHỐI HỢP CERULOPLASMIN MRNA VÀ FIBRINOGEN CHAIN A MRNA HUYẾT TƯƠNG TRONG CHẨN ĐOÁN UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN

Ngô Tuấn Minh¹, Dương Quang Huy¹, Hồ Hữu Thọ¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá giá trị của phối hợp Ceruloplasmin (CP) mRNA và Fibrinogen Chain A (FGA) mRNA huyết tương trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Khảo sát 131 bệnh nhân (BN) được chẩn đoán UTBMTBG, 70 BN bệnh gan mạn tính (BGMT) và 41 người khỏe mạnh (NKM) tại Bệnh viện Quân y 103 từ tháng 5/2020 đến tháng 6/2024. Xác định mức độ biểu hiện CP mRNA và FGA mRNA huyết tương bằng kỹ thuật Semi-nested quantitative Realtime-RT PCR và xác định giá trị chẩn đoán UTBMTBG so với nhóm đối chứng khi kết hợp 2 dấu ấn trên. **Kết quả:** Phối hợp CP mRNA và FGA mRNA có giá trị phân biệt UTBMTBG với tình trạng không UTBMTBG (AUC của các nhóm chứng chung, BGMT và NKM tương ứng là 0,84, 0,79 và 0,96). Giá trị chẩn đoán khi phối hợp CP mRNA và FGA mRNA đối với UTBMTBG có AFP $\leq$ 20ng/mL, nhóm chứng chung ở mức tốt (AUC = 0,82), nhóm chứng BGMT ở mức khá (AUC = 0,75) và nhóm chứng NKM ở mức rất tốt (AUC = 0,96). **Kết luận:** Phối hợp CP mRNA và FGA mRNA có hiệu quả chẩn đoán khá tốt UTBMTBG và UTBMTBG có AFP < 20 ng/ml so với nhóm đối chứng.

Từ khóa: Ung thư biểu mô tế bào gan, CP mRNA, FGA mRNA

SUMMARY

COMBINATION OF PLASMA CERULOPLASMIN mRNA AND FIBRINOGEN CHAIN A mRNA IN THE DIAGNOSIS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Objective: To investigate the value of combining plasma Ceruloplasmin mRNA and Fibrinogen Chain A mRNA in the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC). **Subjects and methods:** To survey 131 HCC patients, 70 chronic liver disease (CHD) patients, and 41 healthy people (HD) at 103 Military Hospital from 5/2020 to 6/2024. Determination of plasma CP mRNA and FGA mRNA expression levels by Semi-nested quantitative RT-PCR technique and survey of the value of combining the two markers for diagnostic HCC compared to the control group. **Results:** The combination of CP mRNA and FGA mRNA has the value of distinguishing HCC from non-HCC (AUC of the general control, CHD, and HD groups are 0.84, 0.79 and 0.96, respectively). The diagnostic value when combining CP mRNA and FGA mRNA for HCC with AFP $\leq$ 20ng/mL, the general control group is at a good

level (AUC = 0.82), the CHD control group is at a moderate level (AUC = 0.75), and the HD control group is at a very good level (AUC = 0.96).

Conclusion: The combination of CP mRNA and FGA mRNA has quite good diagnostic efficiency for HCC and HCC with AFP < 20 ng/ml compared with the control group. **Keywords:** Hepatocellular carcinoma, CP mRNA, FGA mRNA

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG) là loại ung thư phổ biến thứ sáu trong các loại ung thư trên thế giới theo dữ liệu GLOBOCAN 2022. Tại Việt Nam, UTBMTBG đứng hàng đầu về tỷ lệ tử vong và đứng hàng thứ 2 về tỷ lệ mắc mới trong các loại ung thư [1].

Cùng với các kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh như cắt lớp vi tính và cộng hưởng từ, các dấu ấn sinh học trong máu như Alpha-fetoprotein (AFP), AFP-L3, Des- γ -carboxy prothrombin đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán UTBMTBG tuy nhiên vẫn còn nhiều bệnh nhân (BN) không điển hình, cần phải sinh thiết gan để chẩn đoán [2], [3]. Trong một thập niên gần đây, sinh thiết lỏng được nghiên cứu rộng rãi và với những kết quả bước đầu rất khả quan, cho thấy kỹ thuật này có thể sẽ thay thế sinh thiết mô truyền thống để chẩn đoán các loại ung thư trong tương lai, trong đó mRNA ngoại bào nổi lên là một dấu ấn tiềm năng, có tính đặc hiệu với khối u cao hơn so với chỉ thị tế bào u cũng như DNA khối u lưu hành.

Năm 2022, tác giả Roskams-Hieter B. và cs đã ghi nhận CP mRNA và FGA mRNA huyết tương có thể phân biệt bệnh nhân UTBMTBG với bệnh nhân xơ gan và người khỏe mạnh [4]. Cơ sở của chúng tôi đã xác định được mức độ biểu hiện CP mRNA và FGA mRNA huyết tương và tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu: "*Đánh giá giá trị của phối hợp CP mRNA và FGA mRNA huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG*".

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. Nhóm bệnh gồm 131 BN UTBMTBG điều trị nội trú tại Bệnh viện Quân y 103 từ tháng 5/2020 đến tháng 6/2024 được chẩn đoán xác định UTBMTBG theo Bộ y tế Việt Nam (2020). Loại trừ: Bệnh nhân đã được điều trị, đồng mắc các loại ung thư khác và không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Nhóm chứng bệnh gan mạn tính (BGMT) là những bệnh nhân xơ gan, viêm gan virus B, và

¹Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm chính: Ngô Tuấn Minh

Email: ngotuanminh103hospital@gmail.com

Ngày nhận bài: 12.2.2025

Ngày phản biện khoa học: 19.3.2025

Ngày duyệt bài: 24.4.2025

viêm gan virus C mạn tính, không có tiền sử mắc ung thư, không phát hiện tổn thương gan khu trú trong thời gian theo dõi 6 tháng.

Nhóm chứng người khỏe mạnh (NKM) gồm 41 đối tượng đi khám sức khỏe định kỳ tại BVQY103, không có tiền sử bệnh lý gan mật, không mắc ung thư.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Nghiên cứu mô tả, cắt ngang, chọn mẫu thuận tiện.

- Xác định mức độ biểu hiện CP mRNA, FGA mRNA tại Viện nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y thông qua các bước:

+ Thu thập 10mL máu tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA. Tách RNA bằng QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Đức).

+ Khuếch đại CP mRNA và FGA mRNA huyết tương bằng kỹ thuật semi-nested quantitative RT-PCR cùng với chứng nội IC với trình tự các đoạn mỗi trong bảng 1. Sử dụng master mix là

1x HTOne Ultra RT-qPCR Probe master mix (HT Biotec, Vietnam).

+ Phản ứng vòng 1 PCR trên máy Applied Biosystems 9800 FAST Thermal Cyclor với chu trình: sao mã ngược ở 25°C trong 2 phút, 55°C trong 10 phút, 95°C trong 2 phút. Khuếch đại gồm chu kỳ đầu 95°C trong 15s, 63°C trong 30s, 72°C trong 30s. Sau đó khuếch đại 18 chu kỳ 94°C trong 15s, 76°C trong 30s, 72°C trong 30s.

+ Phản ứng vòng 2 trên máy Rotor-Gene Q, chu kỳ đầu 95°C trong 15 phút, sau đó là 35 chu kỳ 94°C 15s, 63°C trong 30s, và 72°C trong 30s.

+ Phân tích đường cong nóng chảy của DNA, mức độ biểu hiện CP mRNA và FGA mRNA là tỷ lệ chiều cao đỉnh gen đích và đỉnh gen đối chứng IC.

- Kết quả mức độ biểu hiện phối hợp được tính bằng cách tạo ra phương trình hồi quy tuyến tính giữa mức độ biểu hiện của CP mRNA và FGA mRNA trên phần mềm thống kê y học Medcal 22.0.

Bảng 1. Trình tự của các mồi, mẫu dò và chứng nội

Chu kỳ khuếch đại	Primers/probe	Trình tự primer (5' - 3')
PCR vòng 1	Mồi xuôi CP-Fo	CGACGTAAAACGACGGCCAGT-CCATCTGAAAGCCGGTTTGC
	Mồi ngược CP-Ro	CTGGCATATCATGACATACGACCTGA-ACATGCTTCCCACGG
	Mồi xuôi FGA-Fo	CGACGTAAAACGACGGCCAGT-GAGAGGCGATTTTCTCAG
	Mồi ngược FGA-Ro	CTGGCATATCATGACATACGACCTGA-CTGCTTCTCAGATCCTC
	Mồi xuôi IC-Fo	CGACGTAAAACGACGGCCAGT-ACTAGCGTGCCTTTGTAA
	Mồi ngược IC-Ro	CTGGCATATCATGACATACGACCTGA-GAGCGATACGAGCA
PCR vòng 2	Mồi xuôi CP-Fi	CCAGGTCCAGGAGTGTA
	Mồi xuôi FGA-Fi	ACCGTGATAATACCTAC
	Mồi xuôi IC-Fi	CTCATTCGTTTCGGAAGAGC
	Mồi ngược Ur	CTGGCATATCATGACATACGACCTGA
Trình tự gen nội chứng (IC)		CGGCGTAATACGACTCACTATAGGGATGAACCGACGACGACTAC AGCGTGCCTTTGTAAGCACAAGCTGATGAGTACGAACCTATGTAC TCATTTCGTTTCGGAAGAGCGGGCGGCTGCTCGCGGATACCCGTAC CTCGGGTTTCCGTCTTGCTCGTATCGCTCGAGAACGCAAGTTCTGT TAACGTGAGTCTTGTAACCTTCTTTTACGTTTACTCTCGTGTTA AAAATCTGAATTCTTCTAGAGTTCTCTGATCTTC

Ghi chú: Các vùng được gạch chân là đoạn trình tự không bổ sung ở đầu 5'

2.3. Xử lý số liệu: Xử lý số liệu bằng phần mềm Medcal 22.0. Giá trị phối hợp 2 dấu ấn CP mRNA và FGA mRNA sử dụng bằng phương pháp hồi quy tuyến tính.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm chung của các nhóm NC

Bảng 2. Đặc điểm tuổi, giới các đối tượng nghiên cứu

Nhóm		UTBMTBG ^a (n=131)	BGMT ^b (n=70)	NKM ^c (n=41)	p
Đặc điểm	Tuổi	Trung vị (Tứ phân vị) 63,0 (53,0 - 70,0)	58,5 (40,8 - 62,0)	48,0 (36,5 - 60,0)	p _{a-b} < 0,05*; p _{a-c} < 0,05* p _{b-c} > 0,05*
	Giới tính	Nam/ n (%) 124 (94,7)	64 (91,4)	36 (87,8)	
	Nữ/ n (%)	7 (5,3)	6 (8,6)	5 (12,2)	> 0,05

- Trung vị tuổi BN ở nhóm UTBMTBG cao hơn so với các nhóm BGMT và NKM, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

- Nhóm UTBMTBG chủ yếu là nam chiếm 94,7%, khác biệt không có ý nghĩa so với nhóm BGMT và nhóm NKM, p > 0,05.

3.2. Mức độ biểu hiện CP mRNA và FGA mRNA huyết tương

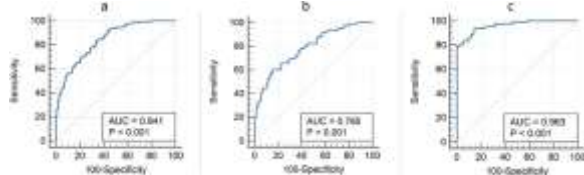
Bảng 3. Mức độ biểu hiện CP mRNA và FGA mRNA huyết tương ở các đối tượng nghiên cứu

Chỉ số		UTBMTBG ^a (n=131)	BGMT ^b (n=70)	NKM ^c (n=41)	p
CP mRNA	Trung vị	2,84	0,51	0,18	p _{a-b} < 0,001
	Tứ phân vị	0,77 - 8,92	0,16 - 1,87	0,12 - 0,43	p _{a-c} < 0,001
	Min - Max	0,04 - 30,00	0,02 - 7,50	0,04 - 5,11	p _{b-c} = 0,01
FGA mRNA	Trung vị	0,33	0,19	0,10	p _{a,b} < 0,001
	Tứ phân vị	0,17 - 1,57	0,09 - 0,61	0,06 - 0,14	p _{a,c} < 0,001
	Min - Max	0,05 - 11,39	0,03 - 2,28	0,03 - 0,17	p _{b,c} < 0,001

- Trung vị mức độ biểu hiện CP mRNA huyết tương ở nhóm UTBMTBG cao hơn có ý nghĩa so với nhóm BGMT và NKM (2,84 so với 0,51 và 0,18), p < 0,05).

- Trung vị mức độ biểu hiện FGA mRNA huyết tương của nhóm UTBMTBG (0,33) cao hơn có ý nghĩa so với NKM (0,10), nhóm BGMT (0,19), p < 0,001.

3.3. Giá trị của phối hợp CP mRNA và FGA mRNA huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG



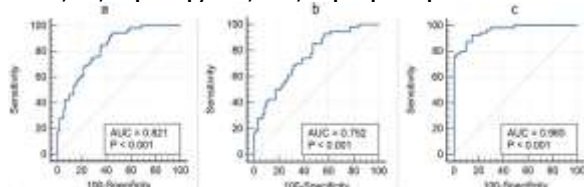
Biểu đồ 1. AUC của phối hợp CP mRNA và FGA mRNA trong chẩn đoán UTBMTBG

(a): so với nhóm không UT, (b): so với nhóm BGMT, (c): so với nhóm NKM

- Phối hợp CP mRNA và FGA mRNA có giá trị chẩn đoán UTBMTBG phân biệt với tình trạng không UTBMTBG ở mức tốt (AUC = 0,84; p < 0,001). Tại điểm cắt tối ưu 0,36, độ nhạy 84%, độ đặc hiệu 65,8%.

- Phối hợp CP mRNA + FGA mRNA có giá trị chẩn đoán UTBMTBG phân biệt với BGMT ở mức khá (AUC = 0,79; p < 0,001), tại điểm cắt tối ưu 0,63 cho độ nhạy 60,3%, độ đặc hiệu 84,3%.

- Phối hợp CP mRNA với FGA mRNA có giá trị chẩn đoán UTBMTBG để phân biệt với NKM ở rất tốt (AUC = 0,96; p < 0,0001). Tại điểm cắt tối ưu 0,94, độ nhạy 79,4%, độ đặc hiệu 100%.



Biểu đồ 2. AUC của phối hợp CP mRNA và FGA mRNA trong chẩn đoán UTBMTBG < 20ng/mL

(a): so với nhóm không UT, (b): so với nhóm BGMT, (c): so với nhóm NKM

- Phối hợp CP mRNA + FGA mRNA có giá trị chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL với nhóm chứng không UTBMTBG ở mức tốt (AUC = 0,82; p < 0,001). Tại điểm cắt tối ưu 0,19, độ nhạy 94,4%, độ đặc hiệu 55,0%.

- Phối hợp CP mRNA + FGA mRNA có giá trị chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL với nhóm chứng BGMT ở mức khá (AUC=0,75; p < 0,001). Tại điểm cắt tối ưu 0,31, độ nhạy 85,2%, độ đặc hiệu 52,9%.

- Phối hợp CP mRNA + FGA mRNA có giá trị chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL với nhóm chứng NKM ở mức rất tốt (AUC=0,96; p < 0,001). Tại điểm cắt tối ưu 0,31, độ nhạy 92,6%, độ đặc hiệu 85,4%.

IV. BÀN LUẬN

Trung vị mức độ biểu hiện CP mRNA huyết tương ở bệnh nhân UTBMTBG trong nghiên cứu là 2,84 (0,77 - 8,92). Các nghiên cứu trên thế giới ghi nhận ở bệnh nhân UTBMTBG có tình trạng tăng biểu hiện CP mRNA trong máu do 2 cơ chế chính. Thứ nhất, bệnh nhân UTBMTBG thường tăng biểu hiện gen GPC3, gây ức chế họ gen metallothionein (MT) và làm tăng mức độ biểu hiện đồng trong mô kế quanh khối u, từ đó dẫn đến mức độ biểu hiện CP mRNA trong máu. Thứ hai, sự biểu hiện giảm hepcidin (HAMP) trong khối UTBMTBG dẫn đến giảm mức độ biểu hiện sắt nội bào, kích thích tăng tổng hợp CP mRNA trong các tế bào gan khỏe mạnh [5]. Đối với FGA mRNA, gen này có vai trò mã hóa protein fibrinogen chuỗi A, một trong 3 thành phần của fibrinogen, một yếu tố đông máu quan trọng trong cơ thể người được tổng hợp ở gan. Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện FGA mRNA ở nhóm UTBMTBG có trung vị (khoảng giá trị) là 0,33 (0,17 - 1,57). Fibrinogen tăng trong bệnh cảnh UTBMTBG là do tăng tổng hợp bởi tế bào ung thư gan và do tăng phản ứng viêm hệ thống [6].

Khảo sát giá trị chẩn đoán khi phối hợp CP mRNA và FGA mRNA huyết tương, có giá trị chẩn đoán UTBMTBG phân biệt với tình trạng không UTBMTBG, BGMT và NKM đạt ở mức khá đến

mức rất tốt với độ nhạy và độ đặc hiệu khá cao (độ nhạy từ 60,3% - 84%; độ đặc hiệu từ 65,8% - 100%).

Như vậy, việc phối hợp hai dấu ấn trên về cơ bản làm tăng giá trị chẩn đoán của xét nghiệm dù cho vẫn còn một số tình huống lâm sàng vai trò này còn hạn chế như trong trường hợp phân biệt UTBMTBG với BGMT. Hai dấu ấn trên có cơ chế tăng biểu hiện khác nhau trong bệnh sinh của UTBMTBG, chính vì thế, việc nghiên cứu thêm 1 đến 2 dấu ấn với các cơ chế tăng biểu hiện khác nhau trong UTBMTBG như con đường bổ thể với ứng viên là C3 mRNA có thể sẽ là một hướng tiếp cận khả thi trong chẩn đoán UTBMTBG bằng các dấu ấn sinh học phân tử [4].

Trong nghiên cứu tiếp cận phối hợp dấu ấn sinh học phân tử với dấu ấn truyền thống để tăng hiệu quả chẩn đoán UTBMTBG, Nguyen H.B. và CS (2021) đã khảo sát sự phối hợp hTERT mRNA với các dấu ấn khác như AFP, AFP-L3, DCP và ghi nhận sự phối hợp hTERT mRNA với DCP đạt hiệu quả chẩn đoán tốt nhất với AUC = 0,932, độ nhạy 98,2%, độ đặc hiệu 88,2% [7].

Phối hợp nhiều dấu ấn tỏ ra khá hiệu quả, giúp nâng cao độ nhạy và độ đặc hiệu. Tuy nhiên, việc sử dụng nhiều dấu ấn sinh học cũng đồng nghĩa với tăng chi phí tài chính và cũng đòi hỏi nhiều nghiên cứu để thẩm định giá trị của việc phối hợp trên trong các quần thể khác nhau.

Theo các nghiên cứu hiện nay, có tới 35,1% - 47,5% BN UTBMTBG có AFP < 20ng/mL, nhất là các trường hợp có khối u kích thước nhỏ ≤ 2cm. Điều này gây khó khăn cho việc chẩn đoán sớm UTBMTBG. Việc phối hợp 2 dấu ấn CP mRNA và FGA mRNA trong chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20 ng/ml cho kết quả AUC giao động từ mức khá đến rất tốt (0,75 - 0,96) và độ nhạy cao, giao động từ 85,2% - 94,4%, độ đặc hiệu trong trường hợp này còn hạn chế.

So với hiệu quả chẩn đoán của các dấu ấn khác, kết quả này cũng rất đáng để tiếp tục nghiên cứu thêm. Theo tổng hợp của Wang T. và Zhang K.H. và CS (2020), PIVKA II có nồng độ cao ở UTBMTBG giai đoạn sớm do HBV, AUC là 0,856, độ nhạy 76,3% và độ đặc hiệu 89,1% trong chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL. Một dấu ấn phổ biến khác là AFP-L3, có độ nhạy 41,5% và độ đặc hiệu 85,1% trong chẩn đoán UTBMTBG có AFP < 20ng/mL [8]. Với kết quả thu được, CP mRNA có thể là một hướng lựa chọn bổ sung cho BN UTBMTBG có AFP < 20ng/mL nếu được nghiên cứu và tối ưu tốt hơn.

Như vậy, giá trị của phối hợp hai dấu ấn này trong việc chẩn đoán UTBMTBG có AFP <

20ng/mL là rất tiềm năng. Ngay cả đối với những BN UTBMTBG có kết quả xét nghiệm AFP không tăng thì CP mRNA và FGA mRNA vẫn giữ được hiệu quả nhất định trong chẩn đoán tuy độ nhạy không cao. Điều này cho thấy phối hợp CP mRNA và FGA mRNA có thể trở thành dấu ấn sinh học bổ trợ đặc lực cho AFP trong chẩn đoán UTBMTBG nhất là trong trường hợp AFP không tăng.

V. KẾT LUẬN

Khảo sát hiệu quả phối hợp CP mRNA và FGA mRNA huyết tương trong chẩn đoán UTBMTBG, chúng tôi ghi nhận:

- Phối hợp CP mRNA và FGA mRNA có giá trị phân biệt UTBMTBG với tình trạng không UTBMTBG (AUC của các nhóm chứng chung, BGMT và NKM tương ứng là 0,84, 0,79 và 0,96).

- Giá trị chẩn đoán khi phối hợp CP mRNA và FGA mRNA đối với UTBMTBG có AFP ≤ 20ng/mL, nhóm chứng chung ở mức tốt (AUC = 0,82), nhóm chứng BGMT ở mức khá (AUC = 0,75) và nhóm chứng NKM ở mức rất tốt (AUC = 0,96).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bray F., Laversanne M., Sung H., et al.** (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 74(3): 229-63.
2. **Singal A. G., Llovet J. M., Yarchoan M., et al.** (2023). AASLD Practice Guidance on prevention, diagnosis, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 78(6): 1922-65.
3. **Kudo M., Kawamura Y., Hasegawa K., et al.** (2021). Management of Hepatocellular Carcinoma in Japan: JSH Consensus Statements and Recommendations 2021 Update. *Liver Cancer*, 10(3): 181-223.
4. **Roskams-Hieter B., Kim H. J., Anur P., et al.** (2022). Plasma cell-free RNA profiling distinguishes cancers from pre-malignant conditions in solid and hematologic malignancies. *NPJ Precis Oncol*, 6(1): 28.
5. **Mukhopadhyay C. K., Attieh Z. K., Fox P. L.** (1998). Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science*, 279(5351): 714-7.
6. **Zanetto A., Campello E., Spiezia L., et al.** (2018). Cancer-Associated Thrombosis in Cirrhotic Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*, 10(11).
7. **Nguyen H. B., Le X. T., Nguyen H. H., et al.** (2022). Diagnostic Value of hTERT mRNA and in Combination With AFP, AFP-L3%, Des-γ-carboxyprothrombin for Screening of Hepatocellular Carcinoma in Liver Cirrhosis Patients HBV or HCV-Related. *Cancer Inform*, 21: 11769351221100730.
8. **Wang T., Zhang K. H.** (2020). New Blood Biomarkers for the Diagnosis of AFP-Negative Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol*, 10: 1316.