



Original Article

Assessment of the Integrity of Cell-free DNA via DNA Repeats in Lung cancer Plasma

Pham The Tung*, Pham Thi Ngoc Phuong, Pham Minh Oanh, Pham Thi Yen Nhi

VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

Received 7th July 2026

Revised 30th July 2026; Accepted 14th August 2026

Abstract: Circulating cell-free DNA (cfDNA) consists of highly diverse, short DNA fragments that reflect the physiological or pathological conditions of the body. Cancer patients exhibit higher concentrations of cfDNA, but its integrity—assessed via the cfDNA integrity (cfDI) index—is decreased compared to healthy individuals. The cfDI ratio based on *Alu* repetitive sequences (cfDI-*Alu*) is considered a potential biomarker to support early diagnosis and progression monitoring of cancer. This study develops a novel cfDI index based on two types of repetitive sequences: *Alu* and *LINE-1* (*L1*). Initial evaluation of 122 cfDNA samples from lung cancer patients and 127 cfDNA samples from healthy controls showed that the cfDI-*Alu*/*L1* index achieved a higher AUC value (0.72) than cfDI-*Alu* (0.69), suggesting that further studies with larger sample sizes are required to determine the diagnostic value of this new index.

Keywords: Circulating cell-free DNA (cfDNA), cfDNA integrity (cfDI) index, *Alu* and *LINE-1* (*L1*) repetitive sequences.

* Corresponding author.

E-mail address: phamthetung240895@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.5066>

Nghiên cứu ứng dụng các trình tự DNA lặp trong đánh giá tính toàn vẹn của DNA tự do (cfDNA) máu ngoại vi ở bệnh nhân ung thư phổi

Phạm Thế Tùng*, Phạm Thị Ngọc Phượng, Phạm Minh Oanh, Phạm Thị Yến Nhi

*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 7 tháng 7 năm 2026

Chỉnh sửa ngày 30 tháng 7 năm 2026; Chấp nhận đăng ngày 14 tháng 8 năm 2026

Tóm tắt: DNA tự do trong máu ngoại vi (cfDNA) là các đoạn DNA có kích thước ngắn rất đa dạng, phản ánh tình trạng sinh lý hoặc bệnh lý của cơ thể. cfDNA của bệnh nhân ung thư có nồng độ cao hơn nhưng tính toàn vẹn, đánh giá qua hệ số toàn vẹn cfDNA (cfDI), giảm đi so với người khỏe mạnh. Hệ số cfDI xây dựng trên trình tự lặp *Alu* (cfDI-*Alu*) được xem là chỉ thị tiềm năng hỗ trợ chẩn đoán sớm và tiên tri của bệnh ung thư. Nghiên cứu này xây dựng một hệ số cfDI mới dựa trên 2 loại trình tự lặp *Alu* và *LINE-1* (*L1*). Khảo sát bước đầu trên 122 mẫu cfDNA của bệnh nhân ung thư phổi và 127 mẫu cfDNA của người khỏe mạnh cho thấy hệ số cfDI-*Alu*/*L1* có giá trị AUC (0,72) cao hơn so với cfDI-*Alu* (0,69), gợi ý cần nghiên cứu trên số mẫu nhiều hơn để xác định giá trị chẩn đoán của hệ số mới này.

Từ khóa: cfDNA-DNA tự do trong máu, hệ số cfDI (DNA integrity index), trình tự lặp *Alu* và *LINE-1* (*L1*).

1. Mở đầu

DNA tự do trong máu ngoại vi (cfDNA) là các đoạn DNA có kích thước ngắn rất đa dạng, phản ánh tình trạng sinh lý hoặc bệnh lý của cơ thể [1, 2]. Phần lớn cfDNA được tạo ra do apoptosis, bị phân giải bởi DNase tạo nên những phân tử kích thước không quá 160 bp [1]. Một phần nhỏ cfDNA được tạo từ tế bào hoại tử, sau đó được phân giải thành các phân tử cfDNA khoảng 180 bp [3]. Nồng độ cfDNA biến động theo trạng thái sinh lý và bệnh lý khác nhau. Ở người khỏe mạnh, nồng độ cfDNA trong máu dao động 10 ng/mL - 30 ng/mL [2]. Trong khi đó, ở bệnh nhân ung thư, lượng cfDNA trong máu có thể đạt đến 180 ng/mL [2]. Nồng độ

cfDNA của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC) tăng gấp 4 lần so với người khỏe mạnh và 2,5 lần so với các bệnh nhân viêm đường hô hấp mãn tính [4]. Hơn nữa, nồng độ cfDNA tương quan chặt chẽ với giai đoạn bệnh và thể tích khối u [5]. Ngoài ra, nồng độ cfDNA tăng ở các trạng thái sinh lý, bệnh lý. Ví dụ như cfDNA ở phụ nữ có thai tăng khoảng 3 lần so với người không mang thai và có thể tăng đến 32 lần trong trường hợp tiền sản giật [6]. Sự gia tăng nồng độ cfDNA được giải thích bởi sự tăng cường giải phóng cfDNA từ tế bào, sự suy giảm khả năng loại bỏ cfDNA khỏi tuần hoàn và sự thay đổi hoạt tính của các DNase trong máu [1, 2].

Ngoài biến động về nồng độ, cfDNA còn có sự thay đổi về kích thước. cfDNA của bệnh nhân

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: phamthetung240895@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.5066>

ung thư dạ dày, vú, đại tràng, phổi có kích thước trung bình là 163 bp và ngắn hơn đáng kể so với cfDNA của người khỏe mạnh (166 bp) [7]. Ngoài ra, cfDNA của người khỏe mạnh có kích thước ổn định trong khi cfDNA của bệnh nhân ung thư có kích thước biến động rất nhiều và ngắn dần theo tiến triển của bệnh [7].

Tính toàn vẹn của cfDNA được xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau từ đơn giản đến phức tạp như PCR hay giải trình tự NGS [7] và thường được đánh giá thông qua tính toàn vẹn của các trình tự lặp như *LINE-1 (L1)*, *Alu* do chúng có số bản sao rất lớn ($>10^5$ /hệ gen) và phân bố rải rác trên khắp hệ gen [8]. Chỉ số toàn vẹn cfDNA (DNA integrity index - cfDI) được xác định phổ biến bằng tỷ lệ giữa số lượng đoạn DNA dài (>200 bp) và đoạn DNA ngắn (~ 100 bp), cả 2 đoạn thường được khuếch đại trên cùng 1 trình tự *Alu* [9, 10]. Đánh giá cfDI dựa trên trình tự *Alu* bằng real-time PCR (qPCR) ở bệnh nhân ung thư vú giai đoạn sớm, giai đoạn tiến triển và người khỏe mạnh cho thấy cfDI có xu hướng giảm dần, trong khi nồng độ cfDNA tăng dần tương ứng với mức độ tiến triển của bệnh [9]. Chỉ số cfDI xây dựng trên trình tự *Alu* (cfDI-*Alu*) được xem là chỉ thị phân tử hỗ trợ chẩn đoán ung thư và tiến triển của bệnh [11].

Nghiên cứu này đề cập đến thiết kế và khảo sát hệ số cfDI dựa vào trình tự lặp *LINE-1 (L1)* kết hợp với trình tự *Alu*. Số bản sao tổng thể của *L1* thay đổi rất lớn trong DNA hệ gen cũng như cfDNA ở các bệnh nhân ung thư. Ví dụ như có đến 18.739 bản *L1* chuyển vị (retrotransposition), chiếm đến 98% sự chuyển vị của các yếu tố DNA vận động, xảy ra ở hệ gen của 38 loại tế bào ung thư [12]. Vì thế, hệ số cfDI, xây dựng trên tỷ lệ giữa số lượng đoạn *Alu* dài và đoạn *L1* ngắn, sẽ phản ánh biến động rất lớn của cả hai loại DNA lặp này. Chỉ số cfDI mới của nghiên cứu, ký hiệu là cfDI-*Alu/L1*, được so sánh với hệ số truyền thống cfDI-*Alu* trên nhóm mẫu cfDNA của người khỏe mạnh và bệnh nhân ung thư phổi. Kết quả cho thấy hệ số cfDI-*Alu/L1* thể hiện giá trị AUC (diện tích dưới đường cong ROC) có khả năng phân biệt giữa mẫu ung thư và người khỏe mạnh, gợi ý tiềm năng trở thành chỉ thị phân tử không xâm lấn hỗ trợ sàng lọc ung thư phổi tại Việt Nam.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Mẫu DNA chuẩn của người (Human Genomic DNA) cung cấp bởi hãng Promega (Mã số: G3041) được pha loãng tạo thành các mẫu DNA chuẩn từ 1000 pg đến 1 pg và sử dụng để xây dựng đường chuẩn định lượng tuyệt đối số bản sao của *Alu* và *L1*.

Một mililít (1 mL) máu được thu nhận từ 127 người khỏe mạnh và 122 bệnh nhân ung thư phổi có đầy đủ thông tin giải phẫu bệnh từ Bệnh viện Quân y 175, Thành phố Hồ Chí Minh trong khoảng thời gian từ tháng 12 năm 2022 đến tháng 12 năm 2024. Mẫu máu được bảo quản trong ống chống đông K2-EDTA; được ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút để thu nhận 400 μ L huyết tương. Các mẫu huyết tương được lưu giữ tại nhiệt độ -80°C cho đến khi tách chiết cfDNA. Nghiên cứu tuân theo các vấn đề đạo đức được thông qua bởi Hội đồng Y đức theo quyết định số 01-2023/NCHG-HDDD.

2.2. Các môi đặc hiệu của *Alu* và *L1*

Cặp môi *Alu78* và *Alu205* được thiết kế trên trình tự bảo thủ của *AluY*, khuếch đại sản phẩm có kích thước lần lượt là 78 bp và 205 bp. Cặp môi *L88* được thiết kế dựa vào trình tự đầu 5'-UTR của *L1* (X58075) khuếch đại sản phẩm 88 bp. Trình tự môi, kích thước sản phẩm khuếch đại đã được công bố [13] và được trình bày trong Bảng 1.

2.3. Tách chiết cfDNA

Các mẫu huyết tương được rửa đông tuần tự qua hai bước nhằm hạn chế biến tính DNA: mẫu từ -80°C được giữ ở -20°C qua đêm, sau đó từ -20°C chuyển sang 4°C trong 15 phút trước khi tiến hành tách chiết cfDNA. Bốn trăm μ L huyết tương được sử dụng để tách chiết cfDNA tổng số bằng MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) tuân thủ theo quy trình của nhà sản xuất. cfDNA được thu nhận trong 50 μ L đệm của kit và lưu trữ ở nhiệt độ -20°C .

2.4. Xây dựng đường chuẩn sử dụng DNA chuẩn thương mại

Một dải nồng độ DNA chuẩn được pha loãng từ DNA người cung cấp bởi hãng Promega (Mã số: G3041). Dựa vào nồng độ xác định bằng hệ thống Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), lượng DNA từ 1000 pg đến 1 pg được sử dụng để xây dựng đường hồi quy tuyến tính nhằm kiểm tra hiệu suất khuếch đại (E value) và hệ số tuyến tính (R^2 value) của từng

cặp mồi và xác định các giá trị Ct ngưỡng (cut-off).

2.5. Phản ứng qPCR định lượng tuyệt đối số bản sao các trình tự *Alu*78, *Alu*205 và *L88*

Phản ứng qPCR sử dụng 1 μ L cfDNA làm khuôn và PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) với tổng thể tích 20 μ L cho một phản ứng. Thành phần và điều kiện qPCR được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 1. Trình tự các mồi khuếch đại đoạn *Alu* ngắn (*Alu*78), *Alu* dài (*Alu*205) và *L1* (*L88*) [13]

Tên mồi	Trình tự mồi (5' - 3')	Kích thước sản phẩm (bp)
<i>Alu</i> 78-F	cgggtgaaacccgtctctac	78
<i>Alu</i> 78-R	cgagtagctgggactacagg	
<i>Alu</i> 205-F	acgcctgtaatcccagcact	205
<i>Alu</i> 205-R	caagctccgcctcccgggt	
<i>L88</i> -F	gtaaggggttagggaggtttt	88
<i>L88</i> -R	aataacaataacccgattttccaaatac	

Bảng 2. Thành phần và điều kiện qPCR khuếch đại các trình tự *Alu* ngắn, *Alu* dài và trình tự *L1*

Khuếch đại trình tự <i>Alu</i> 78 bp		Khuếch đại trình tự <i>Alu</i> 205 bp		Khuếch đại trình tự <i>L1</i> 88 bp	
Thành phần	Thể tích (μ L)	Thành phần	Thể tích (μ L)	Thành phần	Thể tích (μ L)
H ₂ O	8,2	H ₂ O	8,4	H ₂ O	8,2
<i>Alu</i> 78-F (10 μ M)	0,4	<i>Alu</i> 205-F (10 μ M)	0,3	<i>L88</i> -F (10 μ M)	0,4
<i>Alu</i> 78-R (10 μ M)	0,4	<i>Alu</i> 205-R (10 μ M)	0,3	<i>L88</i> -R (10 μ M)	0,4
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2X	10,0	PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2X	10,0	PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2X	10,0
cfDNA	1,0	cfDNA	1,0	cfDNA	1,0
Tổng	20,0	Tổng	20,0	Tổng	20,0
Chu trình nhiệt: 50°C, 2 phút; 95°C, 2 phút; 40 chu kỳ (95°C, 15 giây; 60°C, 1 phút). Đọc tín hiệu ở bước kéo dài 60°C, 1 phút.					

3. Kết quả và thảo luận

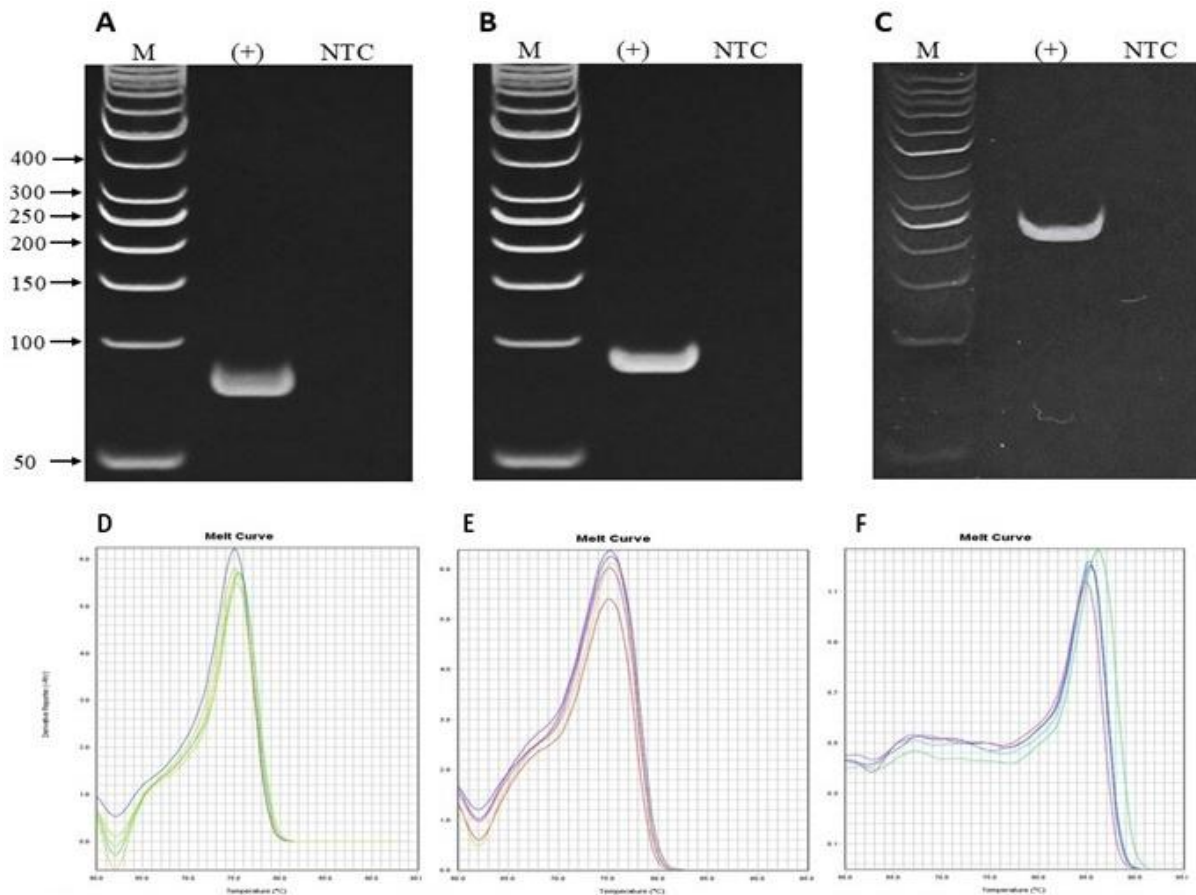
3.1. Tính đặc hiệu của các cặp mồi

Hai cặp mồi đặc hiệu khuếch đại trình tự *Alu* có kích thước 78 bp và 205 bp và cặp mồi *L88* khuếch đại trình tự vùng 5'-UTR của *L1* được trình bày trong Bảng 1. *Alu* và *L1* đều là các yếu tố DNA vận động có số bản sao rất lớn phân bố khắp hệ gen; vì vậy, cần phải xác định tính đặc hiệu của các cặp mồi cho phép khuếch đại 1 đoạn

DNA có kích thước đúng như thiết kế. Để khẳng định tính đặc hiệu của các cặp mồi, DNA chuẩn ở nồng độ 100 pg được làm khuôn cho phản ứng PCR, sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel polyacrylamide 8% (Hình 1A-C). Kết quả cho thấy chỉ có 1 băng DNA có kích thước như mong muốn và không có dimer. Tiếp đến, DNA chuẩn được pha loãng theo dải nồng độ từ 1000 pg đến 1 pg để làm khuôn trong phản ứng qPCR. Kết quả phân tích đường cong nóng chảy (melting

curve) trình bày trong Hình 1D-F cho thấy chỉ có 1 đỉnh và không có đỉnh phụ. Kết quả Hình 1 chứng tỏ điều kiện phản ứng đã tối ưu. Điều kiện

này được áp dụng để xây dựng đường chuẩn sử dụng trong định lượng tuyệt đối số bản sao của *Alu* và *L1* ở các mẫu cfDNA.

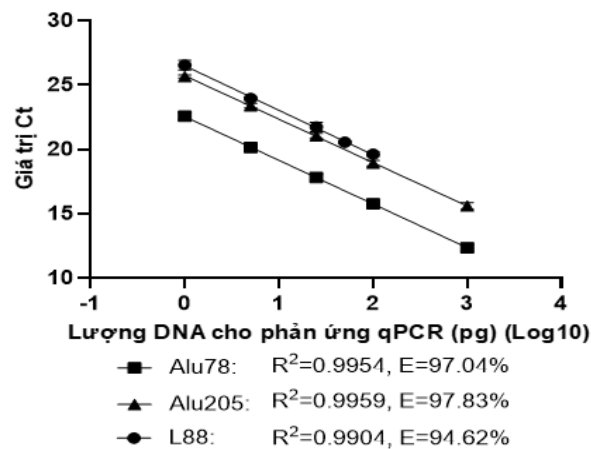


Hình 1. (A-C). Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của cặp mồi *Alu*78 (kích thước 78 bp) (A), cặp mồi *L88* (kích thước 88 bp) (B) và cặp mồi *Alu*205 (kích thước 205 bp) (C). (+): Mẫu 100 pg DNA chuẩn của người; NTC: Đối chứng âm. M: Marker 50 bp (Thermo Fisher Scientific). (D-F). Kết quả phân tích melting curve của sản phẩm qPCR khuếch đại DNA chuẩn nồng độ từ 1000 pg đến 1 pg với các cặp mồi *Alu*78 (D), *L88* (E) và *Alu*205 (F).

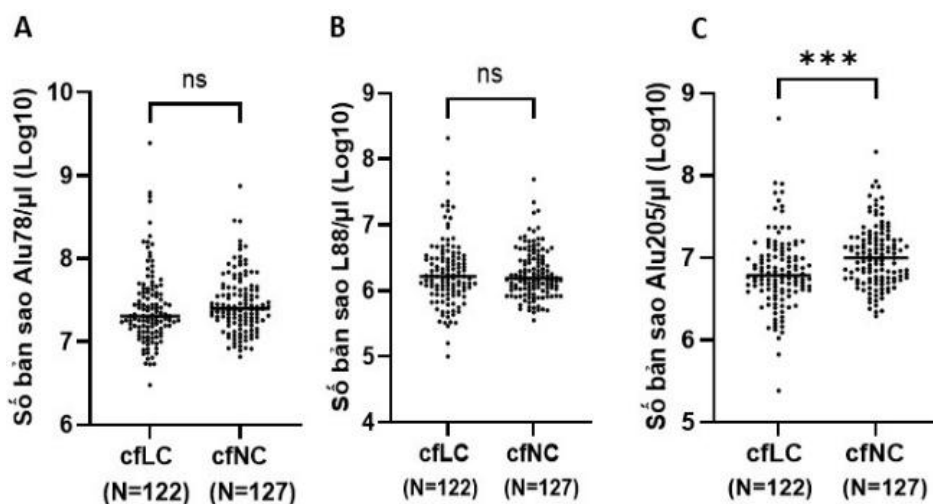
3.2. Xây dựng đường chuẩn sử dụng định lượng tuyệt đối số bản sao của *Alu*78, *Alu*205 và *L88*

Một μL DNA chuẩn nồng độ 1000 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg, 10 pg và 1 pg được sử dụng trong phản ứng qPCR với nồng độ các mồi và điều kiện như trong Bảng 2. Phản ứng qPCR được lặp lại ít nhất 3 lần. Đường chuẩn biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa các giá trị C_t và số bản sao của từng trình tự đích. Kết quả trình bày trên Hình 2 cho thấy đường chuẩn xây dựng

bởi mẫu DNA chuẩn đạt hiệu suất khuếch đại $E = 97,04\%$ và hệ số tuyến tính $R^2 = 0,995$ đối với trình tự *Alu* có kích thước 78 bp; $E = 97,83\%$ và $R^2 = 0,996$ đối với trình tự *Alu* có kích thước 205 bp và $E = 94,62\%$ và $R^2 = 0,99$ đối với trình tự *L1* có kích thước 88 bp. Kết quả này cho thấy phản ứng xảy ra với ba trình tự khuôn đều có hiệu suất khuếch đại và hệ số tuyến tính tốt, đáp ứng yêu cầu cho việc định lượng tuyệt đối số bản sao của trình tự *Alu* ngắn, trình tự *Alu* dài và trình tự *L1* trong mẫu cfDNA.



Hình 2. Đường chuẩn được xây dựng từ kết quả qPCR với các cặp mồi Alu78, Alu205 và L88, sử dụng dải pha loãng DNA chuẩn của người làm khuôn, với lượng DNA từ 1000 pg đến 1 pg. Các giá trị hiệu suất khuếch đại (E) và hệ số tuyến tính (R^2) được xác định bằng phân tích hồi quy tuyến tính đơn. Phản ứng qPCR được lặp lại tối thiểu ba lần cho mỗi lượng DNA khuôn.



Hình 3. So sánh giá trị định lượng *Alu* và *L1* trong các mẫu cfDNA. Số bản sao Alu78 (A), L88 (B) và Alu205 (C) trong 1 μ L cfDNA của bệnh nhân ung thư phổi (cfLC) và người khỏe mạnh (cfNC). Kiểm định Mann-Whitney U được sử dụng trong phân tích thống kê. (ns): $P > 0,05$; (***): $P < 0,001$.

3.3. Định lượng tuyệt đối số bản sao của *Alu*78, *Alu*205 và *L88*

Số bản sao Alu78, L88 và Alu205 trong 1 μ L cfDNA tách chiết từ 400 μ L huyết tương được định lượng tuyệt đối dựa vào đường chuẩn. Số bản sao được quy đổi từ lượng DNA dựa trên giả định bộ gen lưỡng bội của người có khối lượng 6,5 pg và chứa 10^6 bản sao trình tự *Alu* và $5 \times$

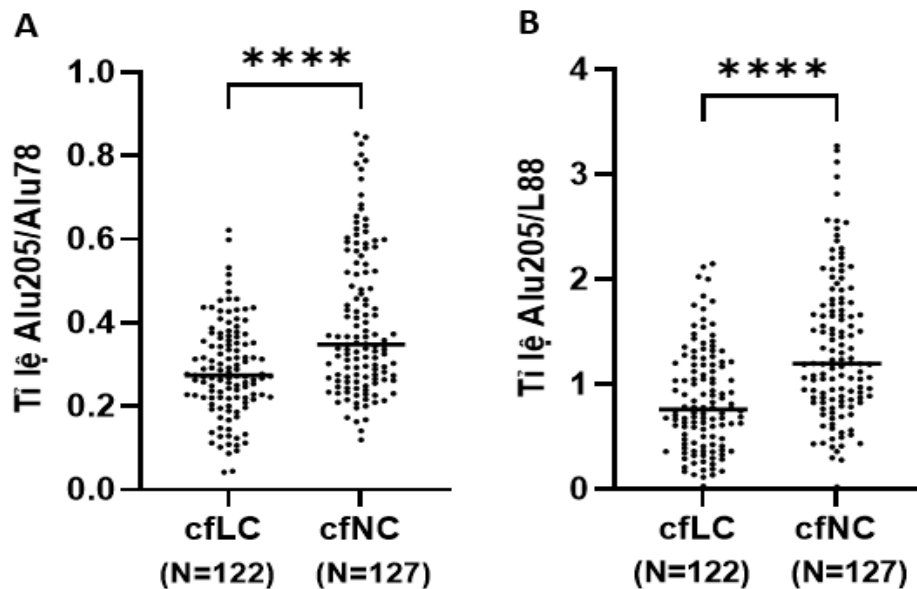
10^5 bản sao trình tự *L1* [8]. Kết quả cho thấy số bản sao Alu78 và L88 ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi không cao hơn nhóm người khỏe mạnh ($P > 0,05$) (Hình 3A, B). Số bản sao trình tự Alu78 và L88 ở 1 μ L cfDNA của người khỏe mạnh có giá trị tương ứng $2,51 \times 10^7$ và $1,54 \times 10^6$ (Hình 3). Tương tự, số bản sao trình tự Alu78 và L88 ở 1 μ L cfDNA của bệnh nhân ung thư phổi có giá trị tương ứng $2,04 \times 10^7$ và $1,66 \times 10^6$ (Hình 3).

Tuy nhiên, số bản sao Alu205, đại diện cho các đoạn cfDNA có kích thước lớn và tính toàn vẹn của cfDNA, có xu hướng trái ngược ở hai nhóm cfDNA từ người khỏe mạnh và bệnh nhân ung thư phổi. Số bản sao Alu205 giảm trong nhóm bệnh nhân ung thư phổi so với nhóm người khỏe mạnh ($6,14 \times 10^6$ vs $1,01 \times 10^7$, $P = 0,0001$) (Hình 3C).

3.4. Xác định hệ số cfDI theo tỷ lệ Alu205/Alu78 và Alu205/L88

Từ kết quả định lượng tuyệt đối Alu78, L88 và Alu205, hệ số cfDI gồm cfDI-Alu và cfDI-

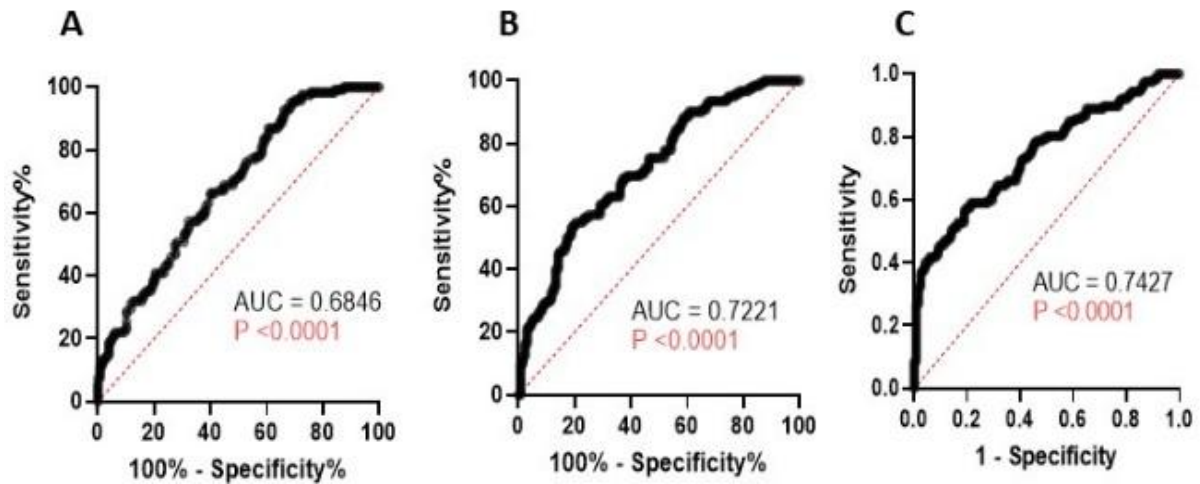
Alu/L1 được tính toán bằng tỷ lệ số bản sao Alu205/Alu78 và Alu205/L88 nhằm đánh giá mức độ toàn vẹn của cfDNA trong huyết tương. Kết quả cho thấy cfDI-Alu ở nhóm bệnh nhân ung thư phổi thấp hơn nhóm người khỏe mạnh với trung vị là 0,27 so với 0,35 ($P < 0,0001$) (Hình 4A). Chỉ số cfDI-Alu/L1 ở bệnh nhân ung thư phổi thấp hơn nhóm người khỏe mạnh với trung vị là 0,76 so với 1,20 ($P < 0,0001$) (Hình 4B). Kết quả này phù hợp với sự gia tăng mức độ phân mảnh cfDNA trong huyết tương bệnh nhân ung thư phổi.



Hình 4. Giá trị cfDI-Alu (A) và cfDI-Alu/L1 (B) ở cfDNA của người khỏe mạnh (cfNC) và bệnh nhân ung thư phổi (cfLC). Kiểm định Mann-Whitney U được sử dụng trong phân tích thống kê. (****): $P < 0,0001$.

Để đánh giá khả năng phân biệt bệnh nhân ung thư phổi và người khỏe mạnh của hai hệ số cfDI-Alu và cfDI-Alu/L1, phân tích ROC được thực hiện trên toàn bộ 122 bệnh nhân ung thư phổi và 127 người khỏe mạnh. Kết quả cho thấy cfDI-Alu có giá trị phân biệt hai nhóm với AUC là 0,69 và 95% CI: 0,61-0,75 ($P < 0,0001$) (Hình 5A). Hệ số cfDI-Alu/L1 có giá trị AUC là 0,72 và 95% CI: 0,66-0,78 ($P < 0,0001$) (Hình 5B). Kết hợp hai hệ số này cho giá trị AUC là 0,74 và 95% CI: 0,68-0,80 ($P < 0,0001$) (Hình 5C).

Mối liên hệ giữa hệ số cfDI-Alu và cfDI-Alu/L1 với đặc điểm mô bệnh học của bệnh nhân ung thư phổi được trình bày trong Bảng 3. Cả hai hệ số đều chưa ghi nhận mối liên hệ có ý nghĩa thống kê với tuổi, giới tính, giai đoạn bệnh và loại ung thư (tế bào nhỏ & không tế bào nhỏ). Lưu ý rằng phân tích theo giai đoạn bệnh được thực hiện trên 97/122 bệnh nhân có đầy đủ thông tin, chủ yếu thuộc giai đoạn III và IV. Kết quả này khác với một số nghiên cứu trước [7] có thể do cỡ mẫu hoặc do hầu hết bệnh nhân đều ở giai đoạn III và IV.



Hình 5. Phân tích ROC của cfDI-Alu (tính theo tỷ lệ Alu205/Alu78) (A), cfDI-Alu/L1 (tính theo tỷ lệ Alu205/L88) (B) và panel kết hợp hai hệ số (C).

Bảng 3. Mối liên hệ giữa hệ số cfDI-Alu và cfDI-Alu/L1 với đặc điểm nhân khẩu học, mô bệnh học của bệnh nhân ung thư phổi. KTBN: ung thư phổi không tế bào nhỏ; TBN: ung thư phổi tế bào nhỏ.

NI: Không có thông tin. Giá trị P: được tính toán khi sử dụng kiểm định Mann-Whitney U

Đặc điểm	cfDI-Alu			cfDI-Alu/L1		
	Số mẫu (N)	Trung vị	P	Số mẫu (N)	Trung vị	P
Tuổi						
≥ 60	71	0,28	0,339	71	0,81	0,152
< 60	51	0,26		51	0,68	
Giới tính						
Nam	72	0,27	0,603	72	0,78	0,388
Nữ	50	0,27		50	0,68	
Giai đoạn bệnh						
III	12	0,27	0,346	12	0,82	0,450
IV	85	0,29		85	0,73	
NI	25			25		
Loại ung thư						
KTNB	117	0,27	0,557	117	0,75	0,202
TBN	5	0,25		5	1,19	

Thể tích huyết tương nhiều hơn 5 mL được yêu cầu để tách cfDNA đáp ứng cho các kỹ thuật phân tích gen đơn bản. Điều này được tháo gỡ khi phân tích các trình tự lặp có số bản sao lớn trong hệ gen [8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ sử dụng 1 mL để thu nhận 400 μ L huyết tương. Năm mươi μ L cfDNA thu được theo hướng dẫn của kit tách chiết thương mại đủ dùng cho nhiều phân tích với trình tự *Alu* và *L1*. Do các trình tự *Alu* và *L1* chiếm đến gần 1/3 hệ gen

nên chúng được xem là đại diện cho DNA hệ gen [8]. Vì thế, định lượng số bản sao của các trình tự lặp này được sử dụng phổ biến để xác định lượng cfDNA trong máu [14]. Điều quan trọng hơn, do tính chất của cfDNA có nồng độ tăng nhưng bị đứt gãy nhiều trong máu người bị bệnh nên tính toàn vẹn của cfDNA được đánh giá thông qua định lượng số bản sao có kích thước lớn, thường khoảng 200 bp để đáp ứng tiêu chí của kỹ thuật định lượng real-time PCR [15] và

số bản sao có kích thước nhỏ đại diện cho sự đứt gãy của cfDNA [7]. Hệ số cfDI-Alu đã được sử dụng để phân biệt bệnh nhân ung thư với người khỏe mạnh và để đánh giá giai đoạn tiến triển của ung thư [4, 7, 9].

Nghiên cứu này đưa ra một hệ số cfDI mới kết hợp định lượng số bản sao của 2 trình tự lặp *Alu* và *L1*. Bên cạnh hệ số cfDI-Alu, hệ số cfDI-L1 đã được xây dựng căn cứ vào số bản sao đoạn *L1* có kích thước 266 bp khuếch đại ở vùng 5'-UTR và số bản sao của đoạn *L1* có kích thước 97 bp khuếch đại ở vùng 3'-UTR của trình tự lặp *L1* (cfDI-L266/L97) [16]. Hệ số này có giá trị tiềm năng trong chẩn đoán sớm ung thư vú với AUC = 0,80. Trong nghiên cứu này, tuy chưa có ý nghĩa thống kê nhưng số bản sao của *L1* (88 bp) có xu thế tăng hơn số bản sao *Alu* (78 bp) ở cfDNA bệnh nhân ung thư phổi. Kết quả chỉ ra giá trị AUC của hệ số truyền thống cfDI-Alu = 0,69 (Hình 5), tương đương với AUC của cfDI-Alu = 0,69 trong nghiên cứu của Bortul & cs. [16]. Tuy nhiên, giá trị AUC của hệ số cfDI-Alu/L1 (0,72) cao hơn so với cfDI-Alu gợi ý cần mở rộng cỡ mẫu nghiên cứu để đánh giá sâu hơn giá trị hỗ trợ chẩn đoán của hệ số mới này đối với ung thư phổi ở Việt Nam.

Mặc dù kết quả cho thấy tiềm năng của các chỉ thị phân tử cfDI-Alu, cfDI-Alu/L1 trong chẩn đoán ung thư phổi không xâm lấn, nghiên cứu này vẫn còn một số hạn chế cần được khắc phục. Thứ nhất, mẫu phân tích sử dụng chỉ được thu thập tại một cơ sở y tế duy nhất nên chưa có tính đại diện cao cho các bệnh nhân mắc ung thư phổi tại Việt Nam. Thứ hai, nhóm chứng được sử dụng trong nghiên cứu hoàn toàn là người khỏe mạnh, chưa bao gồm các bệnh nhân mắc các bệnh phổi lành tính nên chưa phản ánh đúng bối cảnh sàng lọc thực tế. Bên cạnh đó, các bệnh nhân ung thư phổi trong nghiên cứu đều ở giai đoạn muộn (giai đoạn III và IV), vì vậy khả năng phát hiện ung thư phổi giai đoạn sớm của cfDI-Alu, cfDI-Alu/L1 chưa được đánh giá đầy đủ. Do đó, nghiên cứu cần được mở rộng số lượng mẫu, thu thập từ nhiều cơ sở y tế khác nhau, bổ sung các bệnh nhân ung thư phổi ở giai đoạn sớm hơn I và II, đồng thời bổ sung nhóm mẫu chứng gồm các bệnh nhân mắc các bệnh phổi lành tính

như các bệnh phổi mãn tính, viêm phổi, lao phổi hay các nốt phổi lành tính. Ngoài ra, việc bổ sung phân tích thêm tập mẫu xác nhận độc lập là cần thiết nhằm đánh giá chính xác khả năng chẩn đoán và phản ánh tiến triển bệnh của cfDI-Alu và cfDI-Alu/L1 ở bệnh nhân ung thư phổi tại Việt Nam.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết kế thành công và khảo sát được tiềm năng sử dụng của hệ số cfDI-Alu/L1 khi so sánh với hệ số cfDI-Alu truyền thống trong việc đánh giá tính toàn vẹn của cfDNA trong máu ngoại vi.

Lời cảm ơn

Các tác giả trân trọng cảm ơn Phòng thí nghiệm Sinh Y, Bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Tài liệu tham khảo

- [1] D. S. C. Han, Y. M. D. Lo, The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology, Trends in Genetics, Vol. 37, No. 8, 2021, pp. 758-770, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.04.005>.
- [2] Y. Y. Yan, Q. R. Guo, F. H. Wang, R. Adhikari, Z. Y. Zhu, H. Y. Zhang, W. M. Zhou, H. Yu, J. Q. Li, J. Y. Zhang, Cell-Free DNA: Hope and Potential Applications in Cancer, Frontiers in Cell and Developmental Biology, Vol. 9, 2021, 639233, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.639233>.
- [3] R. Koyama, T. Arai, M. Kijima, S. Sato, S. Miura, M. Yuasa, D. Kitamura, R. Mizuta, DNase γ , DNase I and Caspase-Activated DNase Cooperate to Degrade Dead Cells, Genes to Cells, Vol. 21, No. 11, 2016, pp. 1150-1163, <https://doi.org/10.1111/gtc.12433>.
- [4] A. Szpechcinski, J. Chorostowska-Wynimko, R. Struniawski, W. Kupis, P. Rudzinski, R. Langfort, E. Puscinska, P. Bielen, P. Sliwinski, T. Orlowski, Cell-Free DNA Levels in Plasma of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer and Inflammatory Lung Disease, British Journal of Cancer, Vol. 113, No. 3, 2015, pp. 476-483, <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.225>.

- [5] M. H. Hyun, E. S. Lee, J. S. Eo, S. Kim, E. J. Kang, J. S. Sung, Y. J. Choi, K. H. Park, S. W. Shin, S. Y. Lee, Y. H. Kim, Clinical Implications of Circulating Cell-Free DNA Quantification and Metabolic Tumor Burden in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer, *Lung Cancer*, Vol. 134, 2019, pp. 158-166, <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.06.014>.
- [6] X. Y. Zhong, H. Laivuori, J. C. Livingston, O. Ylikorkala, B. M. Sibai, W. Holzgreve, S. Hahn, Elevation of Both Maternal and Fetal Extracellular Circulating Deoxyribonucleic Acid Concentrations in the Plasma of Pregnant Women with Preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Vol. 184, No. 3, 2001, pp. 414-419, <https://doi.org/10.1067/mob.2001.109594>.
- [7] S. Cristiano, A. Leal, J. Phallen, J. Fiksel, V. Adleff, D. C. Bruhm, et al., Genome-Wide Cell-Free DNA Fragmentation in Patients with Cancer, *Nature*, Vol. 570, No. 7761, 2019, pp. 385-389, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1272-6>.
- [8] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, et al., Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome, *Nature*, Vol. 409, No. 6822, 2001, pp. 860-921, <https://doi.org/10.1038/35057062>.
- [9] D. Madhavan, M. Wallwiener, K. Bents, M. Zucknick, J. Nees, S. Schott, K. Cuk, S. Riethdorf, A. Trumpp, K. Pantel, C. Sohn, A. Schneeweiss, H. Surowy, B. Burwinkel, Plasma DNA Integrity as a Biomarker for Primary and Metastatic Breast Cancer and Potential Marker for Early Diagnosis, *Breast Cancer Research and Treatment*, Vol. 146, No. 1, 2014, pp. 163-174, <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2946-2>.
- [10] A. Huang, X. Zhang, S. L. Zhou, Y. Cao, X. W. Huang, J. Fan, X. R. Yang, J. Zhou, Plasma Circulating Cell-Free DNA Integrity as a Promising Biomarker for Diagnosis and Surveillance in Patients with Hepatocellular Carcinoma, *Journal of Cancer*, Vol. 7, No. 13, 2016, pp. 1798-1803, <https://doi.org/10.7150/jca.15618>.
- [11] M. T. Teymorloei, L. Alizadeh, S. Matin, T. J. Koshki, A. Karimi, Diagnostic and Prognostic Significance of ALU-Based Cell-Free DNA in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Frontiers in Oncology*, Vol. 14, 2024, 1398062, <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1398062>.
- [12] B. R. Martin, E. G. Alvarez, A. Baez-Ortega, J. Zamora, F. Supek, J. Demeulemeester, et al., Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Identifies Driver Rearrangements Promoted by LINE-1 Retrotransposition, *Nature Genetics*, Vol. 52, No. 3, 2020, pp. 306-319, <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0562-0>.
- [13] T. T. Q. Tran, T. T. Pham, T. T. Nguyen, T. H. Do, P. T. T. Luu, U. Q. Nguyen, L. D. Vuong, Q. N. Nguyen, S. V. Ho, H. V. Dao, T. V. Hoang, L. T. T. Vo, An Appropriate DNA Input for Bisulfite Conversion Reveals LINE-1 and Alu Hypermethylation in Tissues and Circulating Cell-Free DNA from Cancers, *PLOS ONE*, Vol. 19, No. 12, 2024, e0316394, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316394>.
- [14] X. Lou, Y. Hou, D. Liang, L. Peng, H. Chen, S. Ma, L. Zhang, A Novel Alu-Based Real-Time PCR Method for the Quantitative Detection of Plasma Circulating Cell-Free DNA: Sensitivity and Specificity for the Diagnosis of Myocardial Infarction, *International Journal of Molecular Medicine*, Vol. 35, No. 1, 2015, pp. 72-80, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1991>.
- [15] B. Thornton, C. Basu, Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, Vol. 39, No. 2, 2011, pp. 145-154, <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>.
- [16] M. Bortul, F. Giudici, D. Tierno, D. Generali, S. Scomersi, G. Grassi, C. Bottin, M. R. Cappelletti, F. Zanconati, B. Scaggianti, A Case-Control Study by ddPCR of ALU 260/111 and LINE-1 266/97 Copy Number Ratio in Circulating Cell-Free DNA in Plasma Revealed LINE-1 266/97 as a Potential Biomarker for Early Breast Cancer Detection, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 24, No. 10, 2023, 8520, <https://doi.org/10.3390/ijms24108520>.