

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN**

HÀ NỘI - 2025

1. **Linh Thuy Duong, Trang Thuy Dao, Hoai Thi Bui, Ung Dinh Nguyen, Ung Tien Hoang, Duc Viet Tran, Ba Van Nguyen, and Tho Huu Ho** (2024). “Innovative Semi-Nested Realtime PCR Assay with Extendable Blocking Probe for Enhanced Analysis of *SEPT9* Methylation in Colorectal Cancer”. *Biomedicine*, 12, 1458. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071458>.
2. **Dương Thuỳ Linh, Nguyễn Văn Ba, Hồ Hữu Thọ** (2024). “Nghiên cứu phát hiện methyl hoá gen *SEPT9* ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng bằng phương pháp Semi – Nested PCR phân tích phổ tuyến tính”. *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 545, tháng 12, số chuyên đề 2024, tr 488 - 497.
3. **Dương Thuỳ Linh, Vũ Anh Hải, Nguyễn Văn Hùng, Hồ Hữu Thọ, Nguyễn Văn Ba** (2025). “Nghiên cứu giá trị của methyl hoá gen *SEPT9* huyết tương trong chẩn đoán ung thư đại trực tràng”. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*, tập 50, số 5/2025, tr 97 – 106. ISSN 1859 – 0748. <https://doi.org/10.56535/jmpm.v50i5.1266>
4. **Dương Thuỳ Linh, Hồ Viết Hoàn, Nguyễn Khánh Vân, Hồ Hữu Thọ, Nguyễn Văn Ba** (2025). “Nghiên cứu đặc điểm methyl hoá gen *SEPT9* huyết tương trước và sau phẫu thuật triệt căn ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng giai đoạn III”. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*, tập 50, số 6/2025, tr 100 – 108. ISSN 1859 – 0748. <https://doi.org/10.56535/jmpm.v50i6.1276>.

Article

Innovative Semi-Nested Realtime PCR Assay with Extendable Blocking Probe for Enhanced Analysis of *SEPT9* Methylation in Colorectal Cancer

Linh Thuy Duong ¹, Trang Thuy Dao ², Hoai Thi Bui ² , Ung Dinh Nguyen ², Ung Tien Hoang ³, Duc Viet Tran ¹, Ba Van Nguyen ¹ and Tho Huu Ho ^{2,*} 

¹ Oncology Center, 103 Military Hospital, Vietnam Military Medical University, Hanoi 10000, Vietnam; bsduonglinh103@gmail.com (L.T.D.); tranduc170195@gmail.com (D.V.T.); bsnguyenvanba@yahoo.com (B.V.N.)

² Department of Genomics and Cytogenetics, Institute of Biomedicine and Pharmacy (IBP), Vietnam Military Medical University, Hanoi 10000, Vietnam; daothuytrang_t63@hus.edu.vn (T.T.D.); buithihoai2704@gmail.com (H.T.B.); dr.ungd4.vmmu@gmail.com (U.D.N.)

³ Department of Rehabilitation, 103 Military Hospital, Vietnam Military Medical University, Hanoi 10000, Vietnam; bshoangtienungbvqy103@gmail.com

* Correspondence: hohuutho@vmmu.edu.vn; Tel.: +84-916-9327-68

Abstract: (1) Background: The detection of methylated *SEPT9* (m*SEPT9*) in plasma is a promising approach to non-invasive colorectal cancer (CRC) screening. Traditional approaches have limitations in sensitivity and cost-effectiveness, particularly in resource-limited settings. (2) Methods: We developed a semi-nested realtime PCR assay utilizing extendable blocking probes (ExBP) to enhance the detection of low-level m*SEPT9* based on DNA melting. This assay allows for the discrimination of m*SEPT9* in the presence of high concentrations of non-methylated *SEPT9* (up to 100,000 times higher).

(3) Results: The assay demonstrated a sensitivity of 73.91% and specificity of 80%, showcasing its ability to detect very low levels of methylated DNA effectively. The innovative use of ExBP without costly modified probes simplifies the assay setup and reduces the overall costs, enhancing its applicability in diverse clinical settings. (4) Conclusions: This novel assay significantly improves the detection of m*SEPT9*, offering a potential advance in CRC screening and monitoring. Its cost-efficiency and high sensitivity make it particularly suitable for the early detection and management of CRC, especially in settings with limited resources. Future studies are encouraged to validate this assay in larger populations to establish its clinical benefits and practical utility.

Keywords: colorectal cancer; *SEPT9* methylation; DNA melting; semi-nested PCR; extendable blocking probe; cell-free DNA; early cancer detection; cancer monitoring



Citation: Duong, L.T.; Dao, T.T.; Bui, H.T.; Nguyen, U.D.; Hoang, U.T.; Tran, D.V.; Nguyen, B.V.; Ho, T.H.

Innovative Semi-Nested Realtime PCR Assay with Extendable Blocking Probe for Enhanced Analysis of *SEPT9* Methylation in Colorectal Cancer. *Biomedicines* **2024**, *12*, 1458. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071458>

Academic Editor: Veronique Baud

Received: 13 May 2024

Revised: 20 June 2024

Accepted: 25 June 2024

Published: 1 July 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) continues to be a major global health challenge, accounting for over 9.3% of all cancer-related deaths worldwide [1]. As the third most frequently diagnosed cancer and the second leading cause of cancer-related deaths, CRC resulted in approximately 1.9 million new cases and 0.9 million deaths globally in 2020 [2]. Despite advancements in detection and treatment, it is estimated that by 2030, the incidence of CRC will rise by 60%, leading to 2.2 million new cases and 1.1 million deaths annually [2]. Early detection remains crucial for improving survival rates, which can be as high as 90% at stage I but plummet to as low as 15% by stage IV [3].

Currently, approximately 25% of CRC cases are diagnosed at metastatic stages, underscoring the urgent need for effective early detection tools [4]. Although colonoscopy is the gold standard for CRC screening due to its high sensitivity and specificity [5], its invasiveness, high cost, and complexity limit its suitability as a universal screening tool.

This has led to significant interest in developing non-invasive diagnostic tests that can enhance early detection and reduce unnecessary invasive procedures [6].

The first FDA-approved, blood-based test for CRC screening detects methylated DNA sequences of the *SEPT9* gene, highlighting its potential as a crucial biomarker for early CRC detection [7]. This test, known as the Epi proColon[®] 2.0, has demonstrated its ability to detect CRC with a sensitivity of 80.6% and specificity of 96.9% [8]. However, its sensitivity for early-stage CRC (stages I and II) remains at 41.1% and 72%, respectively [9]. These figures suggest that while m*SEPT9* is a promising marker, its high sensitivity is more pronounced in stages III and IV rather than in the early stages. This indicates significant opportunities to enhance its detection accuracy, particularly for early-stage CRC, where intervention is most beneficial. Therefore, m*SEPT9* holds promise as a less invasive and more cost-effective diagnostic method. Enhancing its efficacy for early diagnosis could significantly improve outcomes and reduce the reliance on invasive procedures such as colonoscopy.

Enhancing sensitivity and specificity in CRC screening and early detection is crucial. This advancement not only relies on selecting or combining various methylation markers but also on developing advanced methodologies for analyzing methylated DNA. The Epi proColon[®] 2.0 kit utilizes the HeavyMethyl method, which incorporates non-extendable blocking probes to enhance the selective amplification of methylated DNA while minimizing the amplification of unmethylated DNA. These non-extendable blocking probes aim to restrict the amplification of wild-type alleles (unmethylated DNA) by blocking potential priming sites on the wild-type template, which reduces mispriming. However, these probes often show limitations due to their binding inefficiency to the adenine and thymine-rich sequences typical of post-bisulfite converted unmethylated DNA, leading to suboptimal blocking and occasional non-specific amplifications.

In response, our recent development of extendable blocking probe (ExBP) technology has shown remarkable improvements over traditional non-extendable probes in preventing mispriming [10]. ExBP technology employs a novel approach that not only hybridizes to the wildtype sequence (e.g., post-bisulfite converted unmethylated DNA) to form a duplex but also initiates primer extension to form a more stable hybrid. This increased stability significantly enhances the assay's selectivity by effectively blocking potential mispriming sites and reducing false amplification signals. Our research group has successfully demonstrated that this innovative method can prevent primer binding to wildtype alleles and detect mutant alleles, even in scenarios where wildtype alleles are present at concentrations 1000–10,000 times higher. This marked improvement in sensitivity and specificity underscores the potential of ExBP technology to transform CRC screening by detecting low-abundance methylated DNA with unprecedented accuracy.

By integrating the proven effectiveness of extendable blocking probes (ExBP) into the semi-nested realtime PCR assay, we aim to refine the analysis of *SEPT9* methylation (m*SEPT9*) in CRC. Unlike non-extendable blocking probes that require nucleotide modifications, ExBP functions as part of a standard primer without modification. This approach not only simplifies the assay design but also reduces costs, making it particularly suitable for settings with limited resources. Furthermore, the semi-nested PCR format enhances the sensitivity of the assay, enabling the detection of extremely low concentrations of tumor-derived cell-free DNA in the plasma. This combination of cost-efficiency and high sensitivity holds substantial promise for improving early CRC detection and management.

2. Materials and Methods

2.1. Study Participants

Participants were recruited from the 103 Military Hospital and the Vietnam National Cancer Hospital over a period spanning January 2021 to December 2023. The study was designed to collect blood plasma samples from a total of 96 individuals, aiming at a comprehensive evaluation of the novel semi-nested realtime PCR assay for the detection of circulating m*SEPT9*. This group included 46 CRC patients, stratified by disease stage to

enhance understanding of the assay’s performance across the disease spectrum, with 36 patients at stages I to III and 10 at stage IV. The remaining 50 participants served as healthy controls, ensuring a balanced evaluation of the assay’s specificity and sensitivity.

Table 1 presents the demographic and clinical characteristics of the blood plasma sample providers, segregating data between cancer patients across various stages and healthy individuals. This structured approach allowed for an effective assessment of the assay’s efficacy in detecting mSEPT9 at different stages of CRC and facilitated a comparative analysis with findings from healthy controls.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of plasma sample donors ($n = 96$).

Diagnosis Cancer	Colorectal ($n =$	Healthy Controls ($n = 50$)
Sex		
Male	25	21
Female	21	29
Age (years)		
<55	15	32
55–70	26	18
≥70	5	0
Cancer stage		
I	5	-
II	7	-
III	24	-
IV	10	-

All participants were thoroughly informed about the research objectives and the nature of the study, and they voluntarily agreed to participate. This ensured a robust framework for the analysis of the results, supporting the validity and reliability of the study findings.

2.2. Sample Collection and Processing

Blood collection: Approximately 10 mL of venous blood was drawn from a different set of participants using K2 EDTA tubes to prevent clotting. The blood samples were processed within six hours to separate plasma, which was then stored at -80°C .

DNA extraction and quality assessment: DNA was extracted from the plasma using the QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The quantity and quality of the extracted DNA from both sources were assessed using a Nanodrop spectrophotometer to ensure suitability for further analysis.

Bisulfite conversion: The extracted DNA underwent bisulfite treatment using the EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). This treatment converts unmethylated cytosine to uracil (read as thymine during amplification) while leaving methylated cytosines unchanged. This step is crucial for the subsequent methylation-specific analyses.

2.3. Preparation of Standard DNA Samples

For the development and validation of our novel semi-nested realtime PCR assay, we prepared synthetic DNA calibrators to simulate bisulfite-converted sequences of the SEPT9 gene. These calibrators were synthesized in two distinct forms: methylated and unmethylated versions of the SEPT9 gene. The methylated DNA calibrators were synthesized in such a way that the cytosine residues at CpG sites were retained as cytosine, reflecting their methylated status. Conversely, the unmethylated DNA calibrators were also synthesized with cytosine at CpG sites but subsequently underwent bisulfite conversion, a process that converts all unmethylated cytosines to uracil. During PCR amplification, uracil is read as thymine, thus mimicking the chemical alterations that occur in bisulfite-treated DNA.

To accurately evaluate the assay's sensitivity across a range of methylation levels, we prepared standard samples by mixing a constant concentration of unmethylated *SEPT9* DNA (10^6 copies/ μ L) with varying concentrations of methylated *SEPT9* DNA. These mixtures were specifically designed to achieve methylated/unmethylated ratios of 10:1, 1:1, and extending to as low as 1:100,000. By establishing this gradient of methylation within the samples, we enabled precise quantification of the assay's responsiveness to different levels of DNA methylation.

2.4. Semi-Nested Realtime PCR

The semi-nested realtime PCR assay designed for m*SEPT9* detection employs a two-round amplification process to ensure high specificity and sensitivity.

First-round amplification: In this round, the reaction mixture includes $1\times$ HTOne MaX qPCR Green master mix (HT Biotec, Ho Chi Minh, Vietnam) and primers as detailed in Table 2. At the 5' end, these primers include artificially engineered sequences (underlined) to enhance the amplification of AT-rich sequences. Simultaneously, their 3' ends are specifically designed to anneal to non-CpG-containing sequences of the *SEPT9* gene, facilitating the co-amplification of both methylated and unmethylated DNA sequences. Amplification is initiated in an Applied Biosystems 9800 FAST Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a denaturation step at 95 °C for 15 min, followed by nine cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, annealing at 50 °C for 60 s, and extension at 72 °C for 30 s. This is followed by 13 additional cycles with annealing and extension at 68 °C for 60 s. The amplified products are then diluted 20 times, and 5 μ L of this solution is used for the second amplification round.

Table 2. Primer sequences for semi-nested realtime PCR.

Primers	Sequence	Amplification Round	Final Concentration
<i>SEPT9_Fo</i>	<u>CGACGTAAAA</u> CGACGGCCAGT- CAACCCAACACCCACCT	First round	0.1 μ M
<i>SEPT9_R</i>	<u>CACACAGGAAAC</u> AGCTATGACCATG- GATTCGTTGTTTATTAGTTATTATGT		0.1 μ M
<i>SEPT9/Fi</i>	<u>TGGATTTTGTGGTTAATGT</u> - AAATAATCCCATCCAATA	Second round	0.1 μ M
<i>SEPT9_Ri</i>	CACACAGGAAACAGCTATGACCATG		0.2 μ M
Forward primer	AATCCGAAATAATCCCATCCAATA	Quantification of total <i>SEPT9</i> levels	0.1 μ M

Note: Underlined sequences in the primers *SEPT9_Fo* and *SEPT9_Ro* are artificially engineered sequences designed to enhance the amplification of AT-rich sequences. The primers *SEPT9/Fi* include the ExBP sequence underlined to selectively enrich for methylated DNA.

Second round amplification: The reaction mixture for the second round includes $1\times$ HTOne MaX qPCR Green master mix and primers as detailed in Table 2. The primers are *SEPT9/Fi* with the ExBP sequence underlined to selectively enrich for methylated DNA and *SEPT9_Ri*. The reverse primer *SEPT9_Ri* used in the second round is identical to the sequence at the 5' end of the primer *SEPT9_Ro* used in the first round, thus maintaining the semi-nested nature of the PCR. This round is performed using the Rotor-Gene Q instrument (Qiagen, Hilden, Germany) with an initial denaturation at 95 °C for 15 min, followed by one cycle at 94 °C for 15 s, 56 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, then 45 cycles at 94 °C for 15 s and 74 °C for 30 s. After the standard amplification cycles, a DNA melting curve analysis is performed to determine the melting temperature peaks of the PCR products at 78.0–78.7 degrees Celsius. Each sample is tested in triplicate, and a sample is deemed positive for m*SEPT9* if at least one of the three replicates shows a positive result, evidenced by the characteristic melting temperature peaks in the DNA melting curve analysis.

Quantification of total *SEPT9* levels: To ensure accurate interpretation of the methylation analysis, concurrent quantification of total *SEPT9* gene levels is executed alongside

the methylation-specific testing. Total *SEPT9* gene levels are quantified in a parallel PCR reaction using the same reverse primer *SEPT9_Ri* and a specific forward primer (Table 2), following the thermocycling conditions of the second round.

2.5. Statistical Analysis

Statistical analyses in this study were performed using MedCalc software version 20.019 (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium). For the evaluation of plasma samples from colorectal cancer (CRC) patients and healthy individuals, sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were calculated based on the results of the semi-nested PCR assay. Confidence intervals (95% CI) were computed to provide estimates of the precision of sensitivity and specificity measures. To compare differences between groups, appropriate statistical tests, including the Mann–Whitney U test for non-parametric data and the Chi-square test for categorical variables, were applied.

To determine the diagnostic accuracy of the m*SEPT9* assay, receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was conducted. The area under the ROC curve (AUC) was calculated to assess the overall effectiveness of the assay in discriminating between CRC patients and healthy controls. The optimal cut-off value for m*SEPT9* detection was determined using the Youden index from the ROC curve, maximizing the sum of sensitivity and specificity.

3. Results and Discussion

3.1. A Technical Overview of the Novel Semi-Nested Realtime PCR Assay for Detecting m*SEPT9*

The semi-nested realtime PCR assay for m*SEPT9* employs a two-round amplification process to maximize specificity and sensitivity. The first PCR round amplifies both methylated and unmethylated *SEPT9* sequences, utilizing primers designed to anneal to regions devoid of CpG sites (Figure 1i). This approach allows for the co-amplification of all available *SEPT9* DNA, irrespective of its methylation status.

The forward and reverse primers, *SEPT9_F* and *SEPT9_Ro*, incorporate artificial sequences at the 5' end that enhance amplification efficiency, particularly in AT-rich regions. These primers uniformly bind both methylated and unmethylated DNA, setting the stage for the subsequent discrimination between these forms in the second amplification round.

In the second PCR round, the integration of an extendable blocking probe (ExBP) at the 5' end of the forward primer (*SEPT9_Fi*) plays a critical role in selectively amplifying methylated DNA sequences. The synthesis of the 'first strand' of DNA, initiated by this forward primer containing the ExBP, begins the process (Figure 1ii,iii).

The reverse primer (*SEPT9_Ri*) anneals to the 'first strand' and extends it to form the 'second strand' (Figure 1iii,iv). A key feature of this process occurs when the 'second strand' is derived from unmethylated DNA: a hairpin structure forms at the 3' end of this strand. This hairpin structure, initially formed by the natural folding of the DNA sequence, is further stabilized by primer extension, effectively locking the strand and preventing it from acting as a template in subsequent PCR cycles (Figure 1v). This selective inhibition mechanism is vital, as it ensures that only methylated sequences are amplified, substantially enhancing the assay's sensitivity and selectivity in detecting methylation.

In the post-amplification phase of the semi-nested realtime PCR assay, as detailed in Figure 1vi, a DNA melting curve analysis is conducted. This analysis is critical, as it identifies the melting temperature peaks of the PCR products, with the characteristic peak for methylated *SEPT9* sequences occurring at 78.0–78.7 degrees Celsius. This precise measurement not only verifies the specificity of the amplification but also confirms the methylation status of the DNA, ensuring the assay accurately reflects the sample's methylation condition.

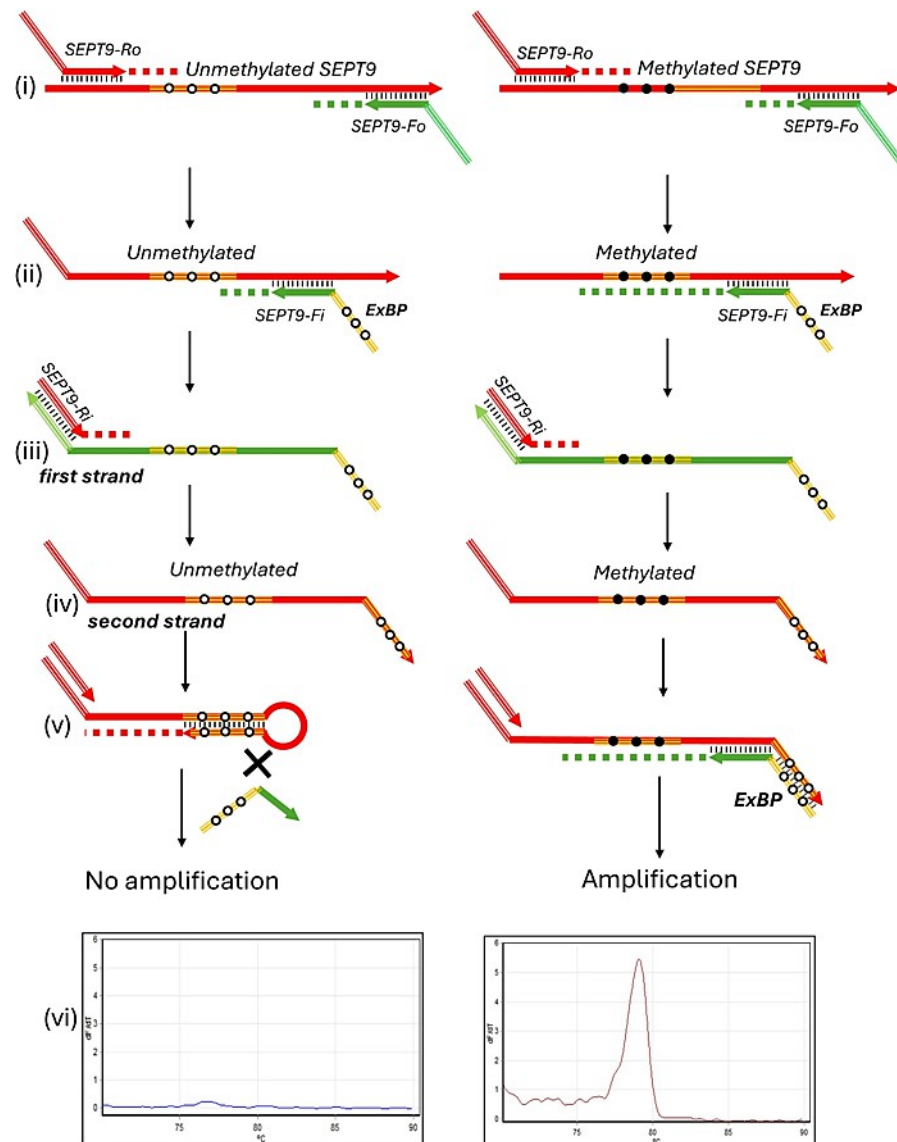


Figure 1. A schematic representation of semi-nested realtime PCR assay for the detection of mSEPT9 based on DNA melting analysis. Figure 1 illustrates the semi-nested realtime PCR assay process, which is designed for high specificity and sensitivity in detecting mSEPT9. In Panel (i), the first round of PCR amplification is shown where forward and reverse primers, SEPT9_Fo and SEPT9_Ro, amplify both methylated and unmethylated sequences from bisulfite-converted DNA. These primers are specially designed to target regions devoid of CpG sites, allowing them to universally bind to DNA. Progressing to Panels (ii) through (vi), the second round of PCR is detailed. Panel (ii) introduces extendable blocking probes (ExBP) at the 5' ends of the forward primers, which are designed to anneal to CpG-free regions, thus allowing its priming to both methylated and unmethylated sequences. The synthesis of the 'first strand', initiated by the forward primer incorporating the ExBP, is depicted in Panels (ii,iii). The reverse primer, SEPT9_Ri, used in the second PCR round is identical to the sequence at the 5' end of SEPT9_Ro from the first round, maintaining the semi-nested nature of the PCR. This primer initiates extension on the first strand to form the 'second strand', as shown in Panels (iii,iv). Panel (v) highlights the formation of a stable hairpin structure at the 3' end of the 'second strand'—if derived from unmethylated DNA. This structure inhibits the strand from acting as a template in subsequent PCR cycles, thereby enhancing the selective amplification of methylated sequences. Finally, Panel (vi) describes the post-amplification phase where a DNA melting curve analysis is performed to determine the melting temperature peaks of the PCR products, verifying the specificity of the amplification and the methylation status of the DNA.

This semi-nested approach not only ensures the detection of methylated DNA in a background of unmethylated sequences but also improves the sensitivity of the assay by allowing a two-round amplification process. The broad amplification in the first PCR round is refined in the second PCR round to specifically target and amplify methylated sequences, thus improving the overall detection capability of low-abundance methylated DNA. This method is particularly advantageous for early cancer diagnostics and monitoring, where detecting low levels of methylation can be crucial.

The integration of ExBP within the standard PCR primer setup significantly simplifies the assay compared to traditional methods requiring complex and costly modified probes [11]. This simplification reduces the assay's cost and complexity while minimizing the risk of non-specific amplifications, which are prevalent in highly sensitive PCR setups and can lead to false positives. Consequently, this semi-nested PCR assay offers a cost-effective, specific, and sensitive method for detecting mSEPT9, suitable for use even in resource-limited settings.

Further validation of this assay is detailed below, with a broader range of sample types being analyzed, including synthetic DNA standards and blood samples from both CRC patients and healthy controls. These studies aim to provide comprehensive data to confirm the assay's practical applicability and diagnostic accuracy in a clinical setting, potentially enhancing diagnostic precision and contributing significantly to precision oncology by reliably detecting early methylation changes indicative of CRC.

3.2. Evaluation of the Novel Assay Using Standard Samples

To verify the innovative semi-nested PCR methodology for detecting mSEPT9, extensive evaluation was conducted using synthetic DNA standards. These standards simulated the post-bisulfite-modified SEPT9 gene sequence and included both a fully methylated sample and a series of mixtures. Each mixture comprised a fixed concentration of unmethylated SEPT9 DNA (10^5 copies/ μ L) combined with varying concentrations of methylated SEPT9 DNA to achieve methylated/unmethylated ratios of 10:1, 1:1, down to as low as 1:100,000.

The results demonstrated that the fully methylated (100%) sample exhibited a distinct melting peak at 78.0–78.7 degrees Celsius, indicative of high methylation levels. This characteristic peak serves as a critical marker for confirming the presence of methylated DNA. Notably, the unmethylated (0%) sample showed no such peak, affirming the assay's specificity. Moreover, mixed samples with ratios equal to or greater than 1:100,000 consistently exhibited a characteristic melting peak similar to that of the fully methylated standard (Figure 2). This observation confirms that the assay's detection threshold is as low as 0.001%, highlighting its exceptional sensitivity and its capability to detect minimal levels of methylation.

The potential of our semi-nested PCR assay for precise detection of mSEPT9 significantly enhances the early detection and monitoring of CRC. Our assay demonstrated the remarkable ability to identify mSEPT9 levels as low as 0.001%, offering a hundredfold increase in sensitivity compared to the HeavyMethyl technique by Cottrell et al. (2004), which detected methylated DNA in a background of unmethylated DNA at a 0.1% detection limit [12]. Additionally, compared to a modified SEPT9 assay reported to have a detection limit of 1:5000, equivalent to 0.02% methylated DNA in a background of unmethylated DNA [13], our method further extends this sensitivity to 0.001% or 1:100,000, highlighting the advanced capability of the semi-nested realtime PCR approach in detecting extremely low levels of methylation crucial for early cancer detection and monitoring.

This enhanced detection is largely attributed to the strategic use of extendable blocking probes (ExBP) in our assay, which selectively enriches methylated sequences by effectively blocking the amplification of unmethylated DNA. This specificity is critical in clinical settings, where precise quantification of methylation levels can significantly influence diagnostic and therapeutic decisions for CRC patients. This result lays a robust founda-

tion for further applying this assay to clinical samples, aiming to validate its diagnostic utility extensively.

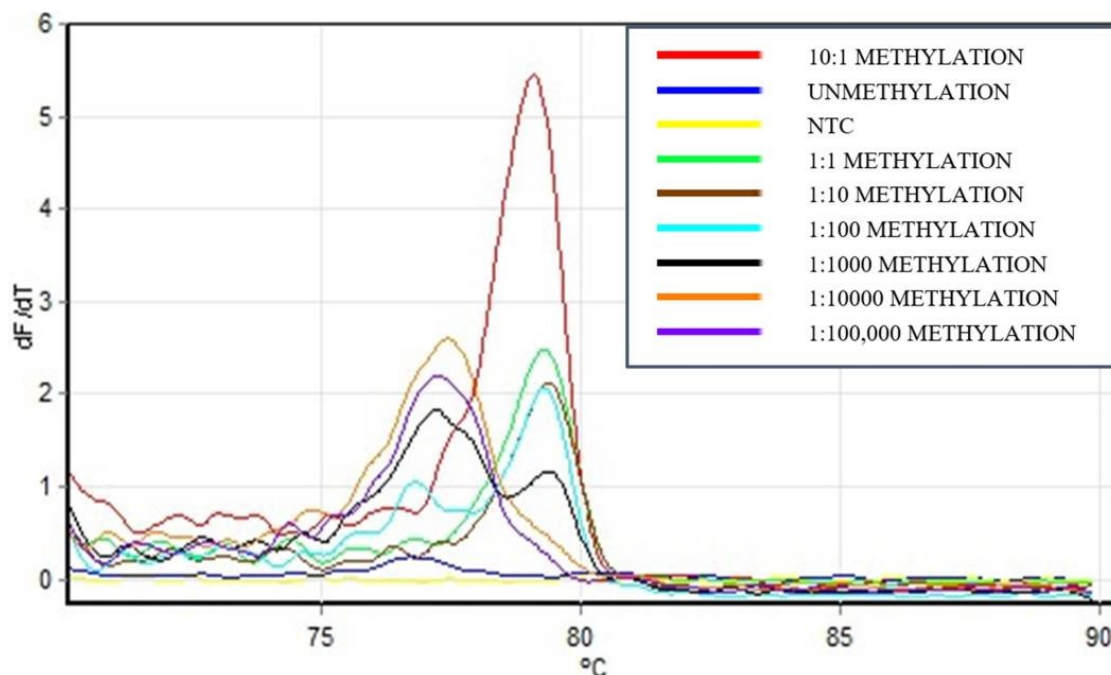


Figure 2. DNA melting curve analysis for mSEPT9 detection. Representative melting curves are presented for a series of standard samples, each containing a constant concentration of unmethylated SEPT9 DNA (10^5 copies/ μ L) and varying concentrations of methylated DNA, resulting in methylated/unmethylated ratios from 10:1 down to 1:100,000, along with fully methylated (100%) and unmethylated (0%) controls. The characteristic melting temperature peak for methylated SEPT9, ranging between 78.0 to 78.7 degrees Celsius (highlighted in grey), is observed in the fully methylated sample and all spiked samples with ratios from 1:10,000 and higher. In contrast, this specific melting peak is absent in the unmethylated control and samples with less than 1:10,000 methylated to unmethylated ratio.

3.3. Evaluation of Plasma Samples from CRC Patients and Healthy Individuals

Following the validation of our semi-nested PCR assay on standard samples, we extended its evaluation to plasma samples from 46 patients with CRC and 50 healthy individuals. This part of the study aimed to assess the practical application of the assay in a real-world clinical setting, where biomarker levels in plasma samples are generally low, thus presenting a challenge for detection.

Our findings revealed that 34 out of 46 CRC patients tested positive for mSEPT9, yielding a sensitivity rate of 73.91% with a confidence interval of 95% (CI: 58.87–85.73). Among the healthy controls, 10 out of 50 (20%) exhibited false-positive results, resulting in a specificity rate of 80% (CI: 66.28–89.97). The positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the assay were 77.23% and 76.92%, respectively, indicating the assay's effectiveness in correctly identifying both true positive and true negative cases. The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis further confirmed the assay's moderate diagnostic accuracy with an area under the curve (AUC) of 0.77 (CI: 0.67–0.85) as shown in Figure 3.

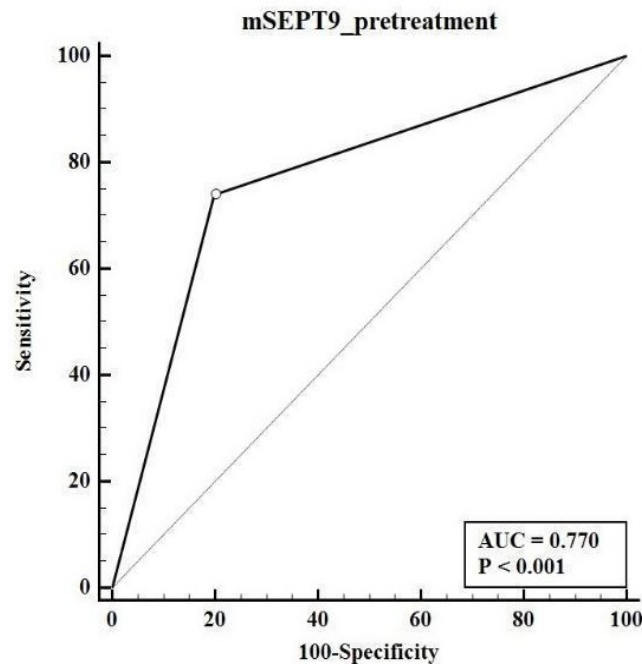


Figure 3. Receiver operating characteristic of mSEPT9 in plasma. ROC curve displaying the diagnostic accuracy of mSEPT9 status in plasma to differentiate between CRC and healthy individuals, with an AUC of 0.770.

The analysis of plasma mSEPT9 in CRC patients revealed that its presence was not significantly correlated with several clinical and pathological factors such as gender, age, tumor location, T stage, N stage, M stage, tumor size, pathology of the tumor, or tumor differentiation, with all *p*-values exceeding the threshold for significance (Table 3).

Table 3. Correlations between plasma mSEPT9 and clinicopathologic characteristics of CRC patients.

Variables	N	mSEPT9 (-) n (%)	mSEPT9(+) n (%)	<i>p</i> -Value
CRC	46	12 (26.08)	34 (73.91)	
Gender				
Female	21	6 (28.6)	15 (71.4)	0.73
Male	25	6 (24.0)	19 (76.0)	
Age				
<60	17	5 (29.4)	12 (70.6)	0.69
≥60	29	7 (24.1)	22 (75.9)	
Tumor location				
Colon	33	9 (27.3)	24 (72.7)	1.000
Rectum	13	3 (23.1)	10 (76.9)	
TNM Stage				
I	5	3 (60.0)	2 (40.0)	0.049
II	7	2 (28.6)	5 (71.4)	
III	24	6 (25.0)	18 (75.0)	
IV	10	1 (10.0)	9 (90.0)	
T stage				
T1	2	1 (50.0)	1 (50.0)	0.42
T2	8	2 (25.0)	6 (75.0)	
T3	16	5 (31.2)	11 (68.7)	
T4	20	4 (20.0)	16 (80.0)	

Table 3. *Cont.*

Variables	N	mSEPT9 (-) n (%)	mSEPT9(+) n (%)	p-Value
N stage				
No	12	5 (41.7)	7 (58.3)	0.20
N1	29	5 (17.2)	24 (82.8)	
N2	5	2 (40.0)	3 (60.0)	
M stage				
Mo	35	11 (31.4)	24 (68.6)	0.15
M1	11	1 (9.1)	10 (90.9)	
Tumor size				
<5	27	8 (29.6)	19 (70.4)	0.52
≥5	19	4 (21.1)	15 (78.9)	
Pathology tumor				
Carcinoma	40	10 (25.0)	30 (75.0)	0.64
Non-Carcinoma	6	2 (33.3)	4 (66.7)	
Tumor differentiation				
G1	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.089
G2	38	12 (31.6)	26 (68.4)	
G3	8	0 (0.0)	8 (100.0)	
General histological type				
Protrude	9	4 (44.4)	5 (55.6)	0.24
Ulcerative	22	6 (27.3)	16 (72.7)	
Others	15	2 (13.3)	13 (86.7)	
Comorbid disease				
No	29	10 (34.5)	19 (65.5)	0.09
Yes	17	2 (11.8)	15 (88.2)	

Additionally, the presence of mSEPT9 was not significantly associated with underlying morbid entities such as diabetes type 2 or other comorbid conditions, indicating no statistical correlation with these factors. However, a significant trend was observed in the positive rate of mSEPT9 increasing with the disease stage, notably from 40% in stage I to 90% in stage IV, with stages III and IV exhibiting the highest positivity rates at 75% and 90%, respectively (Chi-square test, $p = 0.049$).

Comparing these results to those reported in the study by deVos et al. (2009) [13], our findings demonstrate a similar sensitivity but slightly lower specificity. The SEPT9 methylation assay in deVos et al.'s study, which employed the HeavyMethyl technique, successfully identified 72% of cancers at a specificity of 93% in the training study and 68% of cancers at a specificity of 89% in the testing study. Notably, deVos et al. also observed an increase in the positivity rate with advancing disease stages, similar to the significant trend we observed in our study. Unlike the HeavyMethyl technique that relies on costly modified probes, our semi-nested realtime PCR assay utilizes standard primers without the need for expensive probe designs or modified nucleotides. This not only simplifies the assay setup but also potentially reduces costs, making the method more accessible for broader clinical applications. Furthermore, our study found no significant correlation between the presence of mSEPT9 and underlying morbid entities such as diabetes type 2 or other comorbid conditions, suggesting that mSEPT9 is a robust biomarker independent of these factors. The comparative analysis emphasizes the practical advantages of our innovative approach in enhancing the detection of SEPT9 methylation for early cancer diagnosis and monitoring, aligning with the ongoing efforts to improve CRC screening efficiency and affordability in various healthcare settings.

3.4. Analysis of mSEPT9 before and after Surgical Treatment

This part of our study aimed to preliminarily evaluate the assay's capability to monitor changes in the status of circulation mSEPT9 before and after surgical treatment. In this

focused analysis, among the CRC patients who tested positive for plasma mSEPT9 prior to treatment, 16 had post-operative blood samples available for analysis one week following surgery (Table 4). Of these, 13 underwent surgeries with the intention of complete tumor resection. It was found that 10 of these patients showed a change from positive to negative circulating mSEPT9 status, indicating successful tumor removal. In contrast, three patients remained positive for mSEPT9, pointing to potential residual disease. Specifically, one patient, who continued to test positive for plasma mSEPT9, had confirmed macroscopic residual tumor at the surgical margins, underscoring the assay's capability to detect incomplete tumor resection. This highlights the value of mSEPT9 as a biomarker for assessing surgical outcomes and monitoring for early signs of recurrence, offering critical insights for enhancing postoperative management in colorectal cancer care.

Table 4. Changes in plasma mSEPT9 status before and after surgical treatment.

Patient ID	TNM Stage	Pre-Treatment mSEPT9	Post-Treatment mSEPT9	Surgical Treatment	Surgical Margin
01	T3N1aMo	Positive	Positive	Curative	Ro
02	T4bN1cMo	Positive	Positive	Curative	R2
03	T2N1bMo	Positive	Negative	Curative	Ro
04	T4aN1aMo	Positive	Negative	Curative	Ro
05	T3NoMo	Positive	Negative	Curative	Ro
06	T3NoMo	Positive	Negative	Curative	Ro
07	T2NoMo	Positive	Negative	Curative	Ro
08	T1NoMo	Positive	Positive	Curative	Ro
09	T4aN1cM1c	Positive	Positive	Palliative	Ro
10	T4bN1cM1	Positive	Positive	Palliative	R1
11	T4bN1cM1	Positive	Negative	Curative	Ro
12	T3N1aM1a	Positive	Negative	Palliative	Ro
13	T4aN2aM1a	Positive	Negative	Curative	Ro
14	T2N2aMo	Positive	Negative	Curative	Ro
15	T3N1bMo	Positive	Negative	Curative	Ro
16	T3N1bMo	Positive	Negative	Curative	Ro

Ro: no cancer cells at the surgical margin; R1: microscopic cancer cells present at the surgical margin; and R2: macroscopic cancer cells visible at the surgical margin.

Further insights were gained from the analysis of metastatic CRC patients within this subgroup, reflecting on the study by Liu et al. (2021), which examined mSEPT9's utility in monitoring response and predicting prognosis in stage IV CRC patients with liver metastasis [14]. Similar to their findings, our study observed that among five stage IV patients, two who underwent extensive surgeries including the removal of all visible tumors and associated metastases tested negative for mSEPT9 post-operatively. These successful cases involved one patient with high rectal cancer and a single liver metastasis, who received concurrent resections of the high rectum and the left hepatic lobe, and another patient with sigmoid colon cancer that had invaded the left ovary and fallopian tube, who underwent complete excision of the left colon and reproductive structures, achieving clean margins (Ro).

However, the remaining three patients, who only had their primary tumors removed and whose multiple liver metastases had not been addressed, exhibited varied post-operative mSEPT9 results: two remained positive, indicating potential residual disease, while one unexpectedly tested negative. All three patients received the same maintenance therapy with bevacizumab and 5-FU-based chemotherapy regimens. The survival outcomes in these cases suggest a correlation, albeit tentative, given the small sample size: the two patients with continuous positive mSEPT9 status post-surgery both passed away within 22 months post-operation. In contrast, the patient whose post-operative mSEPT9 status turned negative remains alive and clinically stable under the same maintenance therapy, without signs of recurrence, 23 months post-surgery as of May 2024.

These findings, while provisional, highlight the possible role of mSEPT9 as a marker for both residual disease and recurrence monitoring. Regular monitoring of mSEPT9 in patients who initially revert to negative status post-surgery might help in early detection of recurrence, particularly if mSEPT9 levels revert to positive. This could signal tumor regrowth, suggesting a need for more aggressive follow-up and treatment strategies. Given the limited number of cases, these observations are suggestive rather than definitive and underscore the need for further research with larger sample sizes to validate these potential correlations and enhance colorectal cancer patient management and outcomes.

4. Conclusions

Our study introduces a semi-nested realtime PCR assay that innovatively employs DNA melting curve analysis to detect circulating mSEPT9 in colorectal cancer (CRC) patients. This new method leverages extendable blocking probes (ExBP), dramatically enhancing the detection of low-level methylated DNA, capable of discerning mSEPT9 even in samples where non-methylated SEPT9 is present at concentrations up to 100,000 times higher. It uniquely identifies mSEPT9 by analyzing the characteristic melting temperatures of PCR products, a creative approach that enhances the assay's capability to detect very low levels of methylated DNA amidst a high background of non-methylated SEPT9.

By avoiding the use of costly modified probes, our assay simplifies the setup and reduces costs, making it especially suitable for resource-limited settings. The technical sophistication of our assay, combined with its clinical performance—achieving a sensitivity of 73.91% and specificity of 80%—not only enhances its utility for CRC screening but also positions it as an invaluable tool for monitoring disease progression and recurrence. The observed correlation between a negative post-operative mSEPT9 status and favorable patient outcomes further highlights its potential as a prognostic biomarker.

In line with the advantages of non-invasive methods highlighted by Ferro et al. (2021), integrating mSEPT9 monitoring into clinical practice could provide a less invasive, cost-effective approach to managing colorectal cancer. Such methodologies align with the growing emphasis on liquid biopsies, which have been shown to offer significant benefits in terms of patient comfort, real-time monitoring, and economic feasibility [15].

These findings encourage the integration of our mSEPT9 assay into routine clinical practice and set the stage for broader research. Future studies are urged to validate this assay in larger and more diverse populations, aiming to solidify its clinical applicability and confirm its benefits across different healthcare settings, thereby potentially revolutionizing CRC management through early detection and precise monitoring of treatment efficacy.

Author Contributions: Conceptualization, L.T.D., B.V.N. and T.H.H.; formal analysis, L.T.D., T.T.D., H.T.B., U.D.N., U.T.H., D.V.T. and T.H.H.; methodology, L.T.D., T.T.D., H.T.B., U.D.N., U.T.H., B.V.N.

and T.H.H.; validation, L.T.D., T.T.D., H.T.B., U.D.N., U.T.H., D.V.T. and T.H.H.; writing—original draft, L.T.D., T.T.D. and T.H.H.; writing—review and editing, L.T.D., T.T.D., H.T.B., U.D.N., U.T.H., D.V.T., B.V.N. and T.H.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding. The APC was funded by the 103 Military Hospital.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the institutional research committee at Vietnam Military Medical University (reference number: 98/CNChT-HĐĐĐ, dated 23 July 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: We thank Trang Thu Hoang, Dung Huu Nguyen, Tu Cam Vu, Kim Ngan Thi Dinh, Quyen Van Pham, Quyen Thi Nguyen, and Thu Hang Pham for their exceptional technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Wagle, N.S.; Jemal, A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J. Clin.* **2023**, *73*, 17–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Xi, Y.; Xu, P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 101174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Miller, K.D.; Nogueira, L.; Devasia, T.; Mariotto, A.B.; Yabroff, K.R.; Jemal, A.; Kramer, J.; Siegel, R.L. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 409–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Boukouris, A.E.; Theochari, M.; Stefanou, D.; Papalambros, A.; Felekouras, E.; Gogas, H.; Ziogas, D.C. Latest evidence on immune checkpoint inhibitors in metastatic colorectal cancer: A 2022 update. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2022**, *173*, 103663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Young, C.; Wood, H.M.; Seshadri, R.A.; Van Nang, P.; Vaccaro, C.; Melendez, L.C.; Bose, M.; Van Doi, M.; Piñero, T.A.; Valladares, C.T.; et al. The colorectal cancer-associated faecal microbiome of developing countries resembles that of developed countries. *Genome Med.* **2021**, *13*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ogunwobi, O.O.; Mahmood, F.; Akingboye, A. Biomarkers in Colorectal Cancer: Current Research and Future Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Church, T.R.; Wandell, M.; Lofton-Day, C.; Mongin, S.J.; Burger, M.; Payne, S.R.; Castaños-Vélez, E.; Blumenstein, B.A.; Rösch, T.; Osborn, N.; et al. Prospective evaluation of methylated *SEPT9* in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut* **2014**, *63*, 317–325. [[CrossRef](#)]
8. Jin, P.; Kang, Q.; Wang, X.; Yang, L.; Yu, Y.; Li, N.; He, Y.Q.; Han, X.; Hang, J.; Zhang, J.; et al. Performance of a second-generation methylated *SEPT9* test in detecting colorectal neoplasm. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *30*, 830–833. [[CrossRef](#)]
9. Wu, D.; Zhou, G.; Jin, P.; Zhu, J.; Li, S.; Wu, Q.; Wang, G.; Sheng, J.; Wang, J.; Song, L.; et al. Detection of Colorectal Cancer Using a Simplified *SEPT9* Gene Methylation Assay Is a Reliable Method for Opportunistic Screening. *J. Mol. Diagn.* **2016**, *18*, 535–545. [[CrossRef](#)]
10. Ho, T.H.; Dang, K.X.; Lintula, S.; Hotakainen, K.; Feng, L.; Olkkonen, V.M.; Verschuren, E.W.; Tenkanen, T.; Haglund, C.; Kolho, K.L.; et al. Extendable blocking probe in reverse transcription for analysis of RNA variants with superior selectivity. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Lofton-Day, C.; Model, F.; DeVos, T.; Tetzner, R.; Distler, J.; Schuster, M.; Song, X.; Lesche, R.; Liebenberg, V.; Ebert, M.; et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 414–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cottrell, S.E.; Distler, J.; Goodman, N.S.; Mooney, S.H.; Kluth, A.; Olek, A.; Schwoppe, I.; Tetzner, R.; Ziebarth, H.; Berlin, K. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Devos, T.; Tetzner, R.; Model, F.; Weiss, G.; Schuster, M.; Distler, J.; Steiger, K.V.; Grutzmann, R.; Pilarsky, C.; Habermann, J.K.; et al. Circulating Methylated *SEPT9* DNA in Plasma Is a Biomarker for Colorectal Cancer. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 1337–1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Liu, W.; Hu, P.; Liu, J.; Chen, L. m*SEPT9* can monitor the response and predict the prognosis of stage IV colorectal cancer patients with liver metastasis undergoing potentially curative surgery. *J. Surg. Res.* **2021**, *267*, 485–494. [[CrossRef](#)]
15. Ferro, M.; La Civita, E.; Liotti, A.; Cennamo, M.; Tortora, F.; Buonerba, C.; Crocetto, F.; Lucarelli, G.; Busetto, G.M.; Del Giudice, F.; et al. Liquid Biopsy Biomarkers in Urine: A Route towards Molecular Diagnosis and Personalized Medicine of Bladder Cancer. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Năm thứ bảy mươi

Y HỌC

VIỆT NAM

VIETNAM MEDICAL JOURNAL



THÁNG 12 - SỐ CHUYÊN ĐỀ
2024

TẬP 545

HỘI THẢO HÀNG NĂM PHÒNG CHỐNG UNG THƯ TP. HỒ CHÍ MINH
LẦN THỨ 27, NGÀY 05-06/12/2024

TỔNG HỘI Y HỌC VIỆT NAM
TẠP CHÍ Y HỌC VIỆT NAM

68A Bà Triệu - Hoàn Kiếm - Hà Nội; Tel: 024-39431866

Email: tapchihocvietnam@gmail.com; Website: tapchihocvietnam.vn; vmj.vn

MỤC LỤC

TẠP CHÍ Y HỌC VIỆT NAM TẬP 545 - THÁNG 12 - SỐ CHUYÊN ĐỀ - 2024
HỘI THẢO HÀNG NĂM PHÒNG CHỐNG UNG THƯ TP. HỒ CHÍ MINH
LẦN THỨ 27 – NGÀY 5 - 6/12/2024

ĐẦU CỔ - TUYẾN GIÁP

1. nghiên cứu tỉ lệ cắt tuyến phó giáp không chủ ý trong phẫu thuật cắt giáp và
nạo hạch cổ nhóm vi tại Bệnh viện Ung Bướu Thành phố Hồ Chí Minh năm
2023
incidental parathyroidectomy in total thyroidectomy and central neck
dissection in Ho Chi Minh City Oncology Hospital in 2023
**Võ Duy Phi Vũ, Trần Thị Anh Tường,
Trần Sơn Vũ, Huỳnh Thanh Hồ** 3
2. vai trò của thời gian nhân đôi thyroglobulin trong đánh giá tái phát, di căn ở
bệnh nhân ung thư tuyến giáp thể biệt hóa
The role of thyroglobulin doubling time in assessing recurrence and metastasis
in patients with differentiated thyroid cancer
**Nguyễn Quang Cường, Lê Thị Thùy Trang,
Lê Nguyễn Thanh Long, Nguyễn Duy Trì** 9
3. Sánh giá kết quả ứng dụng vạt đùi trước ngoài vi phẫu che phủ tổn khuyết
sau phẫu thuật ung thư da vùng đầu mặt cổ
evaluation of the results of applying anterior outside thigh flaps in addition to
microsurgery to cover skin lesions after head face and neck cancer surgery
**Lê Minh Quang, Nguyễn Đức Thành,
Bùi Văn Quang, Đỗ Đình Toàn, Nguyễn Bá Mạnh** 17
4. Ứng dụng vạt đảo mũi má cuống trên tái tạo khuyết hồng vùng mặt
using superior pedicle nasolabial island flap for defect reconstruction in facial
skin cancer surgery
**Đỗ Nguyễn Tuấn Khanh, Nguyễn Xuân Trục,
Đặng Thanh Hào, Nguyễn Đăng Khoa** 23
5. Sánh giá tình trạng di căn hạch cổ âm thầm trong ung thư tuyến mang tai nguy
cơ cao
patterns of occult cervical lymph node metastasis in high-risk parotid cancer
**Nguyễn Việt Dũng, Nguyễn Xuân Trục, Phan Văn Mạnh,
Lê Văn Cường, Trương Công Tuấn Anh, Trần Sơn Vũ,
Châu Đức Toàn, Nguyễn Đăng Khoa, Nguyễn Đức Hương,
Đỗ Nguyễn Tuấn Khanh, Trần Thanh Tùng,
Nguyễn Hoàng Thiên Bảo, Hồ Thiên Tân,
Nguyễn Trần Minh Khánh, Lành Thanh Phong, Võ Duy Phi Vũ** 32
6. chẩn đoán và điều trị ung thư ống tai ngoài tại Bệnh viện Tai Mũi Họng
Diagnosis and treatment of external ear canal cancer at The Ent Hospital 39

and Orthopaedics Ho Chi Minh City

Lê Văn Thọ

56. phẫu thuật bảo tồn chi thể điều trị bệnh lý ung thư xương sử dụng mảnh ghép xương tự thân kích thước lớn xử lý bằng dung dịch nitơ lỏng kết hợp hệ thống khớp nhân tạo: Báo cáo 10 ca lâm sàng
innovative limb salvage in the treatment of bone cancer: Combining bone recycling with liquid nitrogen and megaprosthesis - insights from a case series of 10 patients 467

**Nguyễn Trần Quang Sáng, Trần Đức Thanh,
Đặng Minh Quang, Lê Thế Hùng, Trần Văn Công,
Trần Tuyết Thanh Hải, Trần Trung Dũng**

57. Đặc điểm lâm sàng và kết quả điều trị gãy xương bệnh lý của xương dài do di căn xương
clinical characteristics and treatment outcomes of pathological long bone fracture due to bone metastases 474

Phạm Thanh Nhã, Lê Văn Thọ, Ngô Viết Nhuận

58. Đặc điểm tâm lý người bệnh ung thư trong đại dịch COVID-19
psychological characteristics of cancer patients during the COVID-19 pandemic 481

Nguyễn Thị Thu Hường, Lê Văn Quảng

GIẢI PHẪU BỆNH

59. nghiên cứu phát hiện methyl hóa gen SEPT9 Ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng bằng phương pháp semi – nested PCR phân tích phổ tuyến tính
Detecting methylation of SEPT9 gene in colorectal cancer using semi – nested realtime PCR assay with extendable blocking probe 488

Dương Thùy Linh, Nguyễn Văn Ba, Hồ Hữu Thọ

60. So sánh giá trị mô đệm u và mối liên quan với đặc điểm giải phẫu bệnh ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng
study of tumor stroma percentage and its correlation with pathological features in colorectal carcinoma 498

Trương Đình Tiến, Đặng Sơn Tùng, Nguyễn Thu Hiền

61. u trung mạc biệt hóa cao dạng nhú chẩn đoán hồi cứu trong 10 năm 2013 – 2023
well differentiated papillary mesothelial tumor form retrospective diagnosis for 10 years (2013 - 2023) 505

Nguyễn Sơn Lam

62. u cơ mỡ mạch máu ở thanh quản: Báo cáo một trường hợp hiếm gặp và hồi cứu y văn
Angiomyolipoma in the larynx: A rare case report and literature review 513

**Hoàng Hạnh Dung, Phạm Hiếu,
Lê Hồ Ngọc Trâm, Thái Anh Tú**

GIẢI PHẪU BỆNH

**NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN METHYL HÓA GEN SEPT9
Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SEMI – NESTED PCR PHÂN TÍCH PHỔ TUYẾN TÍNH**

Dương Thùy Linh¹, Nguyễn Văn Ba², Hồ Hữu Thọ²

TÓM TẮT.

Mục tiêu: Methyl hóa gen SEPT9 được FDA công nhận và sử dụng là dấu ấn sinh học xét nghiệm bằng máu ngoại vi đầu tiên trong sàng lọc UTĐTT vào năm 2016, ngày càng phát triển nhiều kỹ thuật xét nghiệm để tối ưu hóa đạt được độ nhạy, độ đặc hiệu cao. Hiện nay, phương pháp phát hiện DNA bị methyl hóa của gen SEPT9 đang áp dụng rộng rãi là bộ kit Epi proColon® 2.0 dựa trên phương pháp HeavyMethyl, có giá thành cao và nhiều nghiên cứu chỉ ra độ nhạy còn hạn chế. Nghiên cứu của chúng tôi nhằm đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu phát hiện mSEPT9 với phương pháp mới dựa trên semi – nested PCR phổ tuyến tính ở bệnh nhân UTĐTT.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả, tiến cứu trên nhóm 50 người khỏe mạnh, 46 bệnh nhân UTĐTT được xét nghiệm mSEPT9 bằng phương pháp mới dựa trên semi – nested PCR phổ tuyến tính.

Kết quả: Phương pháp xét nghiệm mới đã đạt được độ nhạy 73,91% và độ đặc hiệu là 80% cho thấy khả năng phát hiện hiệu quả DNA bị methyl hóa, với kỹ thuật mới sử dụng ExBP một

cách sáng tạo mà không cần các đầu dò được sửa đổi tốn kém giúp đơn giản hóa việc thiết lập xét nghiệm và giảm tổng chi phí, tăng cường khả năng xét nghiệm trong các điều kiện khác nhau.

Kết luận: Với kỹ thuật xét nghiệm mới này cải thiện đáng kể khả năng phát hiện mSEPT9 mang lại bước tiến tiềm năng trong sàng lọc và theo dõi UTĐTT. Các nghiên cứu lớn hơn trong tương lai được khuyến khích để xác nhận lợi ích lâm sàng của xét nghiệm này.

Từ khóa: Ung thư đại trực tràng; SEPT9 methylation; DNA melting; semi-nested PCR; extendable blocking probe; cell-free DNA; sàng lọc ung thư đại trực tràng.

SUMMARY

**DETECTING METHYLATION OF
SEPT9 GENE IN COLORECTAL
CANCER USING SEMI – NESTED
REALTIME PCR ASSAY WITH
EXTENDABLE BLOCKING PROBE**

Objective: The FDA acknowledged the methylated SEPT9 gene as a biological marker for peripheral blood testing in colorectal cancer screening in 2016. Since then, numerous testing techniques have been developed to optimize sensitivity and specificity. Currently, the widely used method for detecting methylated DNA of the SEPT9 gene is the Epi proColon® 2.0 kit based on the HeavyMethyl method. This method is costly, and several studies have indicated limited sensitivity. Our study aims to evaluate the

¹Trung tâm Ung Bướu – Bệnh viện Quân Y 103

²Học viện Quân Y

Chịu trách nhiệm chính: Dương Thùy Linh

Email: bsduonglinh103@gmail.com

Ngày nhận bài: 26/8/2024

Ngày phản biện: 30/8/2024

Ngày chấp nhận đăng: 03/10/2024

sensitivity and specificity of detecting methylated SEPT9 using a new method based on semi-nested PCR with linear array in colorectal cancer patients undergoing screening.

Methods: The study involves a descriptive and prospective evaluation on a group of 50 healthy individuals and 46 colorectal cancer patients. The patients are tested for methylated SEPT9 using a new method based on semi-nested PCR to determine the sensitivity and specificity of the test.

Results: The assay demonstrated a sensitivity of 73.91% and specificity of 80%, showcasing its ability to detect very low levels of methylated DNA effectively. The innovative use of ExBP without costly modified probes simplifies the assay setup and reduces the overall costs, enhancing its applicability in diverse clinical settings.

Conclusions: This novel assay significantly improves the detection of mSEPT9, offering a potential advance in CRC screening and monitoring. Future studies are encouraged to validate this assay in larger populations to establish its clinical benefits and practical utility.

Keywords: colorectal cancer; SEPT9 methylation; DNA melting; semi-nested PCR; extendable blocking probe; cell-free DNA; early cancer detection.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng là ung thư được chẩn đoán phổ biến thứ ba và là nguyên nhân gây tử vong liên quan đến ung thư đứng thứ hai, gây ra khoảng 1,9 triệu ca mới và 0,9 triệu ca tử vong trên toàn cầu vào năm 2020. Mặc dù có những tiến bộ trong việc phát hiện và điều trị, ước tính đến năm 2030, tỷ lệ mắc UTĐTT sẽ tăng 60%, dẫn đến 2,2 triệu ca mới và 1,1 triệu ca tử vong hàng năm^[1]. Phát hiện sớm rất quan trọng để cải thiện tỷ lệ

sống sót, có thể lên tới 90% ở giai đoạn I nhưng giảm xuống mức thấp nhất là 15% ở giai đoạn IV^[2]. Mặc dù nội soi sinh thiết đại trực tràng là tiêu chuẩn vàng để sàng lọc UTĐTT do độ nhạy và độ đặc hiệu cao^[3], nhưng tính xâm lấn, chi phí cao và tính phức tạp về tai biến khi thực hiện hạn chế tính phù hợp của xét nghiệm như một công cụ sàng lọc. Điều này dẫn đến đòi hỏi phát triển các xét nghiệm chẩn đoán không xâm lấn có thể tăng cường phát hiện sớm và giảm các thủ thuật xâm lấn không cần thiết. Hiện tại, dấu ấn sinh học chẩn đoán dựa trên methyl hóa DNA trong máu đối với UTĐTT đầu tiên được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) phê duyệt chấp thuận là xét nghiệm sàng lọc đại trực tràng với dấu ấn methyl hóa gen SEPT9. Xét nghiệm này được gọi là Epi proColon® 2.0, đã chứng minh khả năng phát hiện UTĐTT với độ nhạy là 80,6% và độ đặc hiệu là 96,9%^[4]. Tuy nhiên, độ nhạy của nó đối với UTĐTT giai đoạn đầu (giai đoạn I và II) vẫn ở mức lần lượt là 41,1% và 72%^[5]. Việc tăng độ nhạy và độ đặc hiệu trong sàng lọc UTĐTT và phát hiện sớm là rất quan trọng. Sự tiến bộ này không chỉ dựa vào việc lựa chọn hoặc kết hợp nhiều dấu hiệu methyl hóa khác nhau mà còn dựa vào việc phát triển các phương pháp tiên tiến để phân tích DNA đã methyl hóa. Bộ dụng cụ Epi proColon® 2.0 sử dụng phương pháp HeavyMethyl sử dụng mẫu dò khóa không kéo dài chuỗi để tăng khả năng khuếch đại chọn lọc DNA bị methyl hóa và giảm thiểu hiện tượng khuếch đại nhầm các DNA không bị methyl hóa. Tuy nhiên, mẫu dò khóa không kéo dài chuỗi đòi hỏi phải thay thế các nucleotide tự nhiên bằng các biến thể nucleotide thích hợp, và hiện tượng khuếch đại nhầm chỉ bị hạn chế một phần với công nghệ này. Trong khi đó, nguyên lý công

nghe mới với mẫu dò khóa có khả năng kéo dài (ExBP) giúp ngăn chặn tối đa tín hiệu khuếch đại nhằm từ các allele bình thường, do đó là công nghệ đầy triển vọng có thể ứng dụng trong việc phát hiện methyl hóa DNA trong máu ngoại vi. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã chứng minh thành công rằng phương pháp cải tiến này có thể ngăn chặn sự liên kết của mẫu với các alen kiểu hoang dã và phát hiện các alen đột biến, ngay cả trong các trường hợp có các alen kiểu hoang dã ở nồng độ cao hơn 1000 – 10.000 lần. Sự cải thiện đáng kể về độ nhạy và độ đặc hiệu này nhấn mạnh tiềm năng của công nghệ ExBP trong việc chuyển đổi sàng lọc UTĐTT bằng cách phát hiện DNA methyl hóa có hàm lượng thấp với độ chính xác cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu trong phát hiện methyl hóa gen SEPT9 ở bệnh nhân UTĐTT sử dụng phương pháp semi – nested PCR phân tích phổ tuyến tính là sự tích hợp hiệu quả của các đầu dò có khả năng kéo dài (ExBP) vào xét nghiệm PCR, đồng thời chúng tôi phân tích biểu hiện mSEPT9 ở bệnh nhân UTĐTT ở các đặc điểm khác nhau của nhóm bệnh nhân nghiên cứu.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn:

- Nhóm bệnh nhân được chẩn đoán xác định ung thư đại trực tràng có đầy đủ hồ sơ bệnh án.
- Nhóm người khỏe mạnh đã được kiểm tra nội soi đại trực tràng không phát hiện có bất thường và không mắc các bệnh lý ung thư khác.
- Nhóm bệnh và nhóm người khỏe mạnh được lấy máu xét nghiệm đúng theo quy định.

- Đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ:

- Bệnh nhân có các bệnh ung thư khác kèm theo hoặc có bệnh cấp và mãn tính trầm trọng có nguy cơ tử vong gần.
- Không đồng ý tham gia nghiên cứu.
- Hồ sơ bệnh án không đầy đủ.

2.1.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu:

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 01/2021 đến tháng 12/2023.
- Địa điểm nghiên cứu: Bệnh viện Quân Y 103, Bệnh viện K Trung ương, Viện Y sinh học Học viện Quân Y.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu:

- Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu tiến cứu, có nhóm chứng.

2.2.2. Cỡ mẫu:

- Cỡ mẫu: Thuận tiện.
- Trong nghiên cứu: Chúng tôi đã thu thập được 46 bệnh nhân UTĐTT và 50 người khỏe mạnh.

2.2.3. Các bước tiến hành:

- Tất cả người tham gia nghiên cứu được thông báo đầy đủ về mục tiêu và bản chất của nghiên cứu, họ tự nguyện đồng ý tham gia.
- Thu thập và xử lý mẫu thời điểm trước khi điều trị phẫu thuật và sau phẫu thuật 7 - 10 ngày với nhóm bệnh nhân; nhóm người khỏe mạnh được lấy mẫu vào thời điểm bệnh nhân đến kiểm tra trước khi nội soi đại trực tràng.
- + Lâu máu: Khoảng 10ml máu tĩnh mạch từ người tham gia lưu vào ống có chất chống đông K2 EDTA. Các mẫu được xử lý trong vòng 6 giờ để tách huyết tương, sau đó bảo quản ở tủ lưu có nhiệt độ -80°C.
- + Chiết xuất DNA, đánh giá chất lượng; chuyển đổi Bisulfite bằng bộ EZ DNA

Methylation-Gold™ (Zymo Research, Irvine, CA, Hoa Kỳ).

- Chuẩn bị mẫu DNA chuẩn.
- Tiến hành thực hiện PCR: Xét nghiệm PCR bằng phương pháp semi – nested phân tích phổ tuyến tính sử dụng quy trình khuếch đại hai vòng để đảm bảo độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

2.2.4. Các chỉ số đánh giá:

- Thông tin đặc điểm lâm sàng của nhóm bệnh và nhóm chứng.
- Tính toán độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm.
- Phân tích mối liên quan của đặc điểm lâm sàng của nhóm bệnh với biểu hiện gene mSEPT9.

- Bước đầu phân tích biểu hiện gene mSEPT9 ở nhóm nhỏ bệnh nhân sau phẫu thuật triệt căn.

2.3. Xử lý số liệu

- Sử dụng phần mềm MedCalc version 20.019 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Bỉ) trong phân tích thống kê.
- Sự khác biệt giữa các tỉ lệ được kiểm định bằng các test thống kê phù hợp như Chi-square test, Fisher's exact test...
- Phân tích đường cong ROC và chỉ số diện tích dưới đường cong ROC (AUC) được sử dụng để xem xét giá trị chẩn đoán của các yếu tố và tính toán giá trị cắt tối ưu (cut-off value).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm nhóm đối tượng tham gia nghiên cứu

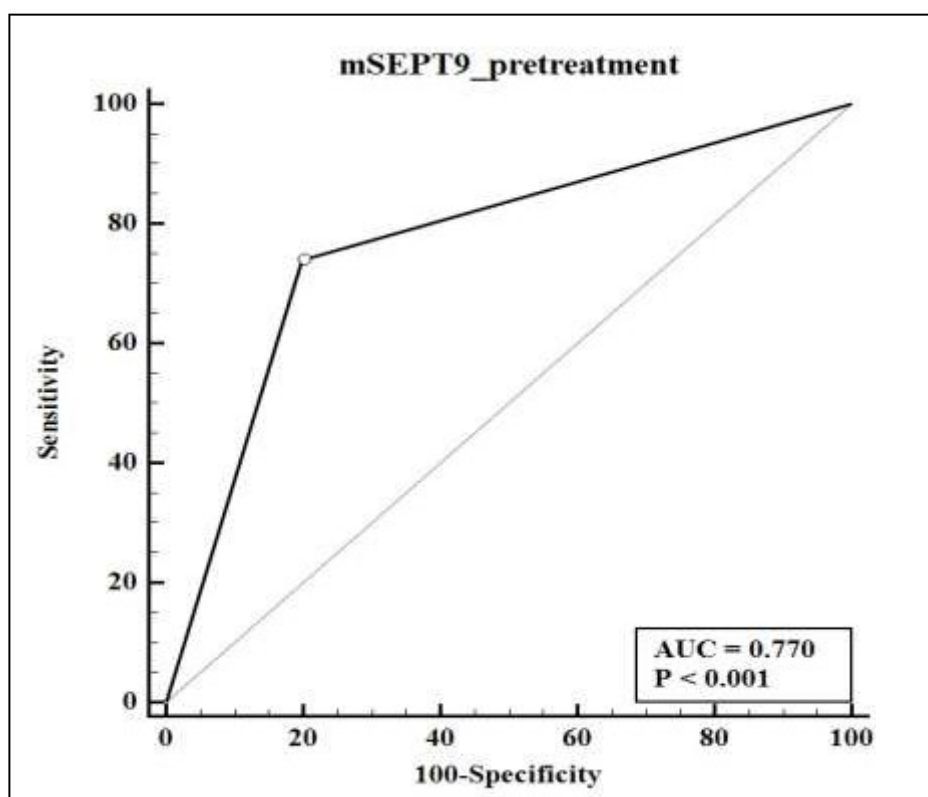
Bảng 1. Đặc điểm nhóm bệnh nhân và nhóm người khỏe mạnh

Chẩn đoán	Ung thư đại trực tràng (n=46)	Nhóm chứng (n=50)
Giới tính		
Nam giới	25	21
Nữ giới	21	29
Tuổi (năm)		
< 55	15	32
55 - 70	26	18
≥ 70	5	0
Giai đoạn ung thư		
I	5	
II	7	
III	24	
IV	10	

Nhận xét: Phân bố về tỉ lệ nam/ nữ ở nhóm bệnh nhân UTĐTT, nhóm chứng lần lượt là 1,19; 0,72. Phân bố về nhóm tuổi của UTĐTT có bệnh nhân tuổi cao trên 70 tuổi

chiếm 5 (10,8%). Phân bố về giai đoạn UTĐTT có giai đoạn III chiếm ưu thế 52,2%.

3.2. Độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm mSEPT9 bằng phương pháp semi – nested PCR phổ tuyến tính



Hình 1. Độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm mSEPT9

Nhận xét: Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm mSEPT9 được thực hiện trên 46 bệnh nhân UTĐTT chẩn đoán xác định bằng mô bệnh học khối u và 50 người khỏe mạnh thu được kết quả: Độ nhạy: 73.91% (độ tin cậy 95%: 58.87 – 85.73) và độ đặc hiệu: 80.0% (độ tin cậy 95%: 66.28 – 89.97). Đặc điểm dương tính của mSEPT9 trong mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân

UTĐTT thời điểm trước điều trị có giá trị chẩn đoán mức khá tốt với AUC đạt giá trị 0.77 (độ tin cậy 95%: 0,672 – 0,849), $p < 0,0001$.

3.3. Mối tương quan giữa mSEPT9 trong huyết tương và đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của nhóm bệnh nhân nghiên cứu

Bảng 2. Mối liên quan giữa mSEPT9 trong huyết tương với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng

Biến số	N	mSEPT9 (-) n (%)	mSEPT9(+) n (%)	P - value
UTĐTT	46	12 (26,08)	34 (73,91)	
Giới tính				
Nữ	21	6 (28,6)	15 (71,4)	0.73
Nam	25	6 (24,0)	19 (76,0)	
Tuổi				
<60	17	5 (29,4)	12 (70,6)	0.69
>= 60	29	7 (24,1)	22 (75,9)	

Vị trí khối u				
Đại tràng	33	9 (27,3)	24 (72,7)	1.000
Trực tràng	13	3 (23,1)	10 (76,9)	
Giai đoạn				
I	5	3 (60,0)	2 (40,0)	0.049
II	7	2 (28,6)	5 (71,4)	
III	24	6 (25,0)	18 (75,0)	
IV	10	1 (10,0)	9 (90,0)	
Giai đoạn T				
T1	2	1 (50,0)	1 (50,0)	0.42
T2	8	2 (25,0)	6 (75,0)	
T3	16	5 (31,2)	11 (68,7)	
T4	20	4 (20,0)	16 (80,0)	
Giai đoạn N				
N0	12	5 (41,7)	7 (58,3)	0.20
N1	29	5 (17,2)	24 (82,8)	
N2	5	2 (40,0)	3 (60,0)	
Giai đoạn M				
M0	35	11 (31,4)	24 (68,6)	0.15
M1	11	1 (9,1)	10 (90,9)	
Kích thước u				
< 5	27	8 (29,6)	19 (70,4)	0.52
≥ 5	19	4 (21,1)	15 (78,9)	
Giải phẫu bệnh				
Carcinoma	40	10 (25,0)	30 (75,0)	0.64
Non – Carcinoma	6	2 (33,3)	4 (66,7)	
Độ biệt hóa khối u				
G1	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0.089
G2	38	12 (31,6)	26 (68,4)	
G3	8	0 (0,0)	8 (100,0)	
Đặc điểm đại thể				
Sùi	9	4 (44,4)	5 (55,6)	0.24
Loét	22	6 (27,3)	16 (72,7)	
Khác	15	2 (13,3)	13 (86,7)	
Bệnh lý mạn tính				
Không	29	10 (34,5)	19 (65,5)	0.09
Có	17	2 (11,8)	15 (88,2)	

Nhận xét: Phân tích mSEPT9 trong huyết tương ở bệnh nhân UTĐTT cho thấy sự hiện diện của nó không tương quan đáng kể với một số yếu tố lâm sàng và bệnh lý như giới tính, tuổi, vị trí khối u, giai đoạn T, giai đoạn N, giai đoạn M, kích thước khối u, bệnh

lý của khối u hoặc sự biệt hóa khối u, với tất cả các giá trị p vượt quá ngưỡng có ý nghĩa. Ngoài ra, sự hiện diện của m SEPT9 không liên quan đáng kể đến các bệnh lý mạn tính như bệnh tiểu đường typ 2, tăng huyết áp hoặc các tình trạng bệnh lý đi kèm khác, cho thấy không có mối tương quan thống kê với các yếu tố này. Tuy nhiên, có một xu hướng

đáng kể được quan sát thấy trong tỷ lệ dương tính của m SEPT9 tăng theo giai đoạn bệnh, đáng chú ý là từ 40% ở giai đoạn I lên 90% ở giai đoạn IV, với giai đoạn III và IV thể hiện tỷ lệ dương tính cao nhất ở mức 75% và 90% (kiểm định Chi-square, $p = 0,049$).

3.4. Phân tích mSEPT9 trước và sau điều trị phẫu thuật

Bảng 3. Đặc điểm mSEPT9 trước và sau phẫu thuật của nhóm 16 bệnh nhân

STT	Giai đoạn TNM	mSEPT9 trước điều trị	mSEPT9 sau điều trị	Phẫu thuật	Diện cắt
01	T3N1aM0	Dương tính	Dương tính	Triệt căn	R0
02	T4bN1cM0	Dương tính	Dương tính	Triệt căn	R2
03	T2N1bM0	Dương tính	Âm tính	Triệt căn	R0
04	T4aN1aM0	Dương tính	Âm tính	Triệt căn	R0
05	T3N0M0	Dương tính	Âm tính	Triệt căn	R0
06	T3N0M0	Dương tính	Âm tính	Triệt căn	R0
07	T2N0M0	Dương tính	Âm tính	Triệt căn	R0
08	T1N0M0	Dương tính	Dương tính	Triệt căn	R0
09	T4aN1cM1c	Dương tính	Dương tính	Triệu chứng	R0
10	T4bN1cM1a	Dương tính	Dương tính	Triệu chứng	R1
11	T4bN1cM1a	Dương tính	Âm tính	Triệt căn	R0
12	T3N1aM1a	Dương tính	Âm tính	Triệu chứng	R0
13	T4aN2aM1a	Dương tính	Âm tính	Triệt căn	R0
14	T2N2aM0	Dương tính	Âm tính	Triệt căn	R0
15	T3N1bM0	Dương tính	Âm tính	Triệt căn	R0
16	T3N1bM0	Dương tính	Âm tính	Triệt căn	R0

R0 = Complete resection, R1 = Microscopic tumor remnants, R2 = Macroscopic tumor remnants

Nhận xét: Đánh giá sơ bộ khả năng theo dõi những thay đổi về tình trạng biểu hiện mSEPT9 trước và sau phẫu thuật. Trong phân tích này cả 16 bệnh nhân đều có mẫu huyết tương dương tính với mSEPT9 trước phẫu thuật, nhưng chỉ có 5 mẫu sau phẫu thuật còn dương tính với mSEPT9.

IV. BÀN LUẬN

Sau khi xét nghiệm PCR của chúng tôi được kiểm chuẩn trên các mẫu chuẩn, chúng tôi đã mở rộng đánh giá xét nghiệm này sang các mẫu huyết tương từ 46 bệnh nhân UTĐTT và 50 người khỏe mạnh. Phần nghiên cứu này nhằm đánh giá ứng dụng thực tế của xét nghiệm trong bối cảnh lâm sàng thực tế, nơi mà mức độ dấu ấn sinh học

trong các mẫu huyết tương thường thấp, do đó đặt ra nhiều khó khăn cho việc phát hiện.

Phát hiện của chúng tôi cho thấy 34 trong số 46 bệnh nhân UTĐTT có xét nghiệm dương tính với mSEPT9, mang lại độ nhạy là 73,91% với khoảng tin cậy 95% (CI: 58,87 – 85,73). Trong nhóm chứng khỏe mạnh, 10 trong số 50 (20%) cho kết quả dương tính giả, dẫn đến độ đặc hiệu là 80% (CI 95%: 66,28 – 89,97). Giá trị dự đoán dương tính (PPV) và giá trị dự đoán âm tính (NPV) của xét nghiệm lần lượt là 77,23% và 76,92%, cho thấy hiệu quả của xét nghiệm trong việc xác định chính xác cả trường hợp dương tính thực sự và âm tính thực sự. Phân tích đường cong ROC xác nhận thêm độ chính xác chẩn đoán trung bình của xét nghiệm với diện tích dưới đường cong (AUC) là 0,77 (95%CI: 0,67 – 0,85). Khi phân tích mối liên quan của đặc điểm mSEPT9 dương tính và mSEPT9 âm tính với các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng thì thấy mối liên quan có ý nghĩa thống kê với giai đoạn TNM của khối u với $p < 0,05$. Tỷ lệ mSEPT9 có xu hướng tăng lên ở nhóm bệnh nhân khối u tiến triển tại chỗ, tại vùng (giai đoạn III) và nhóm bệnh nhân di căn xa (giai đoạn IV). So sánh những kết quả này với những kết quả được báo cáo trong nghiên cứu của deVos et al. (2009)^[6], những phát hiện của chúng tôi chứng minh độ nhạy tương tự nhưng độ đặc hiệu thấp hơn một chút. Tương tự như trong nghiên cứu của Sun et al^[7] cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu của mSEPT9 là 73.0% và 94.5%, AUC 0.835 và Lu et al^[8] cũng cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu của mSEPT9 là 72.94% và 81.97%, AUC 0.826. Xét nghiệm mSEPT9 trong nghiên cứu của deVos et al. và đa số các nghiên cứu, sử dụng kỹ thuật HeavyMethyl, đã xác định thành công 72% bệnh ung thư với độ đặc hiệu 93% trong nghiên cứu đào

tạo và 68% bệnh ung thư với độ đặc hiệu 89% trong nghiên cứu thử nghiệm. Đáng chú ý, deVos et al. cũng quan sát thấy tỷ lệ dương tính tăng lên khi bệnh tiến triển, tương tự như xu hướng đáng kể mà chúng tôi quan sát thấy trong nghiên cứu của mình. Không giống như kỹ thuật HeavyMethyl dựa vào các đầu dò được sửa đổi tốn kém, xét nghiệm PCR của chúng tôi sử dụng các đoạn môi tiêu chuẩn mà không cần thiết kế đầu dò đất tiền hoặc các nucleotide được sửa đổi. Điều này không chỉ đơn giản hóa việc thiết lập xét nghiệm mà còn có khả năng giảm chi phí, giúp phương pháp này dễ tiếp cận hơn cho các ứng dụng lâm sàng lớn hơn. Hơn nữa, nghiên cứu của chúng tôi không tìm thấy mối tương quan đáng kể nào giữa sự hiện diện của mSEPT9 và các thực thể bệnh lý mạn tính như bệnh tiểu đường typ 2, tăng huyết áp hoặc các tình trạng bệnh lý đi kèm khác, cho thấy mSEPT9 là một dấu ấn sinh học mạnh mẽ không phụ thuộc vào các yếu tố này. Phân tích so sánh nhấn mạnh những lợi thế thực tế của phương pháp tiếp cận sáng tạo của chúng tôi trong việc tăng cường phát hiện mSEPT9 để chẩn đoán và theo dõi ung thư sớm, phù hợp với những nỗ lực đang diễn ra nhằm cải thiện hiệu quả sàng lọc UTĐTT và khả năng chi trả trong nhiều bối cảnh điều kiện y tế khác nhau.

Phân đánh giá sự biến động của mSEPT9 trước và sau điều trị trong nghiên cứu của chúng tôi nhằm mục đích đánh giá sơ bộ khả năng theo dõi những thay đổi về tình trạng biểu hiện mSEPT9 của mẫu máu ngoại vi trước và sau điều trị phẫu thuật. Trong phân tích này, trong số những bệnh nhân UTĐTT có xét nghiệm dương tính với mSEPT9 trong huyết tương trước khi điều trị, 16 người có mẫu máu sau phẫu thuật để phân tích một tuần sau phẫu thuật. Trong số này, 13 người

đã phẫu thuật với mục đích cắt bỏ hoàn toàn khối u, thấy rằng 10 trong số những bệnh nhân này có sự thay đổi từ trạng thái mSEPT9 dương tính sang âm tính, cho thấy việc cắt bỏ khối u đã thành công. Ngược lại, 03 bệnh nhân vẫn dương tính với mSEPT9, chỉ ra khả năng bệnh còn sót lại. Cụ thể, một bệnh nhân, người vẫn có xét nghiệm dương tính với mSEPT9 trong huyết tương, đã xác nhận khối u còn sót lại ở rìa phẫu thuật (R1), nhấn mạnh khả năng phát hiện khối u đã cắt bỏ không hoàn toàn của xét nghiệm. Điều này làm nổi bật giá trị của mSEPT9 như một dấu ấn sinh học để đánh giá kết quả phẫu thuật và theo dõi các dấu hiệu tái phát sớm, cung cấp những hiểu biết quan trọng để tăng cường quản lý sau phẫu thuật trong theo dõi ung thư đại trực tràng. Những hiểu biết sâu sắc hơn đã thu được từ việc phân tích các bệnh nhân UTĐTT di căn trong nhóm phụ này, phản ánh nghiên cứu của Liu và cộng sự (2021), trong đó nghiên cứu về vai trò của mSEPT9 trong việc theo dõi và dự đoán tiên lượng ở bệnh nhân UTĐTT giai đoạn IV có di căn gan^[9]. Tương tự như những phát hiện của họ, nghiên cứu của chúng tôi quan sát thấy rằng trong số 05 bệnh nhân giai đoạn IV, hai người đã trải qua các cuộc phẫu thuật mở rộng bao gồm cắt bỏ toàn bộ khối u nguyên phát và các di căn liên quan đã có kết quả xét nghiệm âm tính với mSEPT9 sau phẫu thuật. Những trường hợp phẫu thuật thành công này bao gồm một bệnh nhân bị ung thư trực tràng cao di căn gan 1 ổ duy nhất đã được cắt bỏ đồng thời trực tràng cao, thùy gan trái; và một bệnh nhân khác bị ung thư đại tràng sigma đã xâm lấn buồng trứng trái và ống dẫn trứng, đã được cắt bỏ hoàn toàn khối u nguyên phát và cơ quan xâm lấn, đạt được diện cắt âm tính (R0).

Tuy nhiên, 03 bệnh nhân còn lại, những bệnh nhân chỉ cắt bỏ khối u nguyên phát và chưa điều trị tổn thương di căn gan đa ổ, đã biểu hiện các kết quả mSEPT9 sau phẫu thuật khác nhau: 02 bệnh nhân vẫn dương tính, cho thấy bệnh tiềm ẩn còn sót lại, trong khi một bệnh nhân bất ngờ có kết quả xét nghiệm âm tính. Cả 03 bệnh nhân đều được điều trị duy trì giống nhau với bevacizumab và phác đồ hóa trị dựa trên 5-FU. Kết quả sống sót trong những trường hợp này cho thấy có mối tương quan, mặc dù không chắc chắn, do quy mô mẫu nhỏ: 02 bệnh nhân có tình trạng mSEPT9 dương tính liên tục sau phẫu thuật đều tử vong trong vòng 22 tháng sau phẫu thuật. Ngược lại, bệnh nhân có tình trạng mSEPT9 sau phẫu thuật chuyển sang âm tính vẫn sống và ổn định về mặt lâm sàng theo cùng một liệu pháp duy trì, không có dấu hiệu tái phát, 23 tháng sau phẫu thuật tính đến tháng 5 năm 2024.

Những phát hiện này, mặc dù là tạm thời, làm nổi bật vai trò của mSEPT9 như một dấu hiệu cho cả tình trạng tồn dư khối u và theo dõi tái phát. Theo dõi thường xuyên mSEPT9 ở những bệnh nhân ban đầu trở lại trạng thái âm tính sau phẫu thuật có thể giúp phát hiện sớm tình trạng tái phát, đặc biệt nếu mức mSEPT9 trở lại dương tính. Điều này có thể báo hiệu sự tái phát của khối u, cho thấy cần có các chiến lược theo dõi và điều trị tích cực hơn. Với số lượng ca bệnh hạn chế, những quan sát này mang tính gợi ý hơn là mang tính quyết định và nhấn mạnh nhu cầu nghiên cứu sâu hơn với quy mô mẫu lớn hơn để xác nhận những mối tương quan tiềm ẩn này và tăng cường quản lý và kết quả của bệnh nhân ung thư đại trực tràng.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi giới thiệu xét nghiệm PCR sử dụng sáng tạo phân tích đường cong nóng chảy DNA để phát hiện mSEPT9 lưu hành ở bệnh nhân UTĐTT. Phương pháp mới sử dụng các đầu dò chặn có thể kéo dài (ExBP), tăng cường đáng kể khả năng phát hiện DNA methyl hóa ở mức thấp, có khả năng phân biệt mSEPT9 ngay cả trong các mẫu có SEPT9 không methyl hóa ở nồng độ cao hơn tới 100.000 lần. Phương pháp này xác định duy nhất mSEPT9 bằng cách phân tích nhiệt độ nóng chảy đặc trưng của các sản phẩm PCR, một phương pháp tiếp cận sáng tạo giúp tăng cường khả năng phát hiện mức DNA methyl hóa rất thấp của xét nghiệm trong bối cảnh SEPT9 không methyl hóa cao. Sự tinh vi về mặt kỹ thuật của xét nghiệm, kết hợp với hiệu suất lâm sàng của nó đạt được độ nhạy 73,91% và độ đặc hiệu 80% không chỉ nâng cao tính hữu ích của xét nghiệm này trong việc sàng lọc UTĐTT mà còn định vị nó như một công cụ vô giá để theo dõi tiến triển và tái phát của bệnh. Mỗi tương quan được quan sát thấy giữa trạng thái mSEPT9 âm tính sau phẫu thuật và kết quả thuận lợi của bệnh nhân càng làm nổi bật thêm tiềm năng của nó như một dấu ấn sinh học tiên lượng. Những phát hiện này khuyến khích việc tích hợp xét nghiệm mSEPT9 của chúng tôi vào thực hành lâm sàng thường quy và tạo tiền đề cho nghiên cứu rộng hơn. Các nghiên cứu trong tương lai được thúc đẩy để xác nhận xét nghiệm này trong các quần thể lớn hơn và đa dạng hơn, nhằm củng cố khả năng ứng dụng lâm sàng của nó và xác nhận lợi ích của nó trong các bối cảnh chăm sóc sức khỏe khác nhau, do đó có khả năng cách mạng hóa việc

quản lý UTĐTT thông qua phát hiện sớm và theo dõi hiệu quả điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Xi, Y. and P.J.T.o. Xu**, Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. 2021. 14(10): p. 101174.
2. **Miller, K.D., et al.**, Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. CA Cancer J Clin, 2022. 72(5): p. 409-436.
3. **Young, C., et al.**, The colorectal cancer-associated faecal microbiome of developing countries resembles that of developed countries. Genome Med, 2021. 13(1): p. 27.
4. **Jin, P., et al.**, Performance of a second-generation methylated SEPT9 test in detecting colorectal neoplasm. J Gastroenterol Hepatol, 2015. 30(5): p. 830-3.
5. **Wu, D., et al.**, Detection of Colorectal Cancer Using a Simplified SEPT9 Gene Methylation Assay Is a Reliable Method for Opportunistic Screening. J Mol Diagn, 2016. 18(4): p. 535-45.
6. **deVos, T., et al.**, Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. Clin Chem, 2009. 55(7): p. 1337-46.
7. **Sun, J., et al.**, The role of (m)SEPT9 in screening, diagnosis, and recurrence monitoring of colorectal cancer. BMC Cancer, 2019. 19(1): p. 450.
8. **Lu, P., et al.**, Methylated septin 9 as a promising biomarker in the diagnosis and recurrence monitoring of colorectal cancer. 2022. 2022.
9. **Liu, W., et al.**, mSEPT9 Can Monitor the Response and Predict the Prognosis of Stage IV Colorectal Cancer Patients with Liver Metastasis Undergoing Potentially Curative Surgery. J Surg Res, 2021. 267: p. 485-494.

TẠP CHÍ



Y DƯỢC HỌC QUÂN SỰ

Journal of Military Pharmaco-medicine

ISSN 1859-0748

Vol 50, N^o 5
28/6/2025

HỌC VIỆN QUÂN Y

MILITARY MEDICAL UNIVERSITY



TẠP CHÍ **Y DƯỢC HỌC QUÂN SỰ**

HỌC VIỆN QUÂN Y XUẤT BẢN

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP: PGS.TS. Nguyễn Xuân Kiên

PHÓ CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP: PGS.TS. Nghiêm Đức Thuận

TỔNG BIÊN TẬP: GS.TS. Trần Viết Tiến

ỦY VIÊN HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP:

PGS.TS. Trần Ngọc Tuấn

PGS.TS. Nguyễn Văn Nam

GS.TS. Mai Hồng Bằng

GS.TS. Tạ Thành Văn

GS.TS. Trần Diệp Tuấn

GS.TS. Nguyễn Duy Ánh

GS.TS. Hoàng Văn Minh

GS.TSKH. Nguyễn Thế Hoàng

GS.TS. Lê Năm

GS.TS. Nguyễn Linh Toàn

PGS.TS. Lê Hữu Song

PGS.TS. Phạm Xuân Phong

PGS.TS. Lương Công Thức

PGS.TS. Tạ Bá Thắng

PGS.TS. Trịnh Nam Trung

TS. Trần Quốc Việt

GS.TS. Phạm Gia Khánh

GS.TS. Nguyễn Tiến Bình

GS.TS. Lê Ngọc Thành

GS.TS. Phạm Như Hiệp

GS.TS. Nguyễn Trường Giang

GS.TS. Lê Văn Quảng

GS.TS. Nguyễn Hải Nam

GS.TS. Lâm Khánh

GS.TS. Nguyễn Như Lâm

GS.TS. Nguyễn Duy Bắc

PGS.TS. Đào Xuân Cơ

PGS.TS. Lê Văn Đông

PGS.TS. Vũ Nhất Định

PGS.TS. Trịnh Thế Sơn

TS. Chu Tiến Cường

GS.TS. Nguyễn Văn Ba

THƯ KÝ TÒA SOẠN: TS. Nguyễn Thị Hoài

TẠP CHÍ Y DƯỢC HỌC QUÂN SỰ SỐ 5 - 2025

MỤC LỤC

	Trang
1 Nghiên cứu định lượng đồng thời paracetamol và methocarbamol trong viên nén bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao <i>Nguyễn Thị Hồng Vân, Cao Văn Ánh, Nguyễn Văn Bạch</i> Simultaneous determination of paracetamol and methocarbamol in tablets by a high-performance liquid chromatography method	7
2 Ứng dụng hệ thống thông tin địa lý trong xây dựng bản đồ dịch tễ địa không gian một số bệnh truyền nhiễm tại tỉnh Yên Bái (2014 - 2023) <i>Hoàng Anh Tuấn, Nguyễn Đình Việt, Nguyễn Đức Kiên</i> <i>Trần Quang Trung, Nguyễn Hải Sâm</i> <i>Vũ Ngọc Hoàn, Lê Huỳnh Tiến Dũng, Bùi Mạnh Hưng</i> Application of geographic information systems in building a spatial epidemiological mapping of some infectious diseases in Yen Bai Province (2014 - 2023)	17
3 Đánh giá độc tính cấp và ảnh hưởng của chế phẩm Bỏ phé Ngọc Thái đến thể trạng chung và các chỉ số huyết học trên động vật thực nghiệm <i>Trần Thị Thu Hiền, Nguyễn Thanh Hà Tuấn</i> Assessment of acute toxicity and effects of Bo phe Ngoc Thai on general health and hematological indices in experimental animals	27
4 Nghiên cứu tối ưu hóa tạo khối tế bào CAR-T <i>Ngô Thu Hằng, Cấn Văn Mão</i> Study on optimizing the production of CAR-T cell mass	36
5 Đánh giá độc tính cấp và ảnh hưởng của chế phẩm Định tâm Ngọc Thái tới một số chỉ số huyết học trên nghiên cứu thực nghiệm <i>Nguyễn Thị Ngọc Quyên, Nguyễn Thanh Hà Tuấn</i> Evaluation of acute toxicity and effects of Dinh tam Ngoc Thai formulation on some hematological parameters in an experimental study	44

	Trang
6 Chuyển nạp các cấu trúc plasmid và minicircle sleeping beauty vào tế bào lympho T bằng công nghệ nucleofector <i>Cán Văn Mão, Ngô Thu Hằng</i> Transposition of sleeping beauty plasmid and minicircle into T cells using nucleofector technology	52
7 Nghiên cứu thay đổi kiến thức của các bác sỹ quân y sau tập huấn về đáp ứng y tế trong thảm họa và một số yếu tố liên quan <i>Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Như Lâm, Trần Đình Hùng</i> <i>Ngô Minh Đức, Nguyễn Đại, Lương Trung Hiếu</i> Research on changes in the knowledge of military doctors after training on disaster medical response and some related factors	60
8 Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh rối loạn dự trữ glycogen type 6 <i>Triệu Tiến Sang, Trần Văn Khoa, Nguyễn Văn Phong</i> <i>Trịnh Thế Sơn, Nguyễn Thanh Tùng</i> Preimplantation genetic diagnosis of glycogen storage disease type 6	69
9 Giá trị ngưỡng cắt diện tích mỡ nội tạng trên chụp cắt lớp vi tính trong chẩn đoán hội chứng chuyển hóa ở người kiểm tra sức khỏe tại Bệnh viện Chợ rẫy <i>Cao Thị Hồng, Lữ Lâm Ngân, Tạ Quang Thành</i> Cut-off values for computed tomography-defined visceral fat area to identify metabolic syndrome in health-check examinees at Cho Ray Hospital	78
10 Giá trị chẩn đoán ung thư phổi không tế bào nhỏ của dấu ấn methyl hóa SHOX2 trong máu ngoại vi <i>Phương Ngọc Anh, Đinh Văn Lượng</i> <i>Nguyễn Đức Hạnh, Nguyễn Văn Ba, Hồ Hữu Thọ</i> Diagnostic value of SHOX2 methylation in plasma for non-small cell lung cancer	88

	Trang
11 Nghiên cứu giá trị của methyl hoá gene <i>SEPT9</i> huyết tương trong chẩn đoán ung thư đại trực tràng <i>Dương Thùy Linh, Vũ Anh Hải, Nguyễn Văn Hùng Hồ Hữu Thọ, Nguyễn Văn Ba</i> Research on the value of methylation of the <i>SEPT9</i> gene in plasma for the diagnosis of colorectal cancer	97
12 Đánh giá kết quả sàng lọc trước sinh không xâm lấn phát hiện sớm lệch bội nhiễm sắc thể thai trên các thai phụ có nguy cơ cao bằng phương pháp làm giàu DNA thai tự do trong máu mẹ <i>Đào Thế Anh, Hồ Sỹ Hùng Đặng Tiến Trường, Nguyễn Duy Bắc</i> Assessment of non-invasive prenatal testing results for early detection of chromosomal aneuploidy in high-risk pregnant women using enrichment method for fetal cell-free DNA in maternal blood	106
13 Nhận xét một số đặc điểm vi môi trường u có giá trị tiên lượng trong ung thư biểu mô tuyến đại trực tràng <i>Đặng Thái Trà, Đặng Thành Chung, Trần Ngọc Dũng</i> Evaluation of some prognostic pathological features of tumor microenvironment in colorectal adenocarcinoma	114
14 Chẩn đoán giải phẫu bệnh sinh thiết thận ghép theo hệ thống phân loại Banff năm 2022 <i>Nguyễn Thùy Linh, Tô Phú Ân, Tạ Văn Đồng Đỗ Quang Anh, Trần Quang Hậu, Nguyễn Thu Hiền</i> Pathological diagnosis of renal allograft biopsy according to the 2022 Banff classification	123
15 Khảo sát kích thước đường thở vùng hầu trên phim chùm tia hình nón ở người bệnh rối loạn thái dương hàm tại Bệnh viện Răng Hàm Mặt Trung ương Hà nội năm 2024 <i>Võ Thị Thúy Hồng, Trần Thị Kim Liên, Nguyễn Anh Chi Vũ Hữu Trung, Phạm Thị Thu Hằng, Tạ Thu Anh Phan Thị Bích Hạnh, Phạm Thị Ngân</i> Survey on pharyngeal airway dimensions in cone-beam computed tomography in temporomandibular disorders patients at the National Hospital of Odonto-Stomatology, Hanoi in 2024	132

NGHIÊN CỨU GIÁ TRỊ CỦA METHYL HOÁ GENE *SEPT9*
HUYẾT TƯƠNG TRONG CHẨN ĐOÁN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG

Dương Thuỳ Linh^{1}, Vũ Anh Hải¹, Nguyễn Văn Hùng²*

Hồ Hữu Thọ³, Nguyễn Văn Ba⁴

Tóm tắt

Mục tiêu: Nghiên cứu giá trị của methyl hoá gene *SEPT9* (m*SEPT9*) máu ngoại vi trong chẩn đoán ung thư đại trực tràng (UTĐTT). **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang có đối chứng trên 244 người tham gia, trong đó có 92 người khoẻ mạnh kiểm tra sức khoẻ tại Bệnh viện Quân y 103 và 152 bệnh nhân (BN) UTĐTT điều trị tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện K từ tháng 01/2021 - 12/2024. Xét nghiệm m*SEPT9* máu ngoại vi được xác định bằng kỹ thuật semi nested PCR với mẫu dò khoá kéo dài chuỗi (Extendable Blocking Probes - ExBPs). **Kết quả:** Giá trị của m*SEPT9* phân biệt BN UTĐTT với người khoẻ mạnh đạt độ nhạy 76,31%, độ đặc hiệu 89,13%, giá trị chẩn đoán dương tính (positive predictive value - PPV) 92,06%, giá trị chẩn đoán âm tính (negative predictive value - NPV) 69,49%. Phân tích đường cong ROC ghi nhận giá trị chẩn đoán UTĐTT của m*SEPT9* có AUC đạt mức tốt 0,827 với $p < 0,0001$, nhóm người có m*SEPT9* dương tính có nguy cơ UTĐTT cao gấp 26,42 lần nhóm người có m*SEPT9* âm tính với $p < 0,0001$. Trong nhóm UTĐTT, BN có m*SEPT9* dương tính có nguy cơ giai đoạn muộn gấp 3,719 lần so với BN có m*SEPT9* âm tính với $p < 0,001$. **Kết luận:** m*SEPT9* có giá trị chẩn đoán UTĐTT với độ nhạy, độ đặc hiệu cao và sự thuận tiện, không xâm nhập đóng vai trò cải thiện chất lượng phát hiện sớm UTĐTT.

Từ khóa: Ung thư đại trực tràng; m*SEPT9*; Kỹ thuật semi-nested PCR.

¹Khoa Vật lý Xạ trị, Trung tâm Ung bướu, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

²Trung tâm Ung bướu, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

³Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

⁴Phòng Khoa học Quân sự, Học viện Quân y

*Tác giả liên hệ: Dương Thuỳ Linh (Bsduonglinh103@gmail.com)

Ngày nhận bài: 21/3/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 25/4/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i5.1266>

RESEARCH ON THE VALUE OF METHYLATION OF THE *SEPT9* GENE IN PLASMA FOR THE DIAGNOSIS OF COLORECTAL CANCER

Abstract

Objectives: To study the value of methylation of the *SEPT9* gene (m*SEPT9*) in peripheral blood for the diagnosis of colorectal cancer (CRC). **Methods:** A cross-sectional descriptive, controlled study was conducted on 244 participants, including 92 healthy individuals undergoing health checks at Military Hospital 103 and 152 patients with CRC monitored at Military Hospital 103 and the Vietnam National Cancer Hospital from January 2021 to December 2024. The detection of m*SEPT9* in peripheral blood was determined using the semi-nested PCR technique with an extended sequence probe (ExBP). **Results:** The early detection value of CRC using m*SEPT9* differentiated CRC patients from healthy individuals with a sensitivity of 76.31%, specificity of 89.13%, positive predictive value of 92.06%, and negative predictive value of 69.49%. ROC curve analysis recorded an AUC of 0.827 for the diagnostic value of CRC using m*SEPT9*, with $p < 0.0001$. Individuals with positive m*SEPT9* had a 26.42 times higher risk of CRC than those with negative m*SEPT9* ($p < 0.0001$). In the CRC group, patients with positive m*SEPT9* had a 3.719 times higher risk of progressing to late-stage disease compared to those with negative m*SEPT9* ($p < 0.001$). **Conclusion:** m*SEPT9* demonstrates high sensitivity and specificity as a diagnostic tool for CRC, and its convenience and non-invasive nature play a role in improving the quality of early screening for CRC.

Keywords: Colorectal cancer; *SEPT9* gene methylation; Semi-nested PCR technique.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng được phát hiện sớm có thể chữa khỏi hoàn toàn, giai đoạn bệnh tại thời điểm phát hiện là yếu tố tiên lượng thời gian sống còn toàn bộ 5 năm ở giai đoạn I là $> 90\%$, giảm xuống 70% ở giai đoạn II, 58% ở giai đoạn III, 15% ở giai đoạn IV, thậm chí giảm chỉ còn 5% [1]. Cho đến nay, tuy có rất nhiều tiến bộ trong tầm soát, chẩn đoán bệnh nhưng vẫn có khoảng 25% UTĐTT đã di căn tại thời điểm chẩn

đoán [2]. Mặc dù nội soi đại trực tràng sinh thiết được coi là tiêu chuẩn vàng trong sàng lọc và chẩn đoán UTĐTT với độ nhạy $93 - 94\%$ và độ đặc hiệu lên đến $99,8\%$ [3] nhưng tính xâm lấn, chi phí cao và tính phức tạp về tai biến khi thực hiện hạn chế tính phù hợp của xét nghiệm như một công cụ sàng lọc. Điều này dẫn đến đòi hỏi phát triển các xét nghiệm chẩn đoán không xâm lấn tăng cường phát hiện sớm và giảm các thủ thuật xâm lấn không cần thiết. Hiện tại,

dấu ấn sinh học chẩn đoán dựa trên methyl hóa DNA trong máu đối với UTĐTT đầu tiên được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) phê duyệt chấp thuận là xét nghiệm sàng lọc đại trực tràng với dấu ấn mSEPT9 từ tháng 4/2016 [4]. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu khẳng định được giá trị chẩn đoán phát hiện sớm UTĐTT của mSEPT9. Tuy nhiên, tại Việt Nam, chúng tôi chưa ghi nhận có nghiên cứu nào về giá trị chẩn đoán mSEPT9 máu ngoại vi ở BN UTĐTT. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: *Nghiên cứu giá trị của mSEPT9 huyết tương trong chẩn đoán UTĐTT.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 152 BN UTĐTT được chẩn đoán và điều trị tại Bệnh viện Quân y 103, Bệnh viện K và 92 người khỏe mạnh khám sức khỏe định kỳ tại Bệnh viện Quân y 103 từ tháng 01/2021 - 12/2024.

* *Tiêu chuẩn lựa chọn:*

- Nhóm bệnh: BN UTĐTT được chẩn đoán xác định bằng giải phẫu bệnh, được điều trị theo phác đồ của Bộ Y tế, xét nghiệm mSEPT9 huyết tương trước điều trị; đầy đủ hồ sơ bệnh án.

- Nhóm chứng: Người khỏe mạnh đi khám sức khỏe định kỳ, khám tổng thể đánh giá không mắc bệnh lý, được nội

soi toàn bộ đại trực tràng đánh giá không có polyp, không có khối u, không có tình trạng viêm đại trực tràng.

* *Tiêu chuẩn loại trừ:*

BN đã từng phẫu thuật, hoá trị, xạ trị trước khi xét nghiệm mSEPT9; BN mắc 2 loại ung thư; hồ sơ bệnh án và thông tin không rõ ràng.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu mô tả cắt ngang có đối chứng.

* *Cỡ mẫu và chọn mẫu:* Cỡ mẫu thuận tiện.

* *Biến số, chỉ tiêu nghiên cứu:* Đặc điểm chung về tuổi, giới tính của nhóm bệnh và nhóm chứng. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, giai đoạn bệnh TNM (theo AJCC - 2017). Biểu hiện tình trạng mSEPT9: Dương tính/âm tính. Xét nghiệm CEA ≤ 5 ng/mL là âm tính. CEA > 5 ng/mL là dương tính.

* *Các bước tiến hành nghiên cứu:*

Thu thập dữ liệu lâm sàng, cận lâm sàng, chẩn đoán giai đoạn bệnh UTĐTT theo TNM (AJCC - 2017). Thu thập bệnh án ngoại trú, kết quả nội soi đại trực tràng, khám tổng quát của nhóm người khỏe mạnh đi khám định kỳ.

Thu thập mẫu máu của BN UTĐTT xét nghiệm mSEPT9 trước điều trị. Thu thập mẫu máu của nhóm người khỏe mạnh xét nghiệm mSEPT9 trước nội soi đại trực tràng. Mẫu máu được đưa về xét nghiệm mSEPT9 tại Trung tâm Sinh

học phân tử, Viện nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y theo quy trình chuẩn xét nghiệm Nested-PCR sử dụng mẫu dò khoá có khả năng kéo dài chuỗi.

* *Xử lý số liệu:* Theo phần mềm SPSS 20.0, tính độ nhạy, độ đặc hiệu, chỉ số AUC, phân tích đường cong ROC, kiểm định sự khác biệt, chỉ số OR.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được Hội đồng Đạo đức Bệnh viện Quân y 103 thông qua theo Quyết định số 98/CNChT-HĐĐĐ, ngày 23/7/2020. Số liệu nghiên cứu được Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện K cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm chung của nhóm BN UTĐTT và nhóm chứng

Phân bố nhóm tuổi cho thấy trung vị tuổi ở nhóm BN UTĐTT là 63 tuổi, nhóm chứng là 44,5 tuổi. Phân bố giới tính trong nhóm UTĐTT có 51,3% nam giới, nhóm chứng có 51,1% nữ giới. Nhóm UTĐTT có ung thư đại tràng bên trái chiếm tỷ lệ cao nhất (40%), thấp nhất là ung thư đại tràng phải (23%). Phân bố về giai đoạn bệnh theo TNM (tumour nodes metastasis) cho thấy giai đoạn III chiếm tỷ lệ cao nhất (32,9%), giai đoạn I chiếm tỷ lệ thấp nhất (19,7%). Đặc điểm mô bệnh học ung thư biểu mô tuyến chiếm tỷ lệ cao nhất (82,9%), độ biệt hoá vừa chiếm 84,2%.

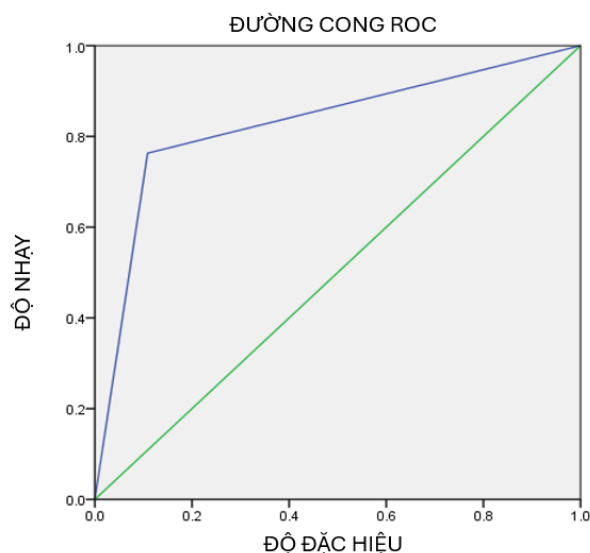
2. Giá trị chẩn đoán mSEPT9 huyết tương ở BN UTĐTT

Bảng 1. Giá trị độ nhạy, độ đặc hiệu, PPV, NPV của mSEPT9 trong chẩn đoán UTĐTT.

mSEPT9 huyết tương	UTĐTT n (%)	Không UTĐTT n (%)	Tổng
Âm tính	36 (30,5)	82 (69,5)	118
Dương tính	116 (92,1)	10 (7,9)	126
Giá trị xét nghiệm	95%CI		
Độ nhạy (%)	76,31		
Độ đặc hiệu (%)	89,13		
PPV (%)	92,06		
NPV (%)	69,49		
OR	26,42 (p = 0,0001)		

Phân tích xét nghiệm mSEPT9 đạt độ nhạy 76,3% với 95%CI: 68,75 - 82,82; độ đặc hiệu 89,1% với 95%CI: 80,91 - 94,66. PPV đạt 92,06% với 95%CI: 86,52 -

95,44; NPV đạt 69,49% với 95%CI: 62,92 - 75,35. Nhóm mSEPT9 dương tính có nguy cơ bị UTĐTT cao gấp 26,42 lần so với nhóm mSEPT9 âm tính (OR = 26,42, $p < 0,0001$).



Hình 1. Đường cong ROC của mSEPT9 trong chẩn đoán UTĐTT phân biệt với nhóm người khỏe mạnh.

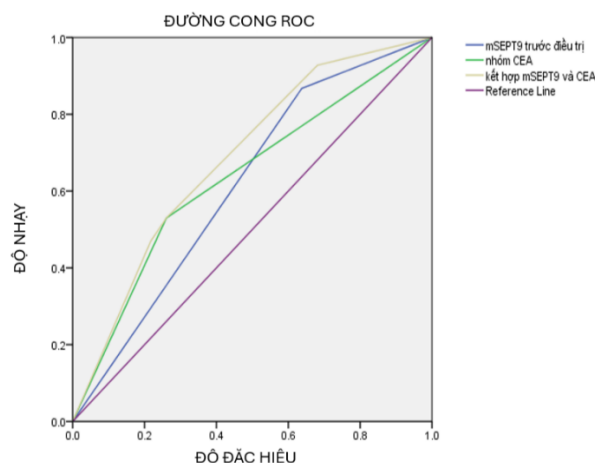
Giá trị chẩn đoán UTĐTT phân biệt với nhóm người khỏe mạnh, mSEPT9 có giá trị chẩn đoán mức độ tốt với AUC đạt 0,827 (95%CI: 77,3 - 88,2) $p < 0,0001$.

Bảng 2. Mức độ biểu hiện mSEPT9 huyết tương phân biệt UTĐTT giai đoạn sớm và UTĐTT giai đoạn muộn.

Biến số	mSEPT9 (-), n (%)	mSEPT9 (+), n (%)	n (%)
UTĐTT	36 (23,7)	116 (76,3)	152 (100)
Giai đoạn			
Giai đoạn sớm	25 (36,2)	44 (63,8)	69 (100)
Giai đoạn muộn	11 (13,3)	72 (86,7)	83 (100)
OR	3,719		
p	0,001		
95%CI	1,667 - 8,295		

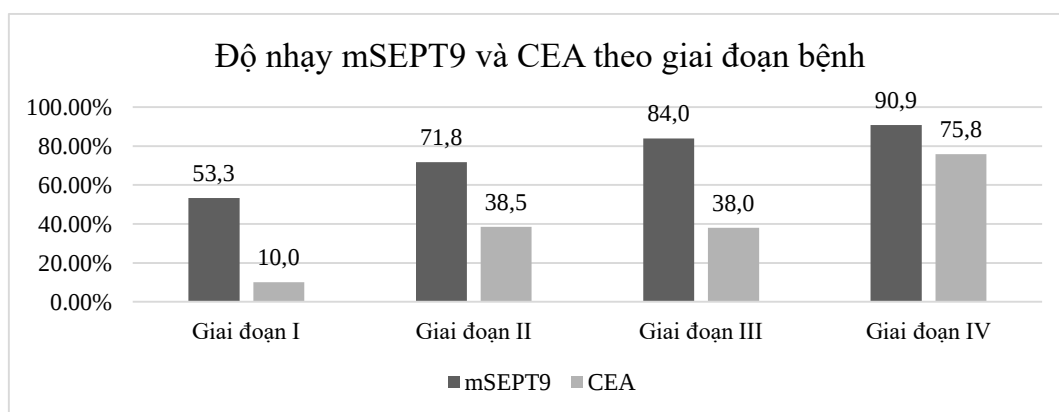
Trong nhóm BN UTĐTT giai đoạn muộn (giai đoạn III, IV) có 86,7% mSEPT9 dương tính, tỷ lệ mSEPT9 dương tính ở giai đoạn sớm (giai đoạn I, II) là 63,8%.

BN UTĐTT mSEPT9 dương tính có nguy cơ ung thư giai đoạn muộn cao gấp 3,719 lần so với nhóm mSEPT9 âm tính ($OR = 3,719, p < 0,001$).



Hình 2. Đường cong ROC kết hợp mSEPT9 và CEA trong chẩn đoán UTĐTT phân biệt giai đoạn sớm với giai đoạn muộn.

Giá trị chẩn đoán UTĐTT giai đoạn sớm (giai đoạn I và II) với giai đoạn muộn (giai đoạn III và IV) của mSEPT9 kết hợp CEA ở mức trung bình với AUC 0,686, $p < 0,05$, độ nhạy 86,7%, độ đặc hiệu 36,2%.



Biểu đồ 1. Giá trị chẩn đoán của mSEPT9 và CEA theo giai đoạn bệnh.

mSEPT9 cho thấy độ nhạy cao hơn ở tất cả các giai đoạn UTĐTT so với CEA. Cụ thể, ở giai đoạn I có 53,3% BN có mSEPT9 dương tính trong khi chỉ có 10% BN có CEA dương tính; ở giai đoạn II, mSEPT9 có thể phát hiện số lượng BN gần gấp đôi (71,8%) so với CEA (38,5%); ở giai đoạn III, mSEPT9 có khả năng phát hiện gấp 2,2 lần (84%) so với CEA (38,0%).

BÀN LUẬN

Để xác định giá trị chẩn đoán của mSEPT9 trong chẩn đoán UTĐTT, chúng tôi thiết kế nghiên cứu bệnh chứng và thu được kết quả xét nghiệm độ nhạy là 76,3%, độ đặc hiệu là 89,1%, PPV 92,1%, NPV 62,1%, giá trị chẩn đoán phân biệt UTĐTT với người khỏe mạnh ở mức tốt AUC đạt 0,827 với $p < 0,0001$; OR = 26,42, $p < 0,0001$. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với một số nghiên cứu trước đó, cụ thể: Theo tác giả Sun và CS (2019) [5] khi xét nghiệm mSEPT9 sàng lọc và chẩn đoán cho 600 trường hợp > 40 tuổi có nguy cơ cao mắc UTĐTT, 50 BN UTĐTT trước điều trị, ghi nhận độ nhạy và độ đặc hiệu của mSEPT9 là 73,0% và 94,5%, AUC là 0,8. Nghiên cứu của chúng tôi đạt độ nhạy cao hơn nhưng độ đặc hiệu thấp hơn so với nghiên cứu này. Theo tác giả Lu và CS (2022) [6] khi nghiên cứu nhóm 616 BN UTĐTT và 122 người khỏe mạnh được xét nghiệm mSEPT9 ghi nhận độ nhạy 72,94%, độ đặc hiệu 81,97%, AUC là 0,826. Nghiên cứu này đạt độ nhạy, độ đặc hiệu đều thấp hơn nghiên cứu của chúng tôi, về giá trị AUC thì có sự tương đồng. Theo tác giả Liang Min và CS (2023) [7] thực hiện phân tích gộp 79 nghiên cứu về giá trị của mSEPT9

trong chẩn đoán UTĐTT sử dụng bộ xét nghiệm thương mại Epi procolon 2.0 ghi nhận độ nhạy 0,679 (95%CI: 0,622 - 0,732), độ đặc hiệu là 0,903 (95%CI: 0,878 - 0,923), AUC là 0,8.

Ngoài ra, độ nhạy chẩn đoán của mSEPT9 cũng cao hơn so với độ nhạy của dấu ấn CEA với ngưỡng giá trị là 5 ng/mL ở tất cả các giai đoạn. Trong nghiên cứu của chúng tôi, độ nhạy phát hiện giai đoạn I là 53,3%, giai đoạn II là 71,8%, giai đoạn III là 84%, giai đoạn IV là 90,9%. Kết quả này của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu khác đều ghi nhận độ nhạy cao hơn đối với những BN có bệnh giai đoạn II - IV, có cải thiện về độ nhạy phát hiện ở giai đoạn I. Theo Sabine Leerhoff và CS (2023) [8] nghiên cứu trên 120 BN UTĐTT cũng ghi nhận độ nhạy phát hiện của mSEPT9 cao hơn so với độ nhạy phát hiện của CEA ở tất cả các giai đoạn bệnh với tỷ lệ dương tính của mSEPT9, CEA ở giai đoạn I là 33% so với 12%, giai đoạn II là 68% so với 35%, giai đoạn III là 48% so với 27%, giai đoạn IV là 84% so với 46%. Theo tác giả Quian Sun và CS (2024) [9] ghi nhận giá trị phát hiện mSEPT9 theo giai đoạn UTĐTT lần lượt là giai đoạn I 53%, giai đoạn II 76,5%, giai đoạn III 72,3%, giai đoạn IV 88,9%. Đồng thời,

trong nghiên cứu của chúng tôi khi phân nhóm giai đoạn sớm (giai đoạn I, II) khi khối u khu trú tại chỗ và nhóm giai đoạn muộn (giai đoạn III, IV) khi khối u tiến triển tại vùng có di căn hạch và di căn xa, ghi nhận giá trị chẩn đoán của mSEPT9 phối hợp CEA đạt AUC 0,686, $p < 0,05$, độ nhạy 86,7%, độ đặc hiệu 36,2%, OR = 3,719, $p < 0,001$.

Như vậy, mSEPT9 phát hiện trong máu ngoại vi là xét nghiệm có giá trị chẩn đoán phát hiện sớm UTĐTT phù hợp về cơ chế bệnh sinh của tình trạng methyl hoá DNA dẫn đến sự bất hoạt quá trình phiên mã, ức chế hoạt động các gene gây ung thư, đây là quá trình quan trọng trong sự thúc đẩy hình thành ung thư sớm. Trong đó, gene SEPT9 nằm trên nhiễm sắc thể 17q25.3 và có biểu hiện rộng rãi trong các tế bào người. Kết quả nghiên cứu xét nghiệm methyl hóa ở mức mô và huyết tương cho thấy vùng khởi động SEPT9-v2 đã bị methyl hóa gần như hoàn toàn ở BN UTĐTT và tiền ung thư [10]. Với kỹ thuật xét nghiệm Nested-PCR sử dụng mẫu dò khoá có khả năng kéo dài chuỗi, cải thiện được độ nhạy cao, đồng thời chi phí xét nghiệm tiết kiệm, tạo cơ hội mở rộng xét nghiệm tích hợp với lâm sàng trong thực hành điều trị cho BN.

KẾT LUẬN

Xét nghiệm mSEPT9 trong chẩn đoán UTĐTT đạt độ nhạy 76,3%, độ đặc hiệu 89,1%, PPV 92,1%, NPV 62,1%, giá trị chẩn đoán phân biệt UTĐTT với người khoẻ mạnh ở mức tốt AUC đạt 0,827, với OR = 26,42, $p < 0,0001$. Giá trị chẩn đoán mSEPT9 đạt độ nhạy cao hơn giá trị chẩn đoán của CEA ở tất cả các giai đoạn bệnh UTĐTT.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành tới các nhân viên của Trung tâm Sinh học Phân tử, Học viện Quân y; Ngoại bụng 1, Bệnh viện K; Trung tâm Ung bướu, Bệnh viện Quân y 103 và các BN tham gia nghiên cứu đã giúp chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Miller Kimberly D, et al. Cancer treatment and survivorship statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2022; 72(5):409-436.
2. Ajithkumar Priyadarshana, et al. Exploring potential epigenetic biomarkers for colorectal cancer metastasis. *Molecular Sciences*. 2024; 25(2):874.
3. Beniwal Shreya Singh, et al. Current status and emerging trends in colorectal cancer screening and diagnostics. *Biosensors*. 2023; 13(10):926.

4. Gao Xianchun, et al. DNA methylation biomarkers for early detection of gastric and colorectal cancers. *Cancer Biology and Medicine*. 2023; 20(12):955.
5. Sun J, et al. The role of (m)SEPT9 in screening, diagnosis, and recurrence monitoring of colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2019; 19(1):450.
6. Lu Pingxia, et al. Methylated septin 9 as a promising biomarker in the diagnosis and recurrence monitoring of colorectal cancer. *Disease Markers*. 2022.
7. Min Liang, et al. Using circulating tumor DNA as a novel biomarker to screen and diagnose colorectal cancer: A meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine*. 2023; 12(2):408.
8. Leerhoff Sabine, et al. Methylated Septin9 identified patients with colorectal carcinoma and showed higher sensitivity than conventional biomarkers in detecting tumor. *Cancer Treatment and Research Communication*. 2023; 36:100748.
9. Sun Qian, et al. Diagnostic performances of methylated septin9 gene, CEA, CA19-9 and platelet-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2024; 24(1):906
10. Lofton-Day Catherine, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clinical Chemistry*. 2008; 54(2):414-423.

TẠP CHÍ



Y DƯỢC HỌC QUÂN SỰ

Journal of Military Pharmaco-medicine

ISSN 1859-0748

Vol 50, N^o 6
28/8/2025

HỌC VIỆN QUÂN Y

MILITARY MEDICAL UNIVERSITY



TẠP CHÍ **Y DƯỢC HỌC QUÂN SỰ**

HỌC VIỆN QUÂN Y XUẤT BẢN

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP: PGS.TS. Nguyễn Xuân Kiên

PHÓ CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP: PGS.TS. Nghiêm Đức Thuận

TỔNG BIÊN TẬP: GS.TS. Trần Viết Tiến

ỦY VIÊN HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP:

PGS.TS. Trần Ngọc Tuấn
PGS.TS. Nguyễn Văn Nam
GS.TS. Mai Hồng Bằng
GS.TS. Tạ Thành Văn
GS.TS. Trần Diệp Tuấn
GS.TS. Nguyễn Duy Ánh
GS.TS. Hoàng Văn Minh
GS.TSKH. Nguyễn Thế Hoàng
GS.TS. Lê Năm
GS.TS. Nguyễn Lĩnh Toàn
PGS.TS. Lê Hữu Song
PGS.TS. Phạm Xuân Phong
PGS.TS. Lương Công Thức
PGS.TS. Tạ Bá Thắng
PGS.TS. Trịnh Nam Trung
TS. Trần Quốc Việt

GS.TS. Phạm Gia Khánh
GS.TS. Nguyễn Tiến Bình
GS.TS. Lê Ngọc Thành
GS.TS. Phạm Như Hiệp
GS.TS. Nguyễn Trường Giang
GS.TS. Lê Văn Quảng
GS.TS. Nguyễn Hải Nam
GS.TS. Lâm Khánh
GS.TS. Nguyễn Như Lâm
GS.TS. Nguyễn Duy Bắc
PGS.TS. Đào Xuân Cơ
PGS.TS. Lê Văn Đông
PGS.TS. Vũ Nhất Định
PGS.TS. Trịnh Thế Sơn
TS. Chu Tiến Cường
GS.TS. Nguyễn Văn Ba

THƯ KÝ TÒA SOẠN: TS. Nguyễn Thị Hoài

MỤC LỤC

	Trang
1 Đánh giá tính an toàn của viên nang mềm Hoàn lực kháng trên động vật thực nghiệm <i>Hoàng Văn Nghĩa, Phạm Thái Hà, Bùi Thị Thu Hà</i> <i>Bùi Thị Bích Vân, Phạm Anh Hòa, Nguyễn Văn Thịnh</i> <i>Vũ Tuấn Anh, Trần Bá Hiếu</i> Safety of the Hoan luc kang capsule in experimental animals	9
2 Thành phần hoá học và một số tác dụng sinh học của tinh dầu lá He (<i>Allium tuberosum</i>) <i>Nguyễn Thái An, Lương Phan Lâm Vũ</i> <i>Phạm Thảo Linh, Nguyễn Thanh Tùng</i> Chemical composition and biological activity of <i>Allium tuberosum</i> leaf essential oil	19
3 Nghiên cứu bào chế cao lỏng chứa echinacoside từ Nhục thung dung <i>Trần Bá Hiếu, Bùi Thị Thu Hà, Phạm Thái Hà</i> <i>Đỗ Thị Hương Lan, Đặng Văn Điệp</i> <i>Nguyễn Văn Thịnh, Vũ Tuấn Anh</i> Preparation of liquid extract containing echinacoside from <i>Cistanche deserticola</i>	29
4 Đánh giá khả năng gây độc và ung thư của tế bào CAR-T trên động vật thực nghiệm <i>Cán Văn Mão, Ngô Thu Hằng</i> Evaluation of the toxicity and carcinogenicity of CAR-T cells in experimental animals	39
5 Đặc điểm mô bệnh học và kết quả vi phẫu thuật thu tinh trùng từ tinh hoàn ở bệnh nhân Klinefelter vô tinh không khả <i>Trịnh Thế Sơn, Đoàn Thị Hằng, Phạm Đức Minh</i> <i>Trương Văn Phi, Đinh Hữu Việt</i> Testicular histopathology characteristics and results of testicular sperm extraction in azoospermic patients with non-mosaic Klinefelter syndrome	46

	Trang
6 Sự phân bố và ảnh hưởng của các kiểu gene <i>CYP2C9</i>, <i>CYP2C19</i> và <i>VKORC1</i> đến yêu cầu liều acenocoumarol ở bệnh nhân cao tuổi <i>Nguyễn Quốc Khoa, Dương Thị Thu Hằng, Đoàn Ngọc Anh</i> <i>Hoàng Minh Trường, Nguyễn Thị Hương, Đặng Thế Việt</i> <i>Tăng Thị Thu, Nguyễn Quang Hải, Phan Thị Lưu</i> <i>Đỗ Thanh Liêm, Trương Thị Huyền, Nguyễn Đức Công</i> Distribution and impact of <i>CYP2C9</i>, <i>CYP2C19</i>, and <i>VKORC1</i> genotypes on acenocoumarol dose requirements in elderly patients	54
7 Thay đổi thể tích nhóm nhân bụng của đồi thị theo tuổi và giới tính trên một quần thể người Việt Nam trưởng thành bình thường <i>Nguyễn Thị Kim Phụng, Tống Quốc Đông</i> <i>Lý Thiện Huy, Nguyễn Lê Chiến</i> Age- and gender- related volumetric changes of the ventral thalamic nuclei in a population of normal Vietnamese adults	64
8 Nghiên cứu biểu hiện mRNA một số gene liên quan đến con đường JAK/STAT ở tế bào ung thư phổi được điều trị bằng virus vaccine sởi phối hợp Cisplatin <i>Ngô Thu Hằng, Đặng Thùy Linh</i> <i>Nguyễn Mạnh Hà, Cấn Văn Mão</i> Study on the mRNA expression of some genes involved in the JAK/STAT signaling pathway in lung cancer cells treated with measles virus vaccine and cisplatin	73
9 Đặc điểm các vòng nối cửa chủ trên hình ảnh cắt lớp vi tính 64 dãy ở bệnh nhân xơ gan <i>Phùng Anh Tuấn, Đỗ Đường Quý</i> Characteristics of spontaneous portosystemic shunts on 64-row detector computed tomography in patients with cirrhosis	82
10 Vai trò của cắt lớp vi tính đa dãy ngực không tiêm cản quang trong đánh giá các tổn thương dạng u ở phổi <i>Hoàng Văn Lương, Nguyễn Ngọc Trung</i> The role of non-contrast multidetector chest computed tomography in the evaluation of pulmonary mass-like lesions	91

- 11 Nghiên cứu đặc điểm methyl hoá gene *SEPT9* huyết tương trước và sau phẫu thuật triệt căn ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng giai đoạn III

Dương Thùy Linh, Hồ Viết Hoàn, Nguyễn Khánh Vân
Hồ Hữu Thọ, Nguyễn Văn Ba

Research on the characteristics of *SEPT9* gene methylation in serum before and after surgery in patients with stage III colorectal cancer

100
- 12 Khảo sát chức năng thượng thận bằng nghiệm pháp hạ đường huyết bằng insulin ở bệnh nhân điều trị glucocorticoid tại Phòng khám Ngoại trú, Bệnh viện Nguyễn Tri Phương

Nguyễn Trúc Dung, Nguyễn Thành Tuấn, Trần Quang Khánh

Evaluation of adrenal function using the insulin tolerance test in patients receiving glucocorticoid therapy at the outpatient clinic, Nguyen Tri Phuong Hospital

109
- 13 Một số bất thường của thông động - tĩnh mạch tự thân và các yếu tố liên quan ở bệnh nhân lọc máu chu kỳ tại Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên

Trần Tuấn Tú, Lý Thị Thoa, Nguyễn Thị Ngọc Phương

Abnormalities of autologous arteriovenous fistula and related factors in hemodialysis patients at Thai Nguyen National Hospital

118
- 14 Đánh giá tình trạng nhiễm trùng huyết và tính kháng kháng sinh của một số vi khuẩn thường gặp ở bệnh nhân bạch cầu cấp điều trị hóa chất

Lê Thị Thu Huyền, Nguyễn Thanh Bình
Phạm Văn Hiệu, Phan Thị Thanh Long
Nguyễn Thị Thùy Trang, Phạm Thị Tuyết Nhung

Evaluation of bloodstream infection and antibiotic resistance patterns of common bacteria in patients with acute leukemia undergoing chemotherapy

127

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM METHYL HOÁ GENE *SEPT9* HUYẾT TƯƠNG
TRƯỚC VÀ SAU PHẪU THUẬT TRIỆT CĂN Ở BỆNH NHÂN
UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG GIAI ĐOẠN III

Dương Thuỳ Linh^{1}, Hồ Viết Hoàn¹, Nguyễn Khánh Vân²*

Hồ Hữu Thọ³, Nguyễn Văn Ba⁴

Tóm tắt

Mục tiêu: Nghiên cứu đặc điểm methyl hoá gene *SEPT9* (m*SEPT9*) máu ngoại vi trước và sau phẫu thuật triệt căn ở bệnh nhân (BN) ung thư đại trực tràng (UTĐTT) giai đoạn III. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang, theo dõi dọc trên 50 BN UTĐTT giai đoạn III, điều trị tại Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện K từ tháng 01/2021 - 12/2024. **Kết quả:** Tỷ lệ m*SEPT9* huyết tương dương tính sau phẫu thuật triệt căn là 34% (17/50 BN). giảm đáng kể so với trước phẫu thuật là 84% (42/50 BN). Phân tích đường cong ROC ghi nhận giá trị phân biệt tình trạng tiến triển khi kết hợp m*SEPT9* dương tính trước và sau phẫu thuật ở mức khá tốt (AUC = 0,755, $p < 0,05$). BN có m*SEPT9* dương tính sau phẫu thuật có nguy cơ tiến triển cao hơn, thời gian sống bệnh không tiến triển (progression-free survival - PFS) ngắn hơn so với BN m*SEPT9* âm tính sau phẫu thuật (OR = 7, $p < 0,05$). Phân tích đa biến ghi nhận m*SEPT9* sau phẫu thuật (HR: 10,738, $p < 0,05$) là yếu tố độc lập dự báo PFS ngắn hơn ở nhóm BN UTĐTT có m*SEPT9* dương tính sau phẫu thuật. **Kết luận:** m*SEPT9* có giá trị tiên lượng và theo dõi tiến triển sau phẫu thuật triệt căn ở BN UTĐTT giai đoạn III.

Từ khóa: Ung thư đại trực tràng giai đoạn III; Methyl gene *SEPT9*; Thời gian sống bệnh không tiến triển.

¹Trung tâm Ung bướu, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

²Cục Quân y, Tổng cục Hậu cần Kỹ thuật

³Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

⁴Bệnh viện Quân y 175

*Tác giả liên hệ: Dương Thuỳ Linh (Bsduonglinh103@gmail.com)

Ngày nhận bài: 30/3/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 22/5/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i6.1276>

RESEARCH ON THE CHARACTERISTICS OF *SEPT9* GENE METHYLATION IN SERUM BEFORE AND AFTER SURGERY IN PATIENTS WITH STAGE III COLORECTAL CANCER

Abstract

Objectives: To study the characteristics of *SEPT9* gene methylation (m*SEPT9*) in peripheral blood before and after radical surgery in patients with stage III colorectal cancer (CRC). **Methods:** A cross-sectional descriptive and longitudinal study was conducted on 50 patients with stage III CRC treated at Military Hospital 103 and Vietnam National Cancer Hospital from January 2021 to December 2024. **Results:** The percentage of positive m*SEPT9* in plasma after surgery was 34% (17/50 patients), significantly reduced compared to 84% (42/50 patients) before surgery. ROC curve analysis showed that the value of distinguishing the progression status when combining positive m*SEPT9* before and after surgery was good (AUC = 0.755, $p < 0.05$). Patients with positive m*SEPT9* after surgery have a higher risk of progression and shorter progression-free survival (PFS) than patients with negative m*SEPT9* after surgery (OR = 7, $p < 0.05$). Multivariate analysis indicated that m*SEPT9* after surgery (HR: 10.738, $p < 0.05$) is an independent predictive factor for significantly shorter PFS in stage III CRC patients with positive m*SEPT9* after surgery. **Conclusion:** m*SEPT9* has prognostic value and helps monitor progression after radical surgery in stage III CRC patients.

Keywords: Stage III colorectal cancer; Methylation of the *SEPT9* gene; Progression-free survival.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Globocan 2022, UTĐTT đứng thứ 3 về tỷ lệ mới mắc với 1.926.425 ca, đứng thứ 2 về tỷ lệ tử vong với 904.019 ca [1]. Điều này cho thấy tỷ lệ mắc và tỷ lệ tử vong của UTĐTT có xu hướng tăng trong những năm qua. Mặc dù, các chiến lược điều trị đang liên tục phát triển nhưng 30 - 50% BN ở giai đoạn I - III bị tái phát, di căn sau phẫu thuật, đây là lý do quan trọng nhất gây tử vong

[2]. Hiện tại, vẫn còn thiếu các phương pháp dự đoán tái phát của UTĐTT. Mặc dù kháng nguyên phôi thai ung thư (CEA - Carcinoembryonic Antigen) và cắt lớp vi tính (CLVT) là xét nghiệm chính theo dõi sau phẫu thuật, nhưng độ nhạy và độ đặc hiệu của CEA không cao. CLVT không thể lặp lại thường xuyên do bức xạ và giá thành cao, đặc biệt một số tổn thương tái phát di căn nhỏ không thể phát hiện được. Gần đây, phân tích

DNA khối u lưu thông (ctDNA) là chiến lược đầy hứa hẹn để phát hiện sự tồn tại tối thiểu của khối u, tuy nhiên, ctDNA không phát hiện được > 50% BN tái phát sau phẫu thuật, cho thấy độ nhạy khiêm tốn [3]. Do đó, thực sự cần có xét nghiệm hiệu quả để phát hiện sớm tái phát UTĐTT. Methyl hóa DNA là biến đổi biểu sinh quan trọng dẫn đến sự ức chế quá trình phiên mã và bất hoạt các gene sinh ung thư, đây là quá trình quan trọng trong phát sinh và tiến triển ung thư. Gene *SEPT9* nằm trên nhiễm sắc thể 17q25.3 và biểu hiện rộng rãi ở tế bào người. Kết quả các nghiên cứu về methyl hóa cho thấy vùng khởi động *SEPT9-v2* bị methyl hóa gần như hoàn toàn ở BN UTĐTT [4]. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về giá trị tiên lượng, theo dõi tái phát của m*SEPT9* ở BN UTĐTT. Tuy nhiên, tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về m*SEPT9* ở BN UTĐTT sau phẫu thuật triệt căn. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: *Nghiên cứu đặc điểm methyl hoá gene SEPT9 huyết tương trước và sau phẫu thuật triệt căn ở BN UTĐTT giai đoạn III.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 50 BN UTĐTT giai đoạn III được chẩn đoán và điều trị tại Bệnh viện

Quân y 103, Bệnh viện K từ tháng 01/2021 - 12/2024.

* *Tiêu chuẩn lựa chọn*: BN UTĐTT được chẩn đoán xác định bằng giải phẫu bệnh, chẩn đoán giai đoạn theo AJCC - 2017, điều trị theo phác đồ của Bộ Y tế có chỉ định phẫu thuật triệt căn; BN có đủ xét nghiệm m*SEPT9* huyết tương trước phẫu thuật và sau phẫu thuật triệt căn 7 ngày; BN đầy đủ hồ sơ bệnh án.

* *Tiêu chuẩn loại trừ*: BN có ≥ 2 ung thư; BN không có chỉ định phẫu thuật triệt căn; BN có tiến triển nặng sau phẫu thuật phải nằm hồi sức cấp cứu > 7 ngày sau mổ; hồ sơ bệnh án và thông tin không rõ ràng.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu*: Nghiên cứu mô tả cắt ngang có theo dõi dọc.

* *Cỡ mẫu và chọn mẫu*: Cỡ mẫu thuận tiện.

* *Biến số, chỉ tiêu nghiên cứu*: Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, giai đoạn bệnh TNM (theo AJCC - 2017). Xét nghiệm m*SEPT9*: Dương tính/âm tính. Ghi nhận PFS tính theo tháng bắt đầu từ lúc chẩn đoán xác định cho đến khi có bằng chứng về tiến triển tái phát hoặc di căn.

* *Các bước tiến hành nghiên cứu*:

Thu thập dữ liệu lâm sàng, cận lâm sàng, chẩn đoán giai đoạn bệnh UTĐTT theo TNM (AJCC - 2017). Thu thập

bệnh án nội trú theo dõi BN từ khi chẩn đoán, bắt đầu điều trị đến khi phát hiện có tái phát, di căn. Thu thập mẫu máu của BN UTĐTT xét nghiệm *mSEPT9* trước điều trị. Thu thập mẫu máu sau phẫu thuật triệt căn 7 ngày. Mẫu máu được đưa về xét nghiệm *mSEPT9* tại Trung tâm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

* *Xử lý số liệu*: Theo phần mềm SPSS 20.0, tính độ nhạy, độ đặc hiệu, chỉ số AUC, phân tích đường cong ROC,

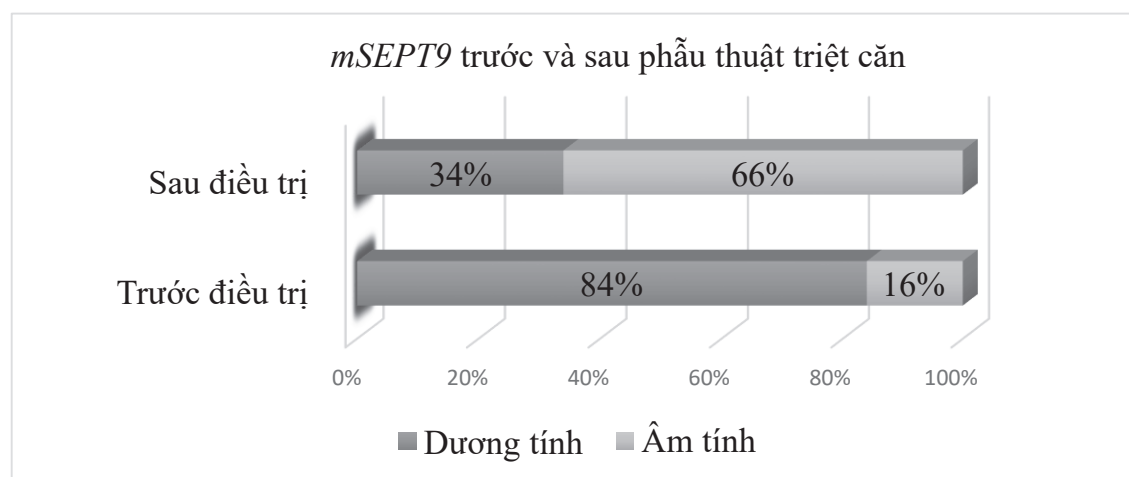
kiểm định sự khác biệt, chỉ số OR, phân tích ước lượng PFS theo phương pháp Kaplan Meier, phân tích hồi quy Cox.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được Hội đồng Đạo đức Bệnh viện Quân y 103 thông qua (số 98/CNChT-HĐĐĐ ngày 23/7/2020). Số liệu nghiên cứu được Bệnh viện Quân y 103, Bệnh viện K cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Biến động *mSEPT9* huyết tương ở BN UTĐTT trước và sau phẫu thuật



Hình 1. Sự thay đổi *mSEPT9* trước và sau phẫu thuật triệt căn.

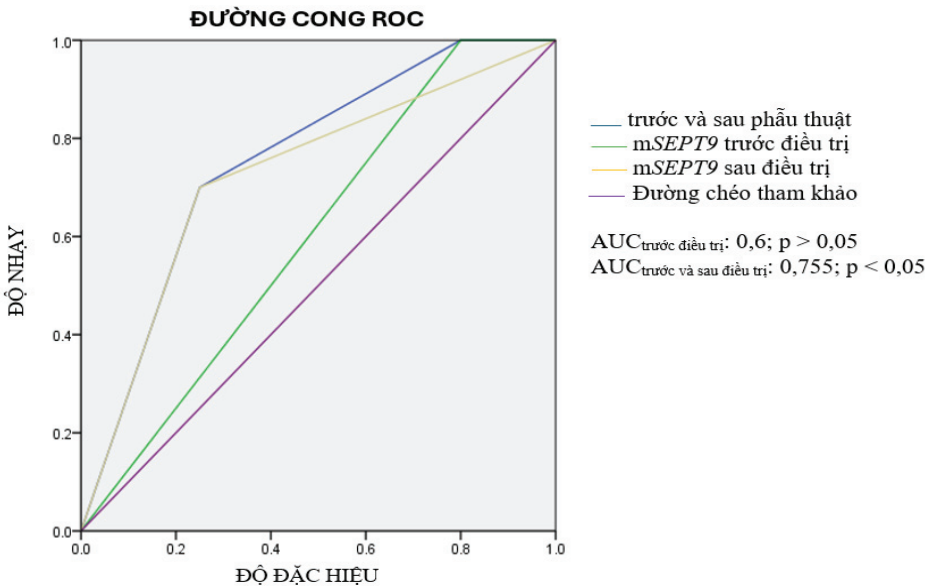
Xét nghiệm *mSEPT9* trên 50 BN UTĐTT giai đoạn III trước phẫu thuật và 7 ngày sau phẫu thuật triệt căn, tỷ lệ dương tính với *mSEPT9* huyết tương sau phẫu thuật là 34% (17/50) giảm đáng kể so với trước phẫu thuật là 84% (42/50), với sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ($p = 0,027$).

2. Mối liên quan giữa đặc điểm mSEPT9 sau phẫu thuật và PFS ở BN UTĐTT giai đoạn III sau phẫu thuật triệt căn

Bảng 1. Mối liên quan giữa mSEPT9 sau phẫu thuật và tình trạng tiến triển sau phẫu thuật triệt căn ở nhóm BN UTĐTT giai đoạn III.

Nhóm đối tượng	Không tiến triển n (%)	Tiến triển n (%)	Tổng
mSEPT9 sau phẫu thuật			
Âm tính	30 (90,9)	03 (9,1)	33 (100)
Dương tính	10 (58,8)	07 (41,2)	17 (100)
OR	7,000		
p	0,021 (95%CI: 1,515 - 32,333)		

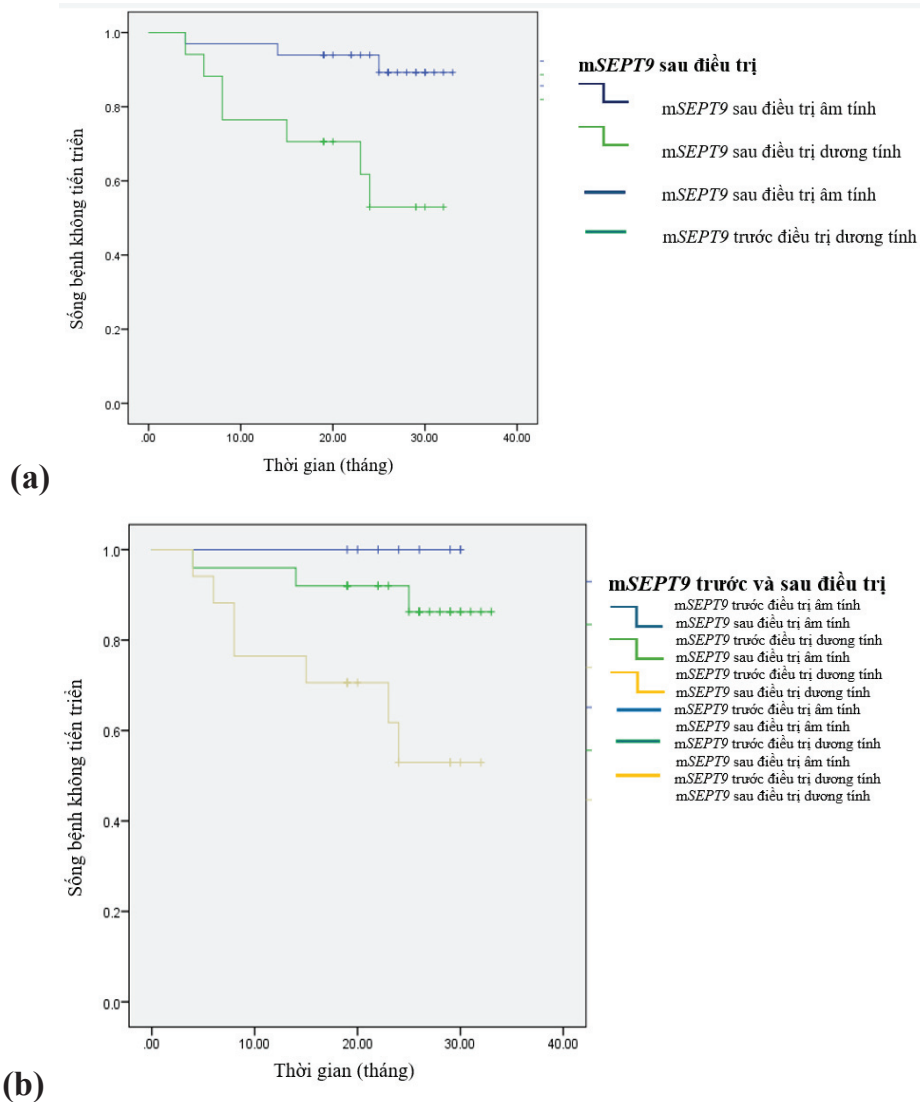
Trong 33 BN mSEPT9 âm tính sau phẫu thuật có 03 BN (9,1%) tiến triển, trong 17 BN mSEPT9 dương tính có 07 BN (41,2%) tiến triển. BN sau phẫu thuật triệt căn nhóm mSEPT9 dương tính có nguy cơ tái phát và di căn cao gấp 7 lần so với nhóm mSEPT9 âm tính sau phẫu thuật (OR = 7, $p < 0,05$).



Hình 2. Phân tích giá trị dự đoán tiến triển sau phẫu thuật khi kết hợp mSEPT9 trước và sau phẫu thuật ở BN UTĐTT giai đoạn III.

Phân tích đường cong ROC cho thấy mSEPT9 trước phẫu thuật không có ý nghĩa trong dự đoán tình trạng tiến triển của BN UTĐTT giai đoạn III sau phẫu

thuật triệt căn với $AUC = 0,6$; $p > 0,05$. Khi kết hợp với mSEPT9 sau phẫu thuật có giá trị dự đoán tình trạng tiến triển sau phẫu thuật triệt căn ở mức độ khá tốt ($AUC = 0,755$, $p < 0,05$).



Hình 3. Ước lượng tiến triển sau phẫu thuật triệt căn theo phương pháp Kaplan-Meier.
(a): mSEPT9 sau phẫu thuật, (b): mSEPT9 trước và sau phẫu thuật.

PFS ở nhóm mSEPT9 dương tính sau phẫu thuật ngắn hơn so với nhóm mSEPT9 âm tính sau phẫu thuật, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết hợp mSEPT9 trước và sau phẫu thuật thấy tiên lượng tốt nhất cho nhóm mSEPT9 âm tính trước và sau phẫu thuật; PFS ngắn nhất ở nhóm mSEPT9 dương tính cả trước và sau phẫu thuật, sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$ (kiểm định Log Rank).

Bảng 2. Hồi quy Cox cho PFS ở BN UTĐTT giai đoạn III.

Biến số		Đơn biến		Đa biến	
		PFS HR (95%CI)	p	PFS HR (95%CI)	p
Giới tính	Nam	1 (ref)	0,940	1 (ref)	0,853
	Nữ	0,953 (0,268 - 3,379)		0,869 (0,198 - 3,827)	
Tuổi	≤ 60	1 (ref)	0,606	1 (ref)	0,961
	> 60	1,387 (0,401 - 4,796)		0,961 (0,247 - 3,731)	
Vị trí u	ĐT phải	1 (ref)	0,461	1 (ref)	0,560
	ĐT trái	2,21 (0,267 - 18,439)		2,103 (0,173 - 25,637)	
	Trực tràng	1,221 (0,12 - 11,754)		3,271 (0,247 - 43,338)	
Chiều dài u (cm)	< 5	1 (ref)	0,210	1 (ref)	0,238
	≥ 5	2,375 (0,61 - 9,196)		0,345 (0,059 - 2,023)	
Đường kính (cm)	< 4	1 (ref)	0,092	1 (ref)	0,130
	≥ 4	3,207 (0,82 - 12,444)		0,259 (0,045 - 1,491)	
GPB	Noncarcinoma	1 (ref)	0,356	1 (ref)	0,976
	Carcinoma	0,037 (0,00 - 41,09)		0,746 (0,001 - 59,49)	
Độ mô học	G3	1 (ref)	0,599	1 (ref)	0,846
	G1+G2	0,574 (0,072 - 4,555)		0,787 (0,07 - 8,78)	
Giai đoạn T	T1 + T2	1 (ref)	0,674	1 (ref)	0,102
	T3 + T4	0,748 (0,193 - 2,895)		7,63 (0,669 - 86,99)	
mSEPT9 trước PT	Âm tính	1 (ref)	0,368	1 (ref)	0,977
	Dương tính	26,753 (0,021 - 3430)		0,001 (0,00 - 40,01)	
mSEPT9 sau PT	Âm tính	1 (ref)	0,012	1 (ref)	0,035
	Dương tính	5,677 (1,457 - 22,117)		10,738 (1,18 - 97,69)	

(GPB: Giải phẫu bệnh; ĐT: Đại tràng; PT: Phẫu thuật)

Phân tích đơn biến cho thấy mSEPT9 dương tính sau phẫu thuật (HR: 5,677, $p < 0,05$) liên quan đến thời gian PFS ngắn hơn so với nhóm mSEPT9 âm tính sau phẫu thuật. Phân tích đa biến ghi nhận mSEPT9 dương tính sau phẫu thuật triệt căn (HR: 10,738, $p < 0,05$) là yếu tố độc lập dự báo PFS ngắn hơn so với nhóm mSEPT9 âm tính sau phẫu thuật.

BÀN LUẬN

Để nghiên cứu về biến động của *mSEPT9* trước và sau điều trị triệt căn đồng thời bước đầu đánh giá khả năng tiên lượng dự đoán tiên triển sau phẫu thuật, chúng tôi lấy máu ngoại vi của BN UTĐTT xét nghiệm *mSEPT9* trước điều trị và sau phẫu thuật 7 ngày, theo dõi dọc ghi nhận thời điểm tái phát, di căn nếu có. Nghiên cứu thu được kết quả nhóm BN *mSEPT9* dương tính sau phẫu thuật có nguy cơ tiên triển cao hơn so với nhóm *mSEPT9* âm tính sau phẫu thuật ($OR = 7, p < 0,05$). Phân tích sống còn theo phương pháp Kaplan-Meier ghi nhận nhóm có *mSEPT9* dương tính sau phẫu thuật có PFS ngắn hơn đáng kể nhóm *mSEPT9* âm tính sau phẫu thuật, đồng thời khi phân tích đa biến nhận thấy *mSEPT9* sau phẫu thuật triệt căn ($HR: 10,738, p < 0,05$) là yếu tố độc lập dự báo PFS của BN UTĐTT. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với một số nghiên cứu trước đó, theo nghiên cứu của Yuan và CS (2022) [5], BN UTĐTT giai đoạn II - III sau phẫu thuật dương tính với *mSEPT9* có liên quan đáng kể với PFS kém hơn ($HR = 6,21, p < 0,001$) và *mSEPT9* vẫn là yếu tố dự báo độc lập mạnh nhất trong nghiên cứu đa biến Cox phân tích hồi quy ($HR = 5,83, p < 0,001$), vượt trội đáng kể so với CEA, CA19-9 và CA24-2. Theo tác giả Hua Gao và CS (2023), [6] tỷ lệ di căn ở BN có

mSEPT9 dương tính sau phẫu thuật là 81,25% (13/16), tỷ lệ di căn ở BN có *mSEPT9* âm tính sau phẫu thuật là 5,19% (04/77). Như vậy, tỷ lệ tiên triển di căn ở nhóm BN có *mSEPT9* dương tính sau phẫu thuật cao hơn nhiều so với nhóm BN có *mSEPT9* âm tính. Nghiên cứu của chúng tôi cũng ghi nhận 41,2% (07/17) BN tiên triển trong nhóm *mSEPT9* dương tính sau phẫu thuật cao hơn so với 9,1% (03/33) BN tiên triển trong nhóm *mSEPT9* âm tính sau phẫu thuật. Tác giả Rong Li và CS (2024) [7] theo dõi 30 BN UTĐTT trước phẫu thuật và 7 ngày sau phẫu thuật cũng ghi nhận tỷ lệ dương tính với *mSEPT9* huyết tương trong tuần sau phẫu thuật giảm đáng kể so với giai đoạn trước phẫu thuật (23,33% so với 66,67%), với sự thay đổi có ý nghĩa thống kê. Kết quả nghiên cứu trên lâm sàng về đặc điểm *mSEPT9* trước và sau phẫu thuật triệt căn cho thấy sự phù hợp với cơ chế bệnh sinh của UTĐTT gây ra do quá trình tăng tình trạng *mSEPT9* dẫn đến hậu quả ức chế phiên mã, mất chức năng bất hoạt khối u, kích hoạt các con đường tín hiệu quan trọng như Wnt/ β -catenin hoặc PI3K/AKT thúc đẩy phát triển và di căn UTĐTT [8]. Như vậy, đặc điểm *mSEPT9* sau phẫu thuật có thể được sử dụng đánh giá hiệu quả phẫu thuật cũng như tiên lượng nguy cơ tái phát di căn sau phẫu thuật ở BN UTĐTT.

KẾT LUẬN

Tỷ lệ mSEPT9 dương tính sau phẫu thuật triệt căn giảm đáng kể so với trước phẫu thuật. mSEPT9 dương tính sau phẫu thuật có giá trị dự đoán nguy cơ tiến triển cao hơn so với nhóm mSEPT9 âm tính sau phẫu thuật (OR = 7, $p < 0,05$), kết hợp đặc điểm mSEPT9 trước và sau phẫu thuật dự đoán tiến triển đạt AUC = 0,755, $p < 0,05$. Phân tích theo Kaplan-Meier ghi nhận nhóm mSEPT9 dương tính sau phẫu thuật có PFS kém hơn, đồng thời phân tích đa biến nhận thấy mSEPT9 sau phẫu thuật triệt căn (HR: 10,738, $p < 0,05$) là yếu tố độc lập dự báo PFS ngắn hơn ở nhóm BN UTĐTT có mSEPT9 dương tính sau phẫu thuật.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn các nhân viên của Trung tâm Sinh học phân tử, Học viện Quân y; Khoa Ngoại bụng 1, Bệnh viện K; Trung tâm Ung bướu, Bệnh viện Quân y 103 và các BN tham gia nghiên cứu đã giúp chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray Freddie, et al. GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Global Cancer Statistics*. 2022; 74(3):229-263.
2. Nors Jesper, et al. Incidence of recurrence and time to recurrence in stage I to III colorectal cancer: A nationwide danish cohort study. 2024; 10(1):54-62.
3. Gao Zhaoya, et al. Development and validation of postoperative circulating tumor DNA combined with clinicopathological risk factors for recurrence prediction in patients with stage I-III colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2023; 21(1):63.
4. Lofton-Day Catherine, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clinical Chemistry*. 2008; 54(2):414-423.
5. Yuan Zhen, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA analyses to predict recurrence risk and adjuvant chemotherapy benefit in stage II to III colorectal cancer. *Medical Science Monitor*. 2022; 28:e937757.
6. Gao Hua, et al. The value of serum methylated septin 9 and carcinoembryonic antigen in efficacy evaluation and follow-up monitoring of colorectal cancer. *Annali Italiani di Chirurgia*. 2023; 94(4):384-391.
7. Li Rong, et al. A study of the clinical significance of mSEPT9 in monitoring recurrence and prognosis in patients with surgically treated colorectal cancer. *Plos one*. 2024; 19(10):e0312676.
8. Krokowski Sina, et al. Bacterial cell division is recognized by the septin cytoskeleton for restriction by autophagy. *Autophagy*. 2019; 15(5):937-939.