

Đánh giá khả năng sử dụng Des- γ carboxy prothrombin huyết thanh trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan

Nguyễn Đăng Quân^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Thảo¹, Phạm Nguyễn Thanh Thuý¹,
Lê Thị Thuý Hằng², Trần Công Duy Long³, Đinh Minh Hiệp⁴

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh

²Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học

³Bệnh viện Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

⁴Ban Quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 5/4/2021; ngày chuyển phản biện 7/4/2021; ngày nhận phản biện 14/5/2021; ngày chấp nhận đăng 20/5/2021

Tóm tắt:

Ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular carcinoma - HCC) là một trong những bệnh ung thư phổ biến trên thế giới và ở Việt Nam. Hầu hết bệnh nhân HCC được chẩn đoán ở giai đoạn muộn, dẫn đến hiệu quả điều trị không cao. Vì vậy, chẩn đoán sớm HCC cho đối tượng có nguy cơ cao bằng chẩn đoán hình ảnh và các chỉ dấu huyết thanh có ý nghĩa quan trọng để kiểm soát căn bệnh này. Hiện nay, α -fetoprotein (AFP) là chỉ dấu huyết thanh được sử dụng phổ biến để tầm soát HCC. Tuy nhiên, AFP huyết thanh không đủ tin cậy trong chẩn đoán HCC, nhất là giai đoạn sớm. Mục tiêu của nghiên cứu này là bước đầu đánh giá giá trị chẩn đoán HCC của chỉ dấu Des- γ carboxy prothrombin (DCP). Nồng độ DCP và AFP trong huyết thanh của 50 bệnh nhân HCC giai đoạn sớm (giai đoạn A), 50 bệnh nhân HCC giai đoạn muộn (giai đoạn B và C), 50 bệnh nhân viêm gan không mắc HCC và 50 người không có yếu tố nguy cơ đã được định lượng. Phân tích đường cong ROC cho thấy, với giá trị ngưỡng (cut-off) 11,93 ng/ml, độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC của DCP tương ứng là 50 và 94%. Với HCC giai đoạn sớm, độ nhạy chẩn đoán bệnh của DCP là 34% trong khi độ đặc hiệu không thay đổi. Với chỉ dấu đang được sử dụng AFP, kết quả nghiên cứu cho thấy, ở giá trị ngưỡng 952,1 ng/ml, độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC của AFP là 39 và 95%. Với HCC giai đoạn sớm, AFP không có hiệu quả chẩn đoán bệnh. Kết hợp hai chỉ dấu huyết thanh DCP và AFP không giúp cải thiện độ nhạy phát hiện HCC so với khi chỉ sử dụng chỉ dấu DCP. Nghiên cứu cho thấy, chỉ dấu huyết thanh DCP có thể được sử dụng thay cho AFP trong chẩn đoán HCC và làm tăng độ nhạy chẩn đoán bệnh.

Từ khóa: α -fetoprotein, chẩn đoán, chỉ dấu huyết thanh, Des- γ carboxy prothrombin, ung thư tế bào gan.

Chỉ số phân loại: 3.5

Tổng quan

Ung thư gan là một trong tám dạng ung thư thường gặp trên thế giới. Tại Việt Nam, ung thư gan là loại ung thư phổ biến đứng hàng thứ 4 ở cả hai giới. Trong đó, HCC là dạng ung thư ác tính phổ biến chiếm tỷ lệ trên 80% các trường hợp ung thư gan, xảy ra chủ yếu ở những bệnh nhân nhiễm HBV, HCV mạn tính và xơ gan [1]. Việc chẩn đoán sớm có ý nghĩa rất quan trọng đối với hiệu quả điều trị bệnh ung thư gan. Nhiều kỹ thuật đã được áp dụng để chẩn đoán HCC như: chụp CT, siêu âm gan, chụp cộng hưởng từ, sinh thiết gan và định lượng chỉ dấu sinh học trong huyết thanh. Định lượng chỉ dấu sinh học trong huyết thanh là xét nghiệm đơn giản, không đòi hỏi thiết bị đắt tiền, thích hợp để chẩn đoán sàng lọc và hỗ trợ cho các kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh. Hiện nay, chỉ dấu protein trong chẩn đoán HCC được dùng phổ biến nhất tại Việt Nam là AFP. Tuy nhiên, 80% bệnh nhân HCC với khối u kích thước nhỏ không có sự gia tăng nồng độ AFP, độ nhạy của chẩn đoán HCC dựa trên chỉ dấu AFP là 52 và 25%, tương ứng với khối u có đường kính

lớn hơn và nhỏ hơn 3 cm [2]. Hơn nữa, 40-50% bệnh nhân HCC có nồng độ AFP trong huyết thanh nhỏ hơn ngưỡng chẩn đoán dương tính (<400 ng/ml) [3]. Một số bệnh nhân xơ gan và/hoặc viêm gan cũng có thể có sự tăng cao lượng AFP (có khi lên tới 2500 ng/ml) trong máu mà không có sự hiện diện của khối u [3, 4]. Như vậy, AFP chưa phải là một chỉ dấu huyết thanh tốt để chẩn đoán HCC, việc tìm kiếm và sử dụng một chỉ dấu protein khác của HCC là điều cần thiết. Đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới được thực hiện nhằm tìm kiếm các chỉ dấu mới để chẩn đoán HCC, trong đó DCP được xem là chỉ dấu nhiều triển vọng [5]. DCP còn được gọi là Protein induced by vitamin K absence or antagonist II (PIVKA-II), là một sản phẩm bất thường do sự rối loạn carboxyl hóa trong quá trình hình thành thrombogen. Nó hoạt động như một yếu tố tăng trưởng tự sinh của các dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào gan. Hàm lượng của protein này trong huyết thanh tăng lên rõ rệt ở các bệnh nhân HCC so với người khỏe mạnh và bệnh nhân u gan lành tính. Mặc dù một vài nghiên cứu có kết quả trái ngược, DCP trong

*Tác giả liên hệ: Email: ndquan.snn@tp HCM.gov.vn

Evaluating the diagnostic value of serum Des-γ carboxy prothrombin in the detection of hepatocellular carcinoma

Dang Quan Nguyen^{1*}, Thi Thanh Thao Nguyen¹,
Nguyen Thanh Thuy Pham¹, Thi Thuy Hang Le²,
Cong Duy Long Tran³, Minh Hiep Dinh⁴

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh city

²Center for Research and Application on Bioscience

³University Medical Center Ho Chi Minh city

⁴Management Board of Agricultural Hi-tech Park of Ho Chi Minh city

Received 5 April 2021; accepted 20 May 2021

Abstract:

Hepatocellular carcinoma (HCC) is amongst the most common cancers in the world and Vietnam. Most HCC patients are diagnosed late, so the effect of treatment is limited. Hence, early diagnosis for high-risk populations using medical imaging and serum markers is very important to control HCC. Recently, α -fetoprotein (AFP) has been popularly used as a serum marker for screening of HCC. Unfortunately, AFP is not trustworthy enough for HCC diagnosis, especially early HCC. Therefore, this study was deployed to estimate the ability of serum Des-γ carboxy prothrombin (DCP) applied in the diagnosis of HCC. DCP and AFP concentration in serum of 50 early HCC patients (stage A), 50 late HCC patients (stage B and C), 50 HBV/HCV-infected patients, and 50 healthy persons were identified. ROC curve analysis manifested that with the cut-off value at 11.93 ng/ml, DCP allowed identifying HCC cases with the sensitivity and specificity of 50 and 94%, respectively. With early HCC, the sensitivity of DCP decreased to 34%, while the specificity was unchanged. In the case of AFP, results showed that the sensitivity and specificity of this marker for HCC were 39 and 95%, with the cut-off value at 952.1 ng/ml. For early HCC, it was impossible to use AFP for diagnosis. The combination of DCP and AFP serum markers in the detection of HCC did not improve the sensitivity of the diagnosis compared to that of DCP alone. The study demonstrated that serum biomarker DCP can be used instead of AFP in the diagnosis of HCC, which improves the diagnostic sensitivity.

Keywords: α -fetoprotein, Des-γ carboxy prothrombin, diagnosis, hepatocellular carcinoma, serum marker.

Classification number: 3.5

huyết thanh và mô đã được nhiều công trình chứng minh là hữu ích hơn AFP trong việc phân biệt HCC với các bệnh gan không phải ung thư, nhất là trong chẩn đoán HCC với khối u nhỏ. Ngoài mục đích sàng lọc HCC, DCP huyết thanh còn có thể được dùng như dấu hiệu tiên lượng bệnh, đánh giá điều trị HCC và có thể phản ánh đặc điểm xâm lấn của khối u [6]. Hướng dẫn của Hiệp hội Nghiên cứu về gan châu Á - Thái Bình Dương (Asian Pacific association for the study of the liver - APASL) từ năm 2010 đã nhìn nhận DCP như là các chỉ dấu huyết thanh tiềm năng trong chẩn đoán và tầm soát HCC [7]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm góp phần làm rõ thêm cơ sở khoa học về giá trị lâm sàng của DCP trong chẩn đoán - tầm soát HCC, đặc biệt trên đối tượng nghiên cứu là người Việt Nam.

Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 4 nhóm đối tượng với tiêu chuẩn chọn mẫu như sau:

- Nhóm I: bệnh nhân được chẩn đoán HCC và xác định giai đoạn A dựa theo phác đồ hướng dẫn chẩn đoán của Hiệp hội Nghiên cứu bệnh gan Hoa Kỳ (AASLD) năm 2010.

- Nhóm II: bệnh nhân được chẩn đoán HCC và xác định giai đoạn B, C dựa theo phác đồ hướng dẫn chẩn đoán AASLD năm 2010.

- Nhóm III: bệnh nhân được chẩn đoán viêm gan siêu vi B mạn tính (nhưng không có HCC) dựa theo các tiêu chuẩn sau: HbsAg (+) kéo dài hơn 6 tháng; SGOT, SGPT tăng cao gấp 2 lần trị số bình thường; siêu âm gan không phát hiện sang thương bất thường.

- Nhóm IV: người không có yếu tố nguy cơ được xác định theo tiêu chuẩn: HbsAg (-) và AntiHCV (-); siêu âm gan không phát hiện sang thương bất thường; SGOT và SGPT trong giới hạn bình thường.

Các mẫu máu ngoại vi tham gia nghiên cứu được thu nhận tại Bệnh viện Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh.

Phương pháp tính cỡ mẫu

Cỡ mẫu được tính theo công thức: $n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{p(1-p)}{d^2}$

trong đó: n là cỡ mẫu; $Z_{(1-\alpha/2)}$ là giá trị phân bố chuẩn, được tính dựa trên mức ý nghĩa thống kê; p là tỷ lệ ước đoán; d là mức sai số tuyệt đối chấp nhận do nhà nghiên cứu chọn.

Với độ nhạy của DCP là 51,7% [8], cỡ mẫu n cho nhóm HCC được xác định khoảng 96 mẫu bằng các thông số: $Z=1,96$ (với sai lầm loại 1 là 5%); $p=0,517$; $1-p=0,483$; $d=0,1$. Cỡ mẫu thực tế được chọn là 100 bệnh nhân. Chọn mẫu phân tầng cho nhóm HCC [9]: 50 mẫu huyết thanh của bệnh nhân HCC giai đoạn A, 50 mẫu huyết thanh của bệnh nhân HCC giai đoạn B và C.

Với độ đặc hiệu của DCP là 86,7% [8, 10], cỡ mẫu n

cho nhóm không HCC được xác định khoảng 45 mẫu bằng các thông số: $Z=1,96$ (với sai lầm loại 1 là 5%); $p=0,867$; $1-p=0,133$; $d=0,1$. Cỡ mẫu thực tế được chọn là 100 bệnh nhân, do nhóm không HCC được phân tầng: 50 mẫu huyết thanh của bệnh nhân viêm gan siêu vi B mạn tính (không HCC), 50 mẫu huyết thanh người không có yếu tố nguy cơ.

Phương pháp thu nhận và bảo quản huyết thanh

Khoảng 2 ml máu toàn phần được cho vào ống thu máu không có chất chống đông (Tube traite, plain serum). Máu được để đông tự nhiên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó ly tâm mẫu ở 1000xg trong 15 phút, 4°C và thu nhận huyết thanh. Huyết thanh được chia thành 3 phần bằng nhau và trữ ở -80°C cho đến khi tiến hành định lượng các chỉ dấu sinh học.

Phương pháp ELISA định lượng DCP

Nồng độ DCP trong mẫu huyết thanh được xác định bằng phương pháp ELISA sử dụng kit thương mại (#MBS700977; MyBioSource, San Diego, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm tắt phương pháp như sau: chuẩn bị dãy pha loãng bậc 2 mẫu chuẩn trong sample diluent buffer, nồng độ mẫu chuẩn cao nhất là 20 ng/ml. Các mẫu huyết thanh được pha loãng 20 lần trong sample diluent buffer. Cho vào mỗi giếng của đĩa ELISA đã phủ sẵn kháng thể sơ cấp 100 µl mẫu chuẩn hoặc mẫu huyết thanh đã pha loãng. Ủ đĩa trong 30 phút ở 37°C. Rửa đĩa 3 lần bằng 200 µl wash buffer cho mỗi giếng trong mỗi lần rửa, loại bỏ dung dịch rửa giếng. Cho 100 µl/giếng HRP-conjugate 1X, ủ ở 37°C trong 30 phút. Rửa đĩa như trên 5 lần. Cho vào mỗi giếng 90 µl dung dịch cơ chất TMB. Ủ đĩa trong tối, ở 37°C trong 20 phút. Thêm 50 µl stop solution vào mỗi giếng để dừng phản ứng. Đo giá trị mật độ quang ở bước sóng 450 nm trên máy đọc ELISA 680-Bio-Rad.

Phương pháp ELISA định lượng AFP

Nồng độ AFP trong mẫu huyết thanh được xác định bằng phương pháp ELISA sử dụng kit thương mại (#KA0202; Abnova, Taipei, Taiwan) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm tắt phương pháp như sau: pha loãng các mẫu huyết thanh 20 lần trong Zero buffer. Cho 20 µl mẫu chuẩn ở các nồng độ khác nhau (0, 5, 20, 50, 150, 300 ng/ml) vào các giếng, thêm 100 µl Zero buffer. Ở các giếng thử nghiệm, cho 120 µl mẫu huyết thanh đã pha loãng vào các giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Loại bỏ dung dịch trong các giếng và rửa đĩa trong 2 phút bằng 300 µl nước vô trùng cho mỗi giếng/lần rửa. Lặp lại quá trình rửa đĩa như trên trong 5 lần. Bổ sung 150 µl enzyme conjugate reagent vào mỗi giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Rửa đĩa như trên 5 lần. Thêm 100 µl TMB Reagent vào mỗi giếng. Ủ đĩa trong tối ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Dừng phản ứng ở mỗi giếng bằng cách bổ sung 100 µl stop solution. Đo giá trị mật độ quang ở bước sóng 450 nm trên máy đọc ELISA 680-Bio-Rad.

Phương pháp phân tích thống kê

Giá trị trung vị nồng độ DCP và AFP của 4 nhóm mẫu huyết thanh được xác định và được xử lý thống kê Kruskal Wallis bằng phần mềm GraphPad prism. Hiệu quả chẩn đoán HCC của từng chỉ dấu DCP và AFP được xác định bằng đường cong ROC dựng bằng phần mềm GraphPad prism. Hiệu quả chẩn đoán HCC khi kết hợp 2 chỉ dấu DCP và AFP được phân tích bằng phương pháp hồi quy logistic sử dụng phần mềm SPSS kết hợp phân tích ROC bằng phần mềm GraphPad prism.

Giá trị chẩn đoán của mỗi chỉ dấu được xác định như sau:

Kết quả xét nghiệm	Có HCC (D+)	Không HCC (D-)	Tổng cộng
Dương tính (T+)	a (TP)	b (FP)	a+b (TP+FP)
Âm tính (T-)	c (FN)	d (TN)	c+d (FN+TN)
Tổng cộng	a+c (TP+FN)	b+d (FP+TN)	a+b+c+d=N

TP: true positive, dương tính thật; FP: false positive, dương tính giả; FN: false negative, âm tính giả; TN: true negative, âm tính thật.

$$\text{Độ nhạy (sensitivity)} = TP / (TP + FN) = a / (a + c) \times 100\%$$

$$\text{Độ đặc hiệu (specificity)} = TN / (FP + TN) = d / (b + d) \times 100\%$$

$$\text{Tỷ lệ dương tính giả (false positive rate: FPR)} = FP / (FP + TN) = b / (b + d) \times 100\%$$

$$\text{Tỷ lệ âm tính giả (false negative rate: FNR)} = FN / (FN + TP) = c / (c + a) \times 100\%$$

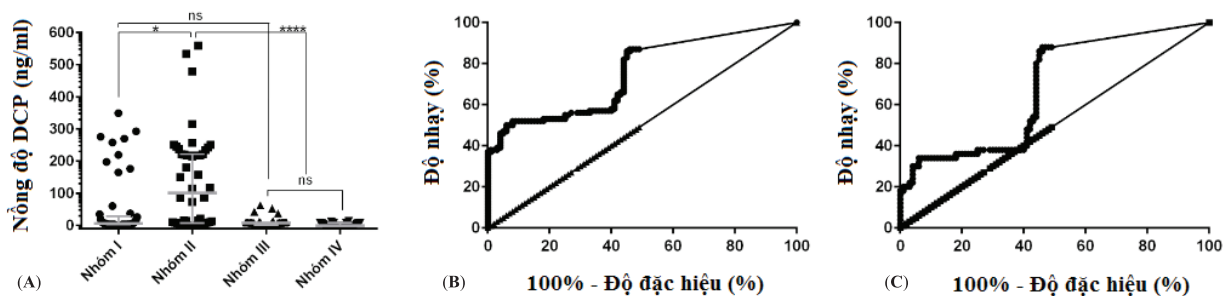
$$\text{Giá trị tiên đoán dương (positive predictive value: PPV)} = TP / (TP + FP) = a / (a + b) \times 100\%$$

$$\text{Giá trị tiên đoán âm (negative predictive value: NPV)} = TN / (TN + FN) = d / (c + d) \times 100\%$$

Kết quả

Giá trị chẩn đoán HCC của DCP

Kết quả định lượng DCP trong 200 mẫu huyết thanh cho thấy, nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn B, C có nồng độ DCP huyết thanh cao nhất trong 4 nhóm mẫu (với giá trị trung vị là 100,84 ng/ml), khác biệt có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó, nồng độ DCP huyết thanh của nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn A tương tự như nhóm bệnh nhân viêm gan không HCC (giá trị trung vị là 5,66 ng/ml so với 7,57 ng/ml), khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Nhóm không có yếu tố nguy cơ có nồng độ DCP thấp nhất trong 4 nhóm khảo sát (giá trị trung vị là 0,00 ng/ml). Tuy nhiên, xử lý thống kê cho thấy, nồng độ DCP huyết thanh của nhóm không có yếu tố nguy cơ không khác biệt so với nhóm bệnh nhân viêm gan. Như vậy, có thể thấy sử dụng chỉ dấu DCP cho phép phân biệt nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn B, C với các nhóm còn lại. Ở nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn A, nồng độ DCP huyết thanh có tăng cao ở một số trường hợp, nhưng về tổng thể vẫn khó phân biệt nhóm này với nhóm bệnh nhân viêm gan không HCC và nhóm không có yếu tố nguy cơ (hình 1A).



Hình 1. Giá trị chẩn đoán HCC của DCP. (A) Nồng độ DCP trong 4 nhóm mẫu huyết thanh khảo sát (n=50). Nhóm I: HCC giai đoạn A, nhóm II: HCC giai đoạn B-C, nhóm III: viêm gan không HCC, nhóm IV: không có yếu tố nguy cơ. Số liệu được xử lý thống kê Kruskal Wallis bằng phần mềm GraphPad prism; *, khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$, ****: khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,0001$, ns: khác biệt không có ý nghĩa. Vạch xám thể hiện trong hình là giá trị trung vị và khoảng tứ phân vị (interquartile range). (B) Phân tích đường cong ROC phép chẩn đoán HCC với chỉ dấu DCP cho 100 mẫu HCC. (C) Phân tích đường cong ROC phép chẩn đoán HCC với chỉ dấu DCP cho 50 mẫu HCC giai đoạn A.

Để xác định giá trị chẩn đoán HCC của chỉ dấu DCP huyết thanh, chúng tôi thực hiện hai phép phân tích đường cong ROC với 100 mẫu HCC/100 mẫu không HCC (hình 1B) và 50 mẫu HCC giai đoạn A/100 mẫu không HCC (hình 1C).

Các thông số thu được từ phân tích ROC với 100 mẫu HCC: diện tích dưới đường cong (area)=0,7531; độ tin cậy 95%; mức ý nghĩa $p < 0,0001$; cut-off nồng độ DCP để phân biệt HCC và không HCC là 11,93 ng/ml; độ nhạy (sensitivity) chẩn đoán HCC là 50%; độ đặc hiệu (specificity) chẩn đoán HCC là 94%; tỷ lệ dương tính giả (FPR) là 6%; tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 50%; giá trị tiên đoán dương (PPV) là 89,28%; giá trị tiên đoán âm (NPV) là 65,28% (hình 1B).

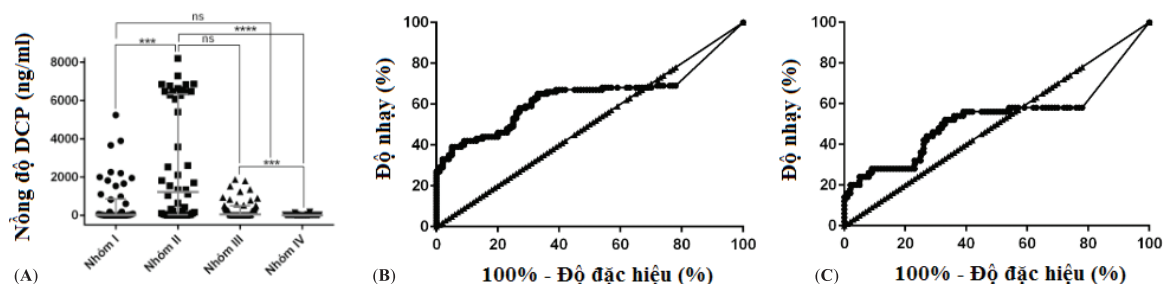
Các thông số thu được từ phân tích ROC với 50 mẫu HCC giai đoạn A: diện tích dưới đường cong (area)=0,6789; độ tin cậy 95%; mức ý nghĩa $p = 0,0004$; cut-off nồng độ DCP để phân biệt HCC giai đoạn A và không HCC là 11,93 ng/ml; độ nhạy (sensitivity) chẩn đoán HCC giai đoạn A là 34%; độ đặc hiệu (specificity) chẩn đoán HCC giai đoạn A là 94%; tỷ lệ dương tính giả (FPR) là 6%; tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 66%; giá trị tiên đoán dương (PPV) là 85%; giá trị tiên đoán âm (NPV) là 58,75% (hình 1C).

Kết quả trên cho thấy, phép chẩn đoán HCC dựa trên nồng độ DCP huyết thanh có độ chính xác (accuracy) trung bình với diện tích vùng dưới đường cong đạt 0,7531. Độ đặc hiệu

của phép chẩn đoán cao - đạt 94% nhưng độ nhạy của phép chẩn đoán ở mức thấp - chỉ đạt tỷ lệ 50 và 34% tương ứng với HCC nói chung và HCC giai đoạn sớm (với nồng độ ngưỡng là 11,93 ng/ml).

Giá trị chẩn đoán HCC của AFP

Kết quả định lượng AFP cho thấy, nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn B, C có nồng độ AFP huyết thanh cao nhất (với giá trị trung vị là 1218,80 ng/ml), tiếp theo là nhóm bệnh nhân viêm gan không HCC, nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn A và thấp nhất là nhóm không yếu tố nguy cơ (với giá trị trung vị AFP lần lượt là 41,73; 18,70 và 2,22 ng/ml). Xử lý thống kê cho thấy, nồng độ AFP huyết thanh của nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn B, C khác biệt có ý nghĩa so với nhóm HCC giai đoạn A và nhóm không có yếu tố nguy cơ. Tuy nhiên, sự tăng nồng độ AFP ở nhóm HCC giai đoạn B, C (nhóm II) không khác biệt có ý nghĩa so với nhóm viêm gan do nồng độ AFP trong các mẫu huyết thanh của nhóm II biến động rất lớn. Trong khi đó, nồng độ AFP huyết thanh của nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn A khác biệt không có ý nghĩa so với nhóm viêm gan và nhóm không có yếu tố nguy cơ. Kết quả này cho thấy, AFP không có hiệu quả trong chẩn đoán HCC giai đoạn A. Chỉ dấu này có thể sử dụng để chẩn đoán HCC giai đoạn B, C, nhưng sẽ có khả năng nhầm lẫn với các trường hợp viêm gan không có HCC (hình 2A).



Hình 2. Giá trị chẩn đoán HCC của AFP. (A) Nồng độ AFP trong 4 nhóm mẫu huyết thanh khảo sát (n=50). Nhóm I: HCC giai đoạn A, nhóm II: HCC giai đoạn B-C, nhóm III: viêm gan không HCC, nhóm IV: không có yếu tố nguy cơ. Số liệu được xử lý thống kê Kruskal Wallis bằng phần mềm GraphPad prism; *, khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,001$, ****: khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,0001$, ns: khác biệt không có ý nghĩa. Vạch xám thể hiện trong hình là giá trị trung vị và khoảng tứ phân vị (interquartile range). (B) Phân tích đường cong ROC phép chẩn đoán HCC với chỉ dấu AFP cho 100 mẫu HCC. (C) Phân tích đường cong ROC phép chẩn đoán HCC với chỉ dấu AFP cho 50 mẫu HCC giai đoạn A.

Tiếp theo, chúng tôi kiểm tra giá trị chẩn đoán HCC của AFP bằng hai phép phân tích đường cong ROC được thực hiện với 100 mẫu HCC/100 mẫu không HCC (hình 2B) và 50 mẫu HCC giai đoạn A/100 mẫu không HCC (hình 2C).

Các thông số thu được từ phân tích ROC với 100 mẫu HCC: diện tích dưới đường cong (area)=0,6429; độ tin cậy 95%; mức ý nghĩa $p=0,0005$; cut-off nồng độ AFP để phân biệt HCC và không HCC là 952,1 ng/ml; độ nhạy (sensitivity) chẩn đoán HCC là 39%; độ đặc hiệu (specificity) chẩn đoán HCC là 95%; tỷ lệ dương tính giả (FPR) là 5%; tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 61%; giá trị tiên đoán dương (PPV) là 88,64%; giá trị tiên đoán âm (NPV) là 60,9% (hình 2B).

Các thông số thu được từ phân tích ROC với 50 mẫu HCC giai đoạn A: diện tích dưới đường cong (area)=0,5308; độ tin cậy 95%; mức ý nghĩa $p=0,5392$; cut-off nồng độ AFP để phân biệt HCC giai đoạn A và không HCC là 952,1 ng/ml; độ nhạy (sensitivity) chẩn đoán HCC giai đoạn A là 24%; độ đặc hiệu (specificity) chẩn đoán HCC giai đoạn A là 95%; tỷ lệ dương tính giả (FPR) là 5%; tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 76%; giá trị tiên đoán dương (PPV) là 82,76%; giá trị tiên đoán âm (NPV) là 55,55% (hình 2C).

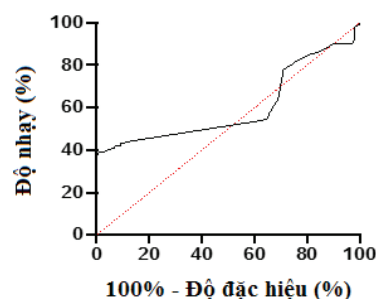
Kết quả trên cho thấy, phép chẩn đoán HCC dựa trên nồng độ AFP có độ chính xác (accuracy) thấp, với diện tích vùng dưới đường cong chỉ đạt 0,6429. Độ đặc hiệu của phép chẩn đoán cao - đạt 95%, nhưng độ nhạy của phép chẩn đoán ở mức thấp - chỉ đạt tỷ lệ 39% với giá trị ngưỡng xác định trong nghiên cứu này là 952,1 ng/ml. Đáng lưu ý là AFP không có giá trị chẩn đoán HCC giai đoạn A khi diện tích dưới đường cong chỉ đạt 0,5308 và khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p=0,5392$ ($>0,05$). Cũng như các nghiên cứu trước đây [2, 3], kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy AFP không phải là một chỉ dấu đáng tin cậy trong chẩn đoán HCC.

Hiệu quả chẩn đoán HCC khi sử dụng phối hợp 2 chỉ dấu DCP và AFP

Tiếp theo, chúng tôi phân tích hiệu quả chẩn đoán HCC khi sử dụng phối hợp 2 chỉ dấu sinh học DCP và AFP. Mối quan hệ giữa 2 chỉ dấu trong chẩn đoán HCC được phân tích bằng phương pháp hồi quy logistic đa biến sử dụng phần mềm SPSS. Phân tích đường cong ROC giá trị hồi quy logistic (predicted probability) cho kết quả: diện tích dưới đường cong (area)=0,6000; độ tin cậy 95%; mức ý nghĩa $p=0,0146$; cut-off giá trị hồi quy logistic 2 chỉ dấu DCP và AFP phân biệt HCC và không HCC là 0,705; độ nhạy (sensitivity) chẩn đoán HCC là 42%; độ đặc hiệu (specificity) chẩn đoán HCC là 93%; tỷ lệ dương tính giả (FPR) là 7%; tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 58%; giá trị tiên đoán dương (PPV) là 85,71%; giá trị tiên đoán âm (NPV) là 61,59% (hình 3).

Như vậy, trong phạm vi 200 mẫu huyết thanh đã phân tích, kết hợp DCP với AFP không giúp tăng độ nhạy phát

hiện HCC so với khi chỉ sử dụng một chỉ dấu DCP. Độ chính xác (accuracy) của phép chẩn đoán kết hợp 2 chỉ dấu ở mức thấp, với giá trị diện tích vùng dưới đường cong chỉ đạt 0,6000, thấp hơn giá trị diện tích vùng dưới đường cong khi phân tích đơn yếu tố DCP hoặc AFP.



Hình 3. Giá trị chẩn đoán HCC khi kết hợp DCP và AFP. Phân tích đường cong ROC phép chẩn đoán HCC với giá trị hồi quy logistic 2 chỉ dấu DCP và AFP cho 100 mẫu HCC.

Thảo luận

Theo các nghiên cứu trước đây trên thế giới, DCP là chỉ dấu huyết thanh được đánh giá cao trong chẩn đoán HCC. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, DCP có độ nhạy chẩn đoán HCC nói chung và HCC giai đoạn sớm lần lượt là 50 và 34% với độ đặc hiệu 94% ở giá trị ngưỡng 11,93 ng/ml. Nghiên cứu của Lok và cs (2010) [4] ở bệnh nhân người Mỹ đã xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của chỉ dấu DCP trong chẩn đoán HCC là 74 và 86%. Một nghiên cứu khác cũng thực hiện ở Mỹ của Marrero và cs (2003) [10] xác định độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC của DCP là 89 và 95%. Beale và cs (2008) [5] báo cáo DCP có độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC là 80% ở đối tượng nghiên cứu là người Anh. Trong khi đó, một nghiên cứu thực hiện tại Đức của Ertle và cs (2013) [11] đã xác định độ nhạy chẩn đoán HCC của DCP là 63,4%. Nghiên cứu hiệu quả chẩn đoán HCC của chỉ dấu DCP cũng đã được thực hiện nhiều ở các nước châu Á. Tại Nhật Bản, Takikawa và cs (1992) [12] xác định độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC của DCP là 52,8 và 98,8%. Tại Hàn Quốc, nghiên cứu của Yoon và cs (2009) [13] cho thấy độ nhạy chẩn đoán HCC của DCP là 51,9% và độ đặc hiệu là 97% ở nhóm bệnh nhân HBV mạn mắc HCC và không mắc HCC. Một nghiên cứu khác thực hiện trên 401 bệnh nhân HCC và xơ gan tại Hàn Quốc [14] cho kết quả DCP có độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC là 51,0 và 91,2%. Tại Trung Quốc, Cui và cs (2002) [8] công bố độ nhạy chẩn đoán HCC của chỉ dấu DCP là 51,7% với độ đặc hiệu là 86,7%. Như vậy, kết quả độ nhạy chẩn đoán HCC của chỉ dấu DCP trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với các nghiên cứu trước đây thực hiện ở Mỹ và châu Âu nhưng tương đương kết quả một số nghiên cứu thực hiện ở Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc [8, 12-14].

Thêm vào đó, trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy kết hợp 2 chỉ dấu DCP và AFP không giúp

tăng độ nhạy của phép chẩn đoán HCC so với khi chỉ sử dụng chỉ dấu DCP. Một số nghiên cứu trước đây thực hiện ở châu Âu [11], Trung Quốc [15] hay Hàn Quốc [13] cho thấy rằng, kết hợp AFP và DCP đã giúp tăng độ nhạy chẩn đoán HCC so với khi chỉ sử dụng chỉ dấu DCP. Chúng tôi chưa có dữ liệu để giải thích nguyên nhân của khác biệt nêu trên giữa kết quả nghiên cứu của chúng tôi với các công bố trước đây trên thế giới. Điều này cho thấy, cần phải thực hiện các nghiên cứu cần thận ở Việt Nam với cỡ mẫu lớn và đa dạng hơn để có cơ sở dữ liệu vững chắc khi áp dụng các chỉ dấu sinh học vào thực tế lâm sàng chẩn đoán bệnh.

So sánh với chỉ dấu đang được sử dụng hiện nay để chẩn đoán HCC là AFP, DCP có độ nhạy chẩn đoán là 50% - tốt hơn độ nhạy của AFP là 39%, độ đặc hiệu của 2 chỉ dấu đều đạt 94-95%. Ở đây, chúng tôi sử dụng giá trị ngưỡng AFP được xác định trong nghiên cứu này là 952,1 ng/ml mà không sử dụng giá trị ngưỡng được công nhận phổ biến trong lâm sàng là 400 ng/ml để có thể so sánh AFP với DCP trong cùng điều kiện. Nếu chọn giá trị ngưỡng AFP là 400 ng/ml để xác định HCC trong nghiên cứu này thì độ nhạy phép chẩn đoán đạt 44% nhưng độ đặc hiệu chỉ đạt 87%. Với cùng độ đặc hiệu chẩn đoán là 87-88%, độ nhạy chẩn đoán HCC của chỉ dấu DCP trong nghiên cứu này được xác định là 52%, vẫn cao hơn so với độ nhạy của chỉ dấu AFP ở cùng điều kiện khảo sát. Với HCC giai đoạn sớm (giai đoạn A), sử dụng chỉ dấu sinh học DCP có thể phát hiện được bệnh với độ nhạy 34%, trong khi chỉ dấu AFP không có ý nghĩa chẩn đoán HCC giai đoạn sớm. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi góp phần khẳng định DCP là chỉ dấu sinh học chẩn đoán HCC tốt hơn AFP [4, 8, 10, 16].

Kết luận và khuyến nghị

DCP có thể là chỉ dấu huyết thanh tiềm năng ứng dụng trong chẩn đoán và sàng lọc HCC ở bệnh nhân Việt Nam. Chỉ dấu huyết thanh DCP có thể được sử dụng thay cho chỉ dấu AFP trong chẩn đoán HCC, giúp tăng độ nhạy chẩn đoán bệnh mà không cần kết hợp với chỉ dấu AFP.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.D. Yang, P. Hainaut, G.J. Gores, A. Amadou, A. Plymoth, L.R. Roberts (2019), "A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management", *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**(10), pp.589-604.
- [2] G. Malaguarnera, M. Giordano, I. Paladina, M. Berretta, A. Cappellani, M. Malaguarnera (2010), "Serum markers of hepatocellular carcinoma", *Dig. Dis. Sci.*, **55**, pp.2744-2755.
- [3] H. Liu, P. Li, Y. Zhai, C.F. Qu, L. Zhang, Y.F. Tan, N. Li, H.G. Ding (2010), "Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma", *World J. Gastroenterol.*, **16**(35), pp.4410-4415.
- [4] A.S. Lok, R.K. Sterling, J.E. Everhart, E.C. Wright, J.C. Hoefs, A.M. Di Bisceglie, T.R. Morgan, H.Y. Kim, W.M. Lee, H.L. Bonkovsky, J.L. Dienstag, HALT-C Trial Group (2010), "Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha fetoprotein as markers for the early detection of hepatocellular carcinoma", *Gastroenterology*, **138**(2), pp.493-502.

- [5] G. Beale, D. Chattopadhyay, J. Gray, S. Stewart, M. Hudson, C. Day, P. Trerotoli, G. Giannelli, D. Manas, H. Reeves (2008), "AFP, PIVKAI, GP3, SCCA-1 and follistatin as surveillance markers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease", *BMC Cancer*, **8**, DOI: /10.1186/1471-2407-8-200.
- [6] L. Zhou, J. Liu, F. Luo (2006), "Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma", *World J. Gastroenterol.*, **12**(8), pp.1175-1181.
- [7] M. Omata, L.A. Lesmana, R. Tateishi, P.J. Chen, S.M. Lin, H. Yoshida, M. Kudo, J.M. Lee, B.I. Choi, R.T.P. Poon, S. Shiina, A.L. Cheng, J.D. Jia, S. Obi, K.H. Han, W. Jafri, P. Chow, S.G. Lim, Y.K. Chawla, U. Budihusodo, R.A. Gani, C.R. Lesmana, T.A. Putranto, Y.F. Liaw, S.K. Sarin (2010), "Asian pacific association for the study of the liver consensus recommendations on hepatocellular carcinoma", *Hepatol. Int.*, **4**, pp.439-474.
- [8] R. Cui, B. Wang, H. Ding, H. Shen, Y. Li, X. Chen (2002), "Usefulness of determining a protein induced by vitamin K absence in detection of hepatocellular carcinoma", *Chin. Med. J. (Engl.)*, **115**(1), pp.42-45.
- [9] G. Torzilli, M. Donadon, M. Marconi, A. Palmisano, D. Del Fabbro, A. Spinelli, F. Botea, M. Montorsi (2008), "Hepatectomy for stage B and stage C hepatocellular carcinoma in the barcelona clinic liver cancer classification: results of a prospective analysis", *Arch. Surg.*, **143**(11), pp.1082-1090.
- [10] J.A. Marrero, G.L. Su, W. Wei, D. Emick, H.S. Conjeevaram, R.J. Fontana, A.S. Lok (2003), "Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in American patients", *Hepatology*, **37**(5), pp.1114-1121.
- [11] J.M. Ertle, D. Heider, M. Wichert, B. Keller, R. Kueper, P. Hilgard, G. Gerken, J.F. Schlaak (2013), "A combination of α -Fetoprotein and Des- γ -carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma", *Digestion*, **87**, pp.121-131.
- [12] Y. Takikawa, K. Suzuki, K. Yamazaki, T. Goto, T. Madarame, Y. Miura, T. Yoshida, T. Kashiwabara, S. Sato (1992), "Plasma abnormal prothrombin (PIVKA-II): a new and reliable marker for the detection of hepatocellular carcinoma", *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **7**(1), pp.1-6.
- [13] Y.J. Yoon, K.H. Han, D.Y. Kim (2009), "Role of serum prothrombin induced by vitamin K absence or antagonist-II in the early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection", *Scand. J. Gastroenterol.*, **44**(7), pp.861-866.
- [14] E.S. Jang, S.H. Jeong, J.W. Kim, Y.S. Choi, P. Leissner, C. Brechot (2016), "Diagnostic performance of alpha-fetoprotein, protein induced by vitamin K absence, osteopontin, dickkopf-1 and its combinations for hepatocellular carcinoma", *PLOS ONE*, **11**(3), DOI: 10.1371/journal.pone.0151069.
- [15] P. Song, X. Feng, Y. Inagaki, T. Song, K. Zhang, Z. Wang, S. Zheng, K. Ma, Q. Li, D. Kong, Q. Wu, T. Zhang, X. Zhao, K. Hasegawa, Y. Sugawara, N. Kokudo, W. Tang, Japan-China Joint Team for Medical Research and Cooperation on HCC (2014), "Clinical utility of simultaneous measurement of alpha-fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma in China: a multi-center case-controlled study of 1,153 subjects", *Biosci. Trends*, **8**(5), pp.266-273.
- [16] C.S. Wang, C.L. Lin, H.C. Lee, K.Y. Chen, M.F. Chiang, H.S. Chen, T.J. Lin, L.Y. Liao (2005), "Usefulness of serum des- γ -carboxy prothrombin in detection of hepatocellular carcinoma", *World J. Gastroenterol.*, **11**(39), pp.6115-6119.