

Nghiên cứu sự đồng biểu hiện một số dấu ấn hóa mô miễn dịch của ung thư biểu mô tuyến dạ dày

Co-expression of some immunohistochemical markers of gastric adenocarcinoma

Nguyễn Khắc Tấn^{*},
Luu Thị Bình^{**},
Phan Quốc Hoàn^{***},
Nguyễn Phú Hùng^{****}

^{*}Phòng khám đa khoa các cơ quan Đảng ở TW,
^{**}Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên,
^{***}Bệnh viện Trung ương Quân đội 108,
^{****}Trường ĐH Khoa học - Đại học Thái Nguyên

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá sự đồng biểu hiện các dấu ấn hóa mô miễn dịch HER2, CD44 và ALDH của ung thư biểu mô tuyến dạ dày (UTBMTDD). **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang; thiết kế tiến cứu trên 107 bệnh nhân được chẩn đoán xác định UTBMTDD và được phẫu thuật cắt bỏ khối u tại Bệnh viện K. Đánh giá mức độ biểu hiện của marker HER2, CD44, ALDH trong mẫu ung thư và mẫu đối chứng. **Kết quả:** Tỷ lệ ung thư biểu mô tuyến dạ dày ở nam cao hơn so với ở nữ. Tỷ lệ đồng biểu hiện CD44 và HER2 là 15,9%. Tỷ lệ đồng biểu hiện ALDH và HER2 là 18,7%. Tỷ lệ đồng biểu hiện ALDH và CD44 là 43,9%. Tỷ lệ biểu hiện một dấu ấn đơn độc là 29,9%. Hai dấu ấn biểu hiện đồng thời chiếm tỷ lệ cao nhất với 47,7%. Tỷ lệ biểu hiện đồng thời cả HER2, CD44 và ALDH là 10,3%. **Kết luận:** Các dấu ấn hóa mô miễn dịch HER2, CD44, ALDH có thể đơn độc hoặc đồng biểu hiện ở bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến dạ dày.

Từ khóa: Dấu ấn miễn dịch HER2, CD44, ALDH, hóa mô miễn dịch, ung thư biểu mô tuyến dạ dày.

Summary

Objective: To evaluate the co-expression of immunohistochemical markers HER2, CD44 and ALDH in gastric adenocarcinoma. **Subject and method:** A cross-sectional descriptive study; prospective design on 107 patients with confirmed diagnosis of gastric adenocarcinoma and surgical removal of the tumor at K Hospital. Evaluation of expression levels of markers HER2, CD44, ALDH in cancer samples and control samples. **Result:** The rate of gastric adenocarcinoma in men is higher than in women. The CD44 and HER2 co-expression rate was 15.9%. The rate of ALDH and HER2 co-expression was 18.7%. The rate of ALDH and CD44 co-expression was 43.9%. The expression rate of a single marker was 29.9%. Two markers simultaneously expressed the highest rate with 47.7%. The rate of expression of HER2, CD44 and ALDH concurrently was 10.3%. **Conclusion:** Immunohistochemical markers HER2, CD44, ALDH can be expressed alone or co-expressed in patients with gastric adenocarcinoma.

Keywords: Immunomarkers HER2, CD44, ALDH, immunohistochemistry, gastric adenocarcinoma.

Ngày nhận bài: 23/5/2022, ngày chấp nhận đăng: 26/5/2022

Người phản hồi: Nguyễn Khắc Tấn, Email: drtanvptw@gmail.com - Phòng Khám ĐK các cơ quan Đảng ở Trung ương

1. Đặt vấn đề

Ung thư dạ dày vẫn là một căn bệnh ung thư phổ biến, đứng thứ năm về tỷ lệ mắc và thứ tư về tỷ lệ tử vong do ung thư trên toàn cầu. Ung thư biểu mô tuyến dạ dày (UTBMTDD) có tiên lượng rất xấu, đặc biệt là các bệnh nhân UTBMTDD đã di căn. Phương pháp điều trị chủ yếu là phẫu thuật kết hợp với hóa trị trước hoặc sau khi cắt bỏ khối u [1].

Đánh giá sự biểu hiện HER2 là một tiêu chí quan trọng để lựa chọn phương pháp hóa trị cho bệnh nhân. Tuy nhiên, tỷ lệ HER2 dương tính ở UTBMTDD là khá thấp, hiệu quả của hóa trị với các trường hợp HER2 âm tính hiện vẫn chưa rõ [2]. Do đó, cần có thêm hiểu biết về các dấu ấn khác của UTBMTDD bên cạnh HER2 để có thể cải thiện hiệu quả của hóa trị cho bệnh nhân UTBMTDD.

Đối với ung thư dạ dày, sự tồn tại của Cancer Stem Cell (CSC) trong khối u lần đầu tiên được chỉ ra dựa vào sự biểu hiện của marker CD44 [3], sau đó phát hiện thêm ALDH cũng là một marker dùng để xác định CSC dạ dày ở người. Các nghiên cứu cho thấy rằng chính những marker này gây ra sự thải loại thuốc điều trị UTBMTDD. Từ đó các liệu pháp điều trị nhắm đến đích là các marker UTBMTDD này bằng acid retinoic (AR) đã ức chế mạnh mẽ sự tăng trưởng của tế bào ung thư dạ dày, giúp cải thiện hiệu quả điều trị [4].

Nghiên cứu về sự biểu hiện của HER2 và các tế bào gốc ung thư dạ dày như CD44, ALDH mở ra một triển vọng lớn trong điều trị tận gốc loại ung thư này cũng như tiên lượng kết quả điều trị và tình trạng di căn của UTBMTDD. Sự biểu hiện của cả HER2, CD44 và ALDH trên bệnh nhân UTBMTDD tại Việt Nam cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu công phu nào được công bố. Từ thực tiễn đó, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu: *Đánh giá sự đồng biểu hiện các dấu ấn hóa mô miễn dịch HER2, CD44 và ALDH của ung thư biểu mô tuyến dạ dày.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là 107 bệnh nhân được chẩn đoán xác định UTBMTDD và được phẫu thuật cắt bỏ khối u từ tháng 7/2016 đến tháng 4/2022, tại Bệnh viện K (Cơ sở Tân Triều và Quán Sứ).

Tiêu chuẩn chọn đối tượng: Bệnh nhân được chẩn đoán xác định UTBMTDD dựa trên kết quả mô bệnh học bằng nhuộm Hematoxylin-Eosin (HE) theo tiêu chuẩn ESMO năm 2016, bệnh phẩm là khối u dạ dày sau khi được phẫu thuật [5].

Tiêu chuẩn loại trừ: Ung thư dạ dày di căn từ cơ quan khác, ung thư dạ dày đã được điều trị hoá trị hoặc xạ trị.

2.2. Phương pháp

Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang; thiết kế tiến cứu.

Nội soi dạ dày sinh thiết: Bệnh nhân được xịt gây tê vùng hầu họng bằng xylocain 2% hoặc lidocain 10%. Đưa máy soi vào dạ dày quan sát kỹ tất cả các vùng của dạ dày, hành tá tràng xuống tận D11 tá tràng để tránh bỏ sót tổn thương. Khi phát hiện tổn thương, bơm rửa sạch, sau đó quan sát kỹ bằng chế độ NBI và near focus để đánh giá, sinh thiết tổn thương làm giải phẫu bệnh. Vị trí sinh thiết đối với ổ loét là niêm mạc rìa xung quanh ổ loét, đối với khối u là ở các vị trí khác nhau. Bệnh phẩm lấy ra được cố định vào ống có chứa formol 20% đệm trung tính.

Khi có kết quả giải phẫu bệnh là ung thư dạ dày. Bệnh nhân được hội chẩn chuyển sang Khoa Ngoại bụng 1,2, Bệnh viện K để thực hiện thủ thuật cắt khối u dạ dày. Sau khi phẫu thuật, khối u được bảo quản và đưa đi làm xét nghiệm giải phẫu bệnh tại Bệnh viện K. Sau đó một mẫu bệnh phẩm được gửi sang Pháp để làm hóa mô miễn dịch.

Phương pháp nhuộm và đọc hóa mô miễn dịch:

Xét nghiệm hóa mô miễn dịch được thực hiện bằng tay tại phòng thí nghiệm Inserm U1035 (Đơn vị nghiên cứu *Helicobacter pylori* và ung thư dạ dày), Viện Sức khỏe và Nghiên cứu Y học Quốc gia, Bordeaux, Pháp.

Các kháng thể:

Kháng thể đơn dòng dùng cho phân tích các marker CSC dạ dày gồm: mouse monoclonal anti-human CD44 (clone G44-26, BD) độ pha loãng 1:100; mouse monoclonal anti-human ALDH1 (clone 44/ALDH, BD) độ pha loãng 1:300.

Kháng thể đơn dòng dùng cho phân tích các marker tiên lượng gồm: mouse monoclonal anti-HER2 (clone EP1045Y, abcam) độ pha loãng 1:100.

Hoá chất phân tích hoá mô miễn dịch: Sử dụng bộ kit anti-mouse Labelled Polymer-HRP DAKO Envision system (DAKO); Eukitt-mounting medium (Labonord, Templemars, France).

Các dụng cụ phục vụ cho hoá mô miễn dịch: Máy cắt mô từ mẫu đúc paraffin, hệ thống ổn nhiệt nước, hệ thống khay rửa, lam kính, lam men, hệ thống kính hiển vi ánh sáng trắng.

Kỹ thuật: Quy trình nhuộm HMMD HER2, CD44 và ALDH theo phương pháp phức hợp Avidin-Biotin tiêu chuẩn.

Chỉ tiêu nghiên cứu

Đánh giá mức độ biểu hiện của marker HER2 trong mẫu ung thư và mẫu đối chứng theo các mức độ: 0, 1⁺, 2⁺, 3⁺. Mức độ biểu hiện của HER2 là 0 và 1⁺ đánh giá là

âm tính, mức độ biểu hiện của HER2 là 2⁺ và 3⁺ đánh giá là dương tính.

Đánh giá mức độ biểu hiện của marker CD44 và ALDH trong mẫu ung thư và mẫu đối chứng theo các mức độ: Âm tính, dương tính.

2.3. Xử lý số liệu

Phần mềm thống kê y học SPSS 22.0. Phân tích các số liệu bằng thuật toán thống kê mô tả tần số các biến Frequencies, Descriptive, Crosstabs.

3. Kết quả

Chúng tôi đã thu thập được 107 bệnh nhân được chẩn đoán xác định là ung thư biểu mô tuyến dạ dày, kết quả nghiên cứu như sau:

Bảng 1. Đặc điểm tuổi, giới

Đặc điểm		Số lượng (n = 107)	Tỷ lệ %
Giới	Nam	72	67,3
	Nữ	35	32,7
Tuổi trung bình	Nam	57,31 ± 10,56	
	Nữ	54,57 ± 11,34	

Nhận xét: Tỷ lệ UTBMTDD ở nam cao hơn so với ở nữ.

Bảng 2. Đồng biểu hiện của dấu ấn HER2 và CD44 trong UTBMTDD

Biểu hiện CD44 \ Biểu hiện HER2	Âm tính		Dương tính		P
	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %	
Âm tính	24	22,4	11	10,3	0,3
Dương tính	55	51,4	17	15,9	

Nhận xét: Có 15,9% số trường hợp đồng biểu hiện CD44 và HER2. Có 10,3% bệnh nhân chỉ dương tính với HER2 mà âm tính với CD44. Có 51,4% bệnh nhân chỉ dương tính với CD44 mà âm tính với HER2.

Bảng 3. Đồng biểu hiện của dấu ấn HER2 và ALDH trong UTBMTDD

Biểu hiện ALDH \ Biểu hiện HER2	Âm tính		Dương tính		P
	n	%	n	%	
Âm tính	32	29,9	8	7,5	0,2
Dương tính	47	43,9	20	18,7	

Nhận xét: Có 18,7% số trường hợp đồng biểu hiện ALDH và HER2. Có 7,5% bệnh nhân chỉ dương tính với HER2 mà âm tính với ALDH. Có 43,9% bệnh nhân chỉ dương tính với ALDH mà âm tính với HER2.

Bảng 4. Đồng biểu hiện của dấu ấn CD44 và ALDH trong UTBMTDD

Biểu hiện ALDH \ Biểu hiện CD44	Âm tính		Dương tính		p
	n	%	n	%	
Âm tính	15	14,0	25	23,4	0,4
Dương tính	20	18,7	47	43,9	

Nhận xét: Có 43,9% số trường hợp đồng biểu hiện ALDH và CD44. Có 23,4% bệnh nhân chỉ dương tính với CD44 mà âm tính với ALDH. Có 18,7% bệnh nhân chỉ dương tính với ALDH mà âm tính với CD44.

Bảng 5. Đồng biểu hiện của cả 3 dấu ấn HER2, CD44 và ALDH

Số dấu ấn	Số lượng (n = 107)	Tỷ lệ %	Dấu ấn biểu hiện đồng thời	Số lượng (n = 107)	Tỷ lệ %
0 dấu ấn	13	12,1		13	12,1
1 dấu ấn	32	29,9	HER2	2	1,9
			CD44	19	17,8
			ALDH	11	10,3
2 dấu ấn	51	47,7	HER2, CD44	6	5,6
			HER2, ALDH	9	8,4
			CD44, ALDH	36	33,6
3 dấu ấn	11	10,3	HER2, CD44, ALDH	11	10,3

Nhận xét: Tỷ lệ biểu hiện một dấu ấn đơn độc là 29,9%. Hai dấu ấn biểu hiện đồng thời chiếm tỷ lệ cao nhất với 47,7%. Tỷ lệ biểu hiện đồng thời cả HER2, CD44 và ALDH là 10,3%.

4. Bàn luận

Nghiên cứu đồng biểu hiện của các dấu ấn sinh học trong các khối u có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu cứu sinh học của ung thư nói chung và đặc biệt là nghiên cứu phát triển các liệu pháp nhắm đích phối hợp. Ở ung thư dạ dày và một số ung thư biểu mô tuyến khác thì hiện nay HER2 vẫn là dấu ấn miễn dịch quan trọng và ít ỏi dùng trong điều trị bệnh. Tuy nhiên, tỷ lệ biểu hiện dấu ấn này thường thấp và trung bình dưới 25% ở ung thư dạ dày. Mặt khác, các dữ liệu điều trị thu được hiện nay cho thấy, một bộ phận các trường hợp biểu hiện HER2 nhưng không đáp ứng hoặc đáp ứng yếu với liệu pháp nhắm đích trastuzumab. Một số nghiên cứu cũng đã chỉ ra hiện tượng kháng lại trastuzumab trong một số trường hợp dương tính với HER2. Sự kháng liệu pháp có thể liên quan tới nhiều cơ chế sinh học phân tử khác nhau

trong tế bào, trong đó một trong những vấn đề được đưa ra gần đây là có liên quan tới tế bào gốc ung thư. Bên cạnh đó, sự đồng biểu hiện của các dấu ấn còn liên quan tới cơ chế phát sinh và di căn của các tế bào khối u. Ở đây chúng tôi trình bày kết quả phân tích đồng biểu hiện của HER2 với CD44 trong các trường hợp ung thư biểu mô dạ dày được nghiên cứu. Kết quả cho thấy rằng, tỷ lệ đồng biểu hiện của HER2 và CD44 là 15,9% trong tổng số tất cả các bệnh nhân. Có 10,3% bệnh nhân chỉ dương tính với HER2 mà âm tính với CD44 (Bảng 2). Điều này cho thấy rằng xấp xỉ 2/3 trường hợp biểu hiện HER2 có liên quan tới quần thể tế bào gốc ung thư dạ dày. Một nghiên cứu của Bao W. và cộng sự đã chỉ ra rằng HER2 đã tương tác với CD44 để điều hòa tăng sự biểu hiện CXCR4 bằng cách ức chế sự biểu hiện của miR-139 ở mức độ di truyền biểu sinh ở các tế bào ung thư dạ dày và điều này thúc đẩy sự khởi phát và di căn của ung thư dạ dày [6].

Như đã trình bày ở trên, sự biểu hiện của ALDH đã được nhiều nghiên cứu chỉ ra là có mối liên quan tới sự di căn, tái phát khối u sau điều trị và đặc biệt là hiện tượng kháng liệu pháp điều trị. Phân tích đồng thời

CD44 với ALDH sẽ xác định được tỷ lệ đồng biểu hiện của 2 dấu ấn này trong các mẫu mô ung thư dạ dày. Ở đây, chúng tôi xác định được mức độ đồng biểu hiện của hai dấu ấn này là 43,9% trong tổng số tất cả các bệnh nhân, có 23,4% bệnh nhân chỉ dương tính với CD44 mà âm tính với ALDH (Bảng 4). Các nghiên cứu về hiện tượng kháng lại liệu pháp trastuzumab đã được báo cáo nhiều trong các trường hợp của ung thư dạ dày, ung thư vú và một số loại ung thư khác, đồng thời một số cơ chế phân tử liên quan tới tính kháng này đã được chỉ ra [7].

Đáng lưu ý, một nghiên cứu của Huang và cộng sự đã chỉ ra rằng, chuyển dịch biểu mô trung mô ở ung thư vú đã dẫn tới tăng kiểu hình tế bào gốc ung thư biểu hiện ALDH và có sự kháng lại liệu pháp trastuzumab [8]. Trong một báo cáo gần đây, flubendazole đã được chỉ ra có khả năng giúp vượt qua sự kháng liệu pháp trastuzumab bằng cách giảm các đặc tính của tế bào gốc ung thư vú biểu hiện ALDH [9]. Như vậy, có thể thấy rằng, xác định tỷ lệ ung thư dạ dày đồng biểu hiện của CD44 và ALDH có thể bổ sung thông tin cho việc phát triển và lựa chọn liệu pháp điều trị đích đối với ung thư dạ dày, đem lại hiệu quả tốt hơn trong điều trị.

Các tế bào gốc ung thư trong các khối u được phát hiện có khả năng duy trì sự tự đổi mới của khối u, bắt đầu sự tiến triển của khối u và cũng có thể góp phần vào việc di căn ung thư. Wakamatsu Y đã kiểm tra bằng hóa mô miễn dịch sự biểu hiện và phân bố của các dấu ấn CSC đại diện ALDH, CD44 và CD133 trong các khối u nguyên phát và di căn hạch bạch huyết của ung thư dạ dày. Trong số 190 khối u nguyên phát ung thư dạ dày, 104 (55%) dương tính với ALDH, 117 (62%) dương tính với CD44 và 18 (9%) dương tính với CD133. Sự biểu hiện của ba dấu ấn CSC này có liên quan đáng kể với các yếu tố bệnh học lâm sàng nâng cao. Bệnh nhân có ung thư dạ dày dương tính với CD44 và CD133 có tỷ lệ sống sót kém hơn so với bệnh nhân có ung thư dạ dày âm tính với CD44 và CD133 (CD44: $p < 0,001$, CD133: $p = 0,006$). Phân tích mối nguy theo tỷ lệ Cox đơn biến và đa biến cho thấy giai đoạn di căn của nút khối u, biểu hiện CD44 và biểu hiện CD133 là những yếu tố tiên đoán độc lập về khả năng sống sót ở bệnh nhân ung thư dạ dày. So sánh các dấu ấn CSC ở vị trí nguyên

phát và di căn cho thấy độ dương tính của ALDH ở di căn hạch kiểu lan tỏa cao hơn có ý nghĩa so với ở khối u nguyên phát ($p < 0,001$). Những kết quả đó chỉ ra rằng những dấu ấn CSC này rất quan trọng trong việc xác định độ xâm lấn, di căn của khối u và có thể là những dấu ấn tốt cho thấy khả năng tiên lượng thời gian sống lâu dài ở bệnh nhân ung thư dạ dày [10].

Trong nghiên cứu này chúng tôi thấy rằng khi phân tích sự biểu hiện đồng thời của cả 3 dấu ấn HER2, CD44, ALDH thì hai dấu ấn biểu hiện đồng thời chiếm tỷ lệ cao nhất với 47,7%, trong số 2 dấu ấn đồng biểu hiện thì CD44 và ALDH cùng dương tính chiếm tỷ lệ 33,6%, cao nhất trong số 2 dấu ấn cùng biểu hiện. Trên bệnh nhân UTBMTDD mà không có dấu ấn nào biểu hiện thì chiếm tỷ lệ 12,1%. Còn tỷ lệ bệnh nhân đồng biểu hiện cả 3 dấu ấn là 10,3% (Bảng 5). Cho đến nay hầu như chưa có nghiên cứu về sự đồng biểu hiện của cả 3 dấu ấn HER2, CD44, ALDH nên chúng tôi không có số liệu để so sánh.

5. Kết luận

Sau nghiên cứu chúng tôi có một số kết luận như sau:

Tỷ lệ đồng biểu hiện CD44 và HER2 là 15,9%. Tỷ lệ đồng biểu hiện ALDH và HER2 là 18,7%. Tỷ lệ đồng biểu hiện ALDH và CD44 là 43,9%.

Tỷ lệ biểu hiện một dấu ấn đơn độc là 29,9%. Hai dấu ấn biểu hiện đồng thời chiếm tỷ lệ cao nhất với 47,7%. Tỷ lệ biểu hiện đồng thời cả HER2, CD44 và ALDH là 10,3%.

Tài liệu tham khảo

1. Kamiya S, Rouvelas I, Lindblad M et al (2018) *Current trends in gastric cancer treatment in Europe*. Journal of Cancer Metastasis and Treatment 4: 35.
2. Matsusaka S, Nashimoto A, Nishikawa K et al (2016) *Clinicopathological factors associated with HER2 status in gastric cancer: Results from a prospective multicenter observational cohort study in a Japanese population (JFMC44-1101)*. Gastric Cancer 19(3): 839-851.
3. Takaishi S, Okumura T, Tu S et al (2009) *Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44*. Stem Cells 27(5): 1006-1020.
4. Nguyen PH, Giraud J, Staedel C et al (2016) *All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and*

- inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth.* Oncogene 35(43): 5619-5628.
5. Smyth EC Verheij M, Allum W et al (2016) *Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* Ann Oncol 27(5): 38-49.
 6. Bao W, Fu HJ, Xie QS et al (2011) *HER2 interacts with CD44 to up-regulate CXCR4 via epigenetic silencing of microRNA-139 in gastric cancer cells.* Gastroenterology 141(6): 2076-2087.
 7. Yang Z, Guo L, Liu D et al (2015) *Acquisition of resistance to trastuzumab in gastric cancer cells is associated with activation of IL-6/STAT3/Jagged-1/Notch positive feedback loop.* Oncotarget 6(7): 5072-5087.
 8. Huang J, Li H, Ren G (2015) *Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (Review).* Int J Oncol 47(3): 840-848.
 9. Kim YJ, Sung D, Oh E et al (2018) *Flubendazole overcomes trastuzumab resistance by targeting cancer stem-like properties and HER2 signaling in HER2-positive breast cancer.* Cancer Lett 412: 118-130.
 10. Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ et al (2012) *Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer.* Pathol Int 62(2): 112-119.