

NGHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG KHUẾCH ĐẠI GENE VÀ QUÁ BIỂU LỘ PROTEIN HER-2/neu TRONG UNG THƯ DẠ DÀY BẰNG KỸ THUẬT LAI TẠI CHỖ HUỖNH QUANG VÀ HÓA MÔ MIỄN DỊCH

Trần Văn Huy¹, Hà Thị Minh Thi¹, Lê Việt Nho¹, Đặng Công Thuận¹,
Văn Trung Nghĩa¹, Lê Phan Tường Quỳnh¹, Tạ Văn Tờ², Nguyễn Việt Nhân¹

(1) Trường Đại học Y Dược Huế

(2) Bệnh viện K

Tóm tắt

Đặt vấn đề: HER-2/neu là một chỉ điểm sinh học có tính tiên lượng khả năng đáp ứng tốt với hóa trị liệu có phối hợp trastuzumab trong ung thư dạ dày. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu: (1) Đánh giá tình trạng khuếch đại gene và quá biểu lộ protein HER-2/neu bằng kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang và hóa mô miễn dịch ở bệnh nhân ung thư dạ dày. (2) Khảo sát mối liên quan giữa HER2/neu với một số đặc điểm của ung thư dạ dày. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 160 bệnh nhân ung thư dạ dày được đánh giá biểu lộ protein HER-2/neu bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch (IHC) với kit Ventana anti-HER-2/neu (4B5) và đánh giá khuếch đại gene HER2/neu bằng kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (FISH) với kit PathVysion™ HER-2 DNA Probe trên mẫu mô sinh thiết dạ dày. **Kết quả:** Tỷ lệ biểu lộ protein HER2/neu với điểm IHC 0, 1+, 2+ và 3+ lần lượt là 70%, 10,6%, 10,6% và 8,8%. Tỷ lệ có khuếch đại gene HER-2/neu là 13,1%. Độ tương hợp của hai kỹ thuật hóa mô miễn dịch và lai tại chỗ huỳnh quang là 90,0%. Tỷ lệ được đánh giá HER2/neu dương tính bằng cả hai kỹ thuật là 13,1%. Tỷ lệ HER2/neu dương tính ở ung thư tâm vị cao hơn ung thư dạ dày vùng không tâm vị (36,4% so với 11,4%, $p = 0,040$), tỷ lệ HER2/neu dương tính ở thể ruột cao hơn thể lan tỏa (20,7% so với 5,9%, $p = 0,010$), tỷ lệ HER2/neu dương tính ở nhóm biệt hóa tốt và biệt hóa vừa cao hơn nhóm biệt hóa kém (18,6% và 23,8% so với 5,8%, $p = 0,047$). **Kết luận:** Chúng tôi đã ứng dụng thành công kỹ thuật hóa mô miễn dịch và lai tại chỗ huỳnh quang trên mẫu mô sinh thiết qua nội soi bệnh nhân ung thư dạ dày để phát hiện HER2/neu dương tính góp phần chọn lựa những bệnh nhân có khả năng đáp ứng với hóa trị liệu phối hợp trastuzumab. Tình trạng HER2/neu có liên quan đến vị trí khối u, phân loại Lauren và độ biệt hóa.

Từ khóa: ung thư dạ dày, lai tại chỗ huỳnh quang, hóa mô miễn dịch, HER-2/neu

Abstract

AMPLIFICATION AND OVEREXPRESSION OF HER2/neu IN GASTRIC CANCER ASSESSED BY FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Tran Van Huy¹, Ha Thi Minh Thi¹, Le Viet Nho¹, Dang Cong Thuan¹,
Van Trung Nghia¹, Le Phan Tuong Quynh¹, Ta Van To², Nguyen Viet Nhan¹

(1) Hue University of Medicine and Pharmacy

(2) K Hospital

Background: HER2/neu is a predictive biomarker for treatment of gastric cancer using trastuzumab in combination with chemotherapy. This study aimed to: (1) assess the amplification and the

- Địa chỉ liên hệ: Trần Văn Huy, email: bstranvanhuy@gmail.com

DOI: 10.34071/jmp.2015.3.3

- Ngày nhận bài: 29/6/2015 * Ngày đồng ý đăng: 5/7/2015 * Ngày xuất bản: 10/7/2015

overexpression of HER2/neu using fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry in gastric cancer; (2) survey the association between HER2/neu and clinicopathologic characteristics of gastric cancer. **Patients and methods:** one hundred and sixty gastric cancer patients were assessed HER2/neu overexpression by IHC using Ventana anti-HER-2/neu (4B5) kit and were assessed HER2/neu gene amplification by FISH using PathVysion™ HER-2 DNA Probe kit with biopsy specimens. **Results:** HER2/neu protein expression rates of IHC 0, 1+, 2+ and 3+ were 70%, 10.6%, 10.6% and 8.8%, respectively. HER2/neu gene amplification was identified in gastric cancer from 21 out of 160 (13.1%) patients. The concordance between IHC and FISH was 90.0%. The HER2/neu-positive rate assessed by both techniques was 13.1%. There was a significant difference in HER2/neu-positivity between cardia gastric cancer and non-cardia gastric cancer (36.4% vs 11.4%, $p = 0.040$); between intestinal type and diffuse type (20.7% vs 5.9%, $p = 0.010$); between well, moderately differentiated and poorly differentiated gastric cancer (18.6% and 23.8% vs 5.8%, $p = 0.047$). **Conclusion:** We applied successfully FISH and IHC technique with biopsy samples in gastric cancer detecting HER2/neu positivity in order to select patients that benefit from trastuzumab in combination with chemotherapy. HER2/neu status associated with tumor location, Lauren classification and differentiated grading.

Keywords: gastric cancer, fluorescence in situ hybridization (FISH), immunohistochemistry (IHC), HER-2/neu

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư dạ dày là một trong những nguyên nhân chính gây tử vong do bệnh tật trên toàn thế giới, với thời gian sống còn trung bình kể từ khi phát hiện bệnh là dưới một năm[15]. Những nghiên cứu gần đây đã mở ra một triển vọng trong việc điều trị ung thư dạ dày, đặc biệt là những nghiên cứu điều trị hướng đích bằng các chất có hoạt tính sinh học dựa trên những thành tựu khoa học liên quan cơ chế bệnh sinh phân tử trong ung thư. Một trong những gene sinh ung thư (oncogene) được quan tâm nghiên cứu là HER-2/neu (Human Epidermal growth factor Receptor 2), khu trú trên nhiễm sắc thể 17 (17q11.2-q12), mã hóa cho protein đóng vai trò là receptor cho yếu tố tăng trưởng biểu bì. Sự khuếch đại của gene HER-2/neu dẫn đến tình trạng biểu hiện quá mức của protein tương ứng ở màng tế bào đã tạo điều kiện cho tế bào ác tính phát triển[12]. Vì vậy, trastuzumab (Herceptin), một kháng thể đơn dòng hướng đích đến các domain ngoại bào của receptor HER-2/neu, đã và đang là một lựa chọn điều trị hàng đầu cho các bệnh nhân ung thư có HER-2/neu dương tính, đặc biệt là ung thư vú và ung thư dạ dày. Một thử nghiệm lâm sàng mới đây (năm 2010) trên quy mô rộng lớn là nghiên cứu ToGA (Trastuzumab for GAstric cancer) đã cho thấy việc sử dụng

trastuzumab phối hợp với hóa trị liệu trong điều trị ung thư dạ dày tiến triển có HER-2/neu dương tính có hiệu quả kéo dài đáng kể thời gian sống còn so với hóa trị liệu đơn độc không phối hợp trastuzumab[26]. Tình trạng HER-2/neu dương tính được xác định bằng xét nghiệm hóa mô miễn dịch (IHC: Immunohistochemistry) và/hoặc lai tại chỗ huỳnh quang (FISH: Fluorescence in situ Hybridization). Khuyến cáo ở Mỹ và Nhật Bản là có IHC 3+ hoặc FISH +, còn ở châu Âu là IHC 3+ hoặc IHC 2+ kèm FISH + [6]. Do đó, việc phát triển đồng thời hai kỹ thuật IHC và FISH để xác định những bệnh nhân ung thư dạ dày có HER-2/neu dương tính là rất quan trọng nhằm giúp các nhà lâm sàng chọn chính xác nhóm bệnh nhân có chỉ định điều trị bằng hóa trị liệu phối hợp trastuzumab. Ngoài ra, vai trò của HER2/neu trong tiên lượng ung thư dạ dày cũng đang còn tranh cãi, chưa được đồng thuận và có nhiều nhận định trái chiều. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm các mục tiêu sau:

1. Đánh giá tình trạng khuếch đại gene và quá biểu lộ protein HER-2/neu bằng kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang và hóa mô miễn dịch ở bệnh nhân ung thư dạ dày.

2. Khảo sát mối liên quan giữa HER2/neu với một số đặc điểm của ung thư dạ dày

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- *Cỡ mẫu*: 160 bệnh nhân ung thư dạ dày
- *Tiêu chuẩn chọn bệnh*: Ung thư dạ dày được chẩn đoán dựa trên hình ảnh thương tổn nội soi dạ dày và kết quả mô bệnh học của mẫu mô sinh thiết dạ dày qua nội soi tại bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế và Bệnh viện Trung ương Huế.

- *Tiêu chuẩn loại trừ*: những trường hợp ung thư dạ dày tái phát, ung thư di căn đến dạ dày hoặc phổi hợp ung thư khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang

2.2.2. Phương pháp thu thập mẫu: Các bệnh nhân ung thư dạ dày được lấy mẫu mô dạ dày qua nội soi sinh thiết và phẫu thuật (nếu có phẫu thuật).

2.2.3. Xác định tình trạng quá biểu lộ protein HER2/neu bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch (IHC)

- Thực hiện tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế và Bệnh viện K Hà Nội.

- *Sinh phẩm chính*: Bộ kit Ventana anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Ventana/Roche Tissue Diagnostics), thực hiện trên máy nhuộm hóa mô miễn dịch tự động Ventana Benchmark GX và bộ kit HercepTest (Dako).

- Đánh giá các mức biểu lộ HER2/neu: có 4 mức điểm cho mẫu mô sinh thiết và mẫu bệnh

phẫu mô với các mức điểm IHC 0, 1+, 2+ và 3+ theo Hướng dẫn xét nghiệm HER2 trong ung thư dạ dày của Hội Giải phẫu bệnh – Tế bào bệnh học Việt Nam (2013) [1]

Chỉ các trường hợp IHC 3+ mới được coi là quá biểu lộ (dương tính), 1+ và 0 là không có quá biểu lộ (**âm tính**), còn 2+ là nghi ngờ, chưa kết luận được.

2.2.4. Xác định tình trạng khuếch đại gene HER-2/neu bằng kỹ thuật FISH

- Thực hiện tại Bộ môn Di truyền Y học, trường Đại học Y Dược Huế

- Sinh phẩm: Bộ kit PathVysion™ HER-2 DNA Probe (Abbott Molecular)

- Đánh giá tình trạng khuếch đại gene HER-2/neu:

· Nếu tỷ lệ HER-2/CEP-17 < 2: không khuếch đại gene HER-2/neu (âm tính)

· Nếu tỷ lệ HER-2/CEP-17 ≥ 2: có khuếch đại gene HER-2/neu (dương tính)

· Nếu tỷ lệ HER-2/CEP-17 trong khoảng 1,8 đến 2,2: nghi ngờ. Cần đếm 20 nhân tế bào khác, và phải được thực hiện bởi một người khác. Nếu vẫn không rõ, làm lại kỹ thuật trên tiêu bản mới.

2.2.5. Xác định tình trạng HER-2/neu dương tính bằng hai kỹ thuật IHC và FISH

Kết luận HER2/neu dương tính khi IHC 3+ và/ hoặc FISH +.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Một số thông tin chung của nhóm bệnh nhân ung thư dạ dày

Bảng 1. Một số thông tin chung của nhóm bệnh nhân ung thư dạ dày

Đặc điểm	Phân nhóm	Số bệnh nhân	Tỷ lệ %
Tuổi (n = 160)	< 60 tuổi	68	42,5
	≥ 60 tuổi	92	57,5
Giới (n = 160)	Nam	106	66,3
	Nữ	54	33,7
Vị trí khối u (n = 160)	Tâm vị	11	6,9
	Không thuộc tâm vị	149	93,1
Phân loại Borrmann (n = 160)	Týp I	28	17,5
	Týp II	55	34,4
	Týp III	63	39,4
	Týp IV	14	8,7

Phân loại Lauren (n = 150)	Type ruột	17	47,2
	Type lan tỏa	19	52,8
Độ biệt hóa (n = 116)	Tốt	43	37,1
	Vừa	21	18,1
	Kém	52	44,8
Giai đoạn TNM (n = 85)	I	14	16,5
	II	31	36,5
	III	16	18,8
	IV	24	28,2

3.2. Tình trạng HER2/neu trong ung thư dạ dày đánh giá bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch và lai tại chỗ huỳnh quang

3.2.1. Sự biểu lộ HER2/neu được đánh giá bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch

Bảng 3.2. Tỷ lệ quá biểu lộ HER2/neu trong ung thư dạ dày

Mức biểu lộ HER2/neu	Số lượng	Tỷ lệ %	Đánh giá quá biểu lộ
0	112	70,0	Âm tính (80,6%)
1+	17	10,6	
2+	17	10,6	Nghi ngờ
3+	14	8,8	Dương tính (8,8%)
Tổng cộng	160	100,0	

3.2.2. Khuếch đại gene HER2/neu được đánh giá bằng kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang

Bảng 3.3. Tỷ lệ có khuếch đại gene HER2/neu

Khuếch đại gene HER2/neu	Số lượng	Tỷ lệ %
Có khuếch đại (dương tính)	21	13,1
Không khuếch đại (âm tính)	139	86,9
Tổng cộng	160	100,0

3.2.3. Đánh giá độ tương hợp giữa kỹ thuật hóa mô miễn dịch và lai tại chỗ huỳnh quang

Bảng 3.4. Tỷ lệ tương hợp giữa kỹ thuật hóa mô miễn dịch và lai tại chỗ huỳnh quang

Hóa mô miễn dịch <i>Dương tính (n = 21)</i>		Lai tại chỗ huỳnh quang		Tỷ lệ tương hợp (%)
		Âm tính (n = 139)		
Âm tính	0 (n = 112)	2	110	98,2
	1+ (n = 17)	1	16	94,1
Nghi ngờ	2+ (n = 17)	4	13	23,5
Dương tính	3+ (n = 14)	14	0	100
Tổng (n = 160)				90,0

* Tỷ lệ dương tính HER2/neu dương tính sau khi đánh giá bằng hai kỹ thuật chính là 21/160 = 13,1% (có IHC 3+ và/hoặc FISH +)

3.3. Mối liên quan giữa HER2/neu với một số đặc điểm của ung thư dạ dày

Bảng 3.5. Mối liên quan giữa HER2/neu với một số đặc điểm của ung thư dạ dày

Đặc điểm	Phân nhóm	Số bệnh nhân	HER2/neu dương tính		p
			Số lượng	Tỷ lệ %	
Tuổi	< 60 tuổi	68	8	11,8	0,841
	≥ 60 tuổi	92	13	14,1	
Giới	Nam	106	15	14,2	0,771
	Nữ	54	6	11,1	
Vị trí khối u	Tâm vị	11	4	36,4	0,040
	Không thuộc tâm vị	149	17	11,4	
Phân loại Borrmann	Týp I	28	3	10,7	0,677
	Týp II	55	6	10,9	
	Týp III	63	9	14,3	
	Týp IV	14	3	21,4	
Phân loại Lauren	Type ruột	17	17	20,7	0,010
	Type lan tỏa	19	4	5,9	
Độ biệt hóa	Tốt	43	8	18,6	0,047
	Vừa	21	5	23,8	
	Kém	52	3	5,8	
Giai đoạn TNM	I và II	45	6	13,3	0,817
	III và IV	40	7	17,5	

4. BÀN LUẬN

4.1. Tình trạng HER2/neu trong ung thư dạ dày đánh giá bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch và lai tại chỗ huỳnh quang

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tình trạng quá biểu lộ HER2/neu bằng kỹ thuật IHC (hóa mô miễn dịch) với kit kháng thể của Ventana (tự động) và của Dako (làm tay) là hai bộ kit được FDA công nhận đạt tiêu chuẩn chẩn đoán biểu lộ HER2/neu. Kỹ thuật này đã được triển khai và chuẩn hóa tại nước ta trong những năm gần đây với tiêu chuẩn đánh giá được hướng dẫn bởi Hội Giải phẫu bệnh – Tế bào bệnh học Việt Nam.

Trong số 160 trường hợp ung thư dạ dày, tỷ lệ bệnh nhân có phản ứng hóa mô miễn dịch (IHC) đạt các mức điểm 0, 1+, 2+ và 3+ lần lượt là 70%, 10,6%, 10,6% và 8,8%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về tỷ lệ nhóm có biểu lộ HER2/neu mức mạnh (IHC 3+: chắc chắn có quá biểu lộ) tương đồng với nhiều tác giả khác như nghiên cứu của Matsubara (Nhật Bản, 2008, n = 87) có tỷ

lệ IHC 3+ là 10% [20], nghiên cứu của Allgayer (Đức, 2000, n = 189) có tỷ lệ này là 11,6% [4]. Tuy nhiên, tỷ lệ của chúng tôi lại cao hơn một số nghiên cứu khác như của Barros-Silva (Bồ Đào Nha, 2009, n = 443) với tỷ lệ này chỉ 5,4% [5], của Park (Hàn Quốc, 2006, n = 182) với tỷ lệ IHC 3+ là 6,0% [22]. So với nghiên cứu trong nước như của Nguyễn Văn Thành thì tỷ lệ biểu lộ ở mức IHC 2+ và 3+ của chúng tôi cao hơn, tổng tỷ lệ hai mức này trong nghiên cứu của chúng tôi lên đến 19,4%, trong khi của Nguyễn Văn Thành chỉ 11% [3].

Sự khác biệt về tỷ lệ biểu lộ HER2/neu trong các nghiên cứu ngoài các nguyên nhân kinh điển như do khác biệt về mẫu nghiên cứu, yếu tố chủng tộc... thì những nguyên nhân liên quan đến kỹ thuật và hóa chất đóng vai trò hết sức quan trọng. Nghiên cứu của Barros-Silva sử dụng kháng thể đơn dòng chuột của hãng Novocastra Laboratoies Ltd, Vương quốc Anh nên kết quả biểu lộ HER2/neu với IHC 2+ và 3+ thấp hơn nghiên cứu chúng tôi rất nhiều (3,9% so với

10,6%; 5,4% so với 8,8%), vì cho đến nay chỉ có hai loại kit kháng thể đánh giá HER2/neu bằng IHC được FDA công nhận là HercepTest (Dako) và Ventana anti-HER-2/neu 4B5 (Ventana/Roche Tissue Diagnostics) [25]. Allgayer đánh giá cả những trường hợp nhuộm bào tương cũng là dương tính, nên tỷ lệ biểu lộ HER2/neu ở mức IHC 2+ cao hơn chúng tôi rất nhiều, tỷ lệ IHC 2+ của tác giả này lên đến 41,8% [4], trong khi của chúng tôi chỉ 10,6%. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Thành cũng thực hiện trên người Việt Nam nhưng có số bệnh nhân UTDD thể loét nhiều hơn rõ rệt so với nghiên cứu của chúng tôi nên có thể đó là lý do làm tỷ lệ IHC 2+ và 3+ trong nghiên cứu của tác giả thấp, vì theo một số nghiên cứu, UTDD thể loét thường có biểu lộ HER2/neu thấp hơn thể nấm và pô-líp [18], [23].

Về tình trạng khuếch đại gene HER2/neu, hiện nay kỹ thuật FISH nhằm đánh giá khuếch đại gene HER2/neu chỉ được áp dụng ở một vài trung tâm y tế của nước ta và chủ yếu cũng chỉ được triển khai trên các mẫu mô ung thư vú. Việc thực hiện kỹ thuật FISH để đánh giá khuếch đại gene HER-2/neu ở mẫu mô ung thư dạ dày có khó khăn hơn so với mẫu mô ung thư vú, do trong mẫu mô ung thư dạ dày có tỷ lệ không đồng nhất của khối u cao hơn (4,8% so với 1,8%) [14]. Năm 2013 và 2014 chúng tôi đã bước đầu áp dụng thành công kỹ thuật FISH để đánh giá khuếch đại HER2/neu trên mẫu mô ung thư dạ dày [2]. Vì vậy, trong đề tài này chúng tôi tiếp tục áp dụng và phân tích trên cỡ mẫu lớn hơn (160 bệnh nhân UTDD).

Tỷ lệ có khuếch đại gene HER2/neu trong nghiên cứu của chúng tôi là 13,1%, cũng nằm trong khoảng tỷ lệ do Stoss tổng kết năm 2010 từ nhiều nghiên cứu trên thế giới là 7,1 - 42,6% [26]. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự kết quả của một số tác giả khác như nghiên cứu của Tanner (Phần Lan, 2005) với tỷ lệ có khuếch đại gene HER2/neu là 12,2% (n = 131) [27], nghiên cứu của Barros-Silva (2009, Bồ Đào Nha) là 8,2% (n = 463), nghiên cứu của Yan (Singapore, 2010) là 11,7% (n = 128) [28], nghiên cứu của Kim (Hàn Quốc, 2012) là 9% (n = 114) [16]. Tuy nhiên, tỷ lệ có khuếch đại gene HER2/neu trong nghiên cứu của chúng tôi lại thấp hơn nhiều so

với một số nghiên cứu khác như của Yano (Nhật Bản, 2006) với tỷ lệ có khuếch đại là 27,1% (n = 199, p = 0,027) [29], của Brien (Mỹ, 1998) với tỷ lệ khuếch đại 42,6% (n = 61, p < 0,0001) [7].

Chúng tôi đã đánh giá độ tương hợp giữa hai kỹ thuật hóa mô miễn dịch và lai tại chỗ huỳnh quang, kết quả ở bảng 3.4 cho thấy tỷ lệ tương hợp giữa FISH dương tính với nhóm hóa mô miễn dịch có kết quả dương tính mạnh (IHC 3+) đạt 100% và giữa FISH âm tính với nhóm hóa mô miễn dịch âm tính (0 điểm) cũng rất cao, lên đến 98,2%. Nhóm âm tính hóa mô miễn dịch với IHC 1+ có tỷ lệ tương hợp là 94,1%. Kết quả này cũng phù hợp với đánh giá của Yano (2006) với tỷ lệ tương hợp trong nhóm 1+ của tác giả là 82,1% (trong 28 trường hợp hóa mô miễn dịch âm tính 1+, có 5 trường hợp FISH dương tính) [29].

Độ tương hợp về đánh giá tình trạng HER2/neu bằng hai kỹ thuật là hóa mô miễn dịch (đánh giá biểu lộ protein) và FISH (đánh giá khuếch đại gene) là 90,0%. Tỷ lệ này cũng phù hợp với nhiều kết quả nghiên cứu khác như Yano (Nhật Bản, 2006) là 86,9% [29]; Hofmann (Đức, 2008) là 91,1% [14]; Gordon (Mỹ, 2013) là 90% [10]. Kết quả này cho thấy bước đầu chúng tôi đã làm chủ được công nghệ và có thể sử dụng các kỹ thuật hóa mô miễn dịch kết hợp FISH để xác định các bệnh nhân có HER2/neu dương tính nhằm đưa vào nhóm có chỉ định điều trị trastuzumab.

Với kết quả tỷ lệ tương hợp là 100% cho nhóm chắc chắn quá biểu lộ IHC 3+ và 98,2% cho nhóm IHC 0 (chắc chắn âm tính), chúng tôi nhận thấy quan điểm sử dụng hóa mô miễn dịch để đánh giá biểu lộ HER2/neu trước, và xác định lại bằng kỹ thuật FISH cho nhóm nghi ngờ (IHC 2+) là rất hợp lý vì kỹ thuật hóa mô miễn dịch có giá thành rẻ hơn nhiều so với kỹ thuật FISH. Kết quả của chúng tôi cũng cho thấy có 23,5% bệnh nhân thuộc nhóm IHC 2+ đã được xác định có khuếch đại gene HER2/neu, ngoài ra ở nhóm IHC 1+ cũng có 5,9% khuếch đại gene (do có 1 trường hợp FISH dương tính trong số 17 trường hợp IHC 1+). Đặc biệt, trong nhóm không có biểu lộ HER2/neu với IHC 0 điểm cũng có 2 trường hợp FISH dương tính, chiếm tỷ lệ 1,8%. Điều này cho thấy vai trò của FISH rất quan trọng đối với nhóm chưa khẳng định được có hay không có

quá biểu lộ HER2/neu. Tóm lại, sau khi kết hợp hai kỹ thuật là hóa mô miễn dịch và FISH, tỷ lệ bệnh nhân có HER2/neu dương tính trong nghiên cứu của chúng tôi là 13,1%.

Tình trạng HER2/neu dương tính (quá biểu lộ và/hoặc khuếch đại gene) là một chỉ điểm sinh học quan trọng để nhận biết các bệnh nhân có thể đáp ứng với điều trị đích HER2/neu bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng của người là trastuzumab. Cơ chế tác dụng điều trị của kháng thể này gồm: (1) cơ chế trực tiếp là ức chế sự sinh sản tế bào thông qua việc ức chế con đường tín hiệu, điều hòa thuận (down-modulation) của HER2/neu protein, hoạt hóa tín hiệu chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào ung thư; (2) cơ chế gián tiếp là ức chế khối u do có hoạt tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) [12]. Do đó, việc xác định HER2/neu dương tính đóng vai trò rất quan trọng nhằm giúp các bác sĩ lâm sàng chọn được bệnh nhân có thể đáp ứng với điều trị đích HER2/neu bằng trastuzumab phối hợp hóa trị liệu.

4.2. Mối liên quan của HER-2/neu với một số đặc điểm của ung thư dạ dày

Trong kết quả nghiên cứu ở bảng 3.5, chúng tôi trình bày sự phân tích về mối liên quan giữa tình trạng HER2/neu với một số đặc điểm của UTDD. Kết quả cho thấy tình trạng HER2/neu dương tính có liên quan với các đặc điểm là vị trí khối u, phân loại Lauren và độ biệt hóa.

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ có HER2/neu dương tính trong nhóm bệnh nhân ung thư dạ dày vùng tâm vị rất cao, đến 36,4%, trong khi đó ở nhóm UTDD vùng không tâm vị chỉ 11,4%, với sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p = 0,040$). Kết quả phù hợp hầu hết các công bố trên thế giới. Một nghiên cứu của Tanner trên 100 bệnh nhân UTDD tâm vị và 131 bệnh nhân UTDD không tâm vị, tỷ lệ khuếch đại gene HER2/neu được xác định bằng kỹ thuật CISH (chromogenic in situ hybridization) lần lượt là 24,0% và 12,2%, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,019$) [27]. Nghiên cứu của Lordick và các cộng sự (2007) từ nhiều trung tâm khác nhau với kết quả trên 1527 bệnh nhân UTDD, trong đó 1425 trường hợp có cả dữ liệu

xét nghiệm IHC và FISH đối với HER2/neu. Kết quả về tỷ lệ HER2/neu dương tính ở nhóm UTDD tâm vị là 32%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm UTDD vùng không tâm vị, 18% [19]. Ung thư tâm vị có hai bệnh nguyên riêng biệt. Một nhóm giống với UTDD phần xa (týp A) là hậu quả của viêm dạ dày teo do *H. pylori* hoặc hiếm hơn là viêm dạ dày teo tự miễn. Nhóm khác (týp B) giống với ung thư biểu mô thực quản và có khả năng là hậu quả của bệnh trào ngược dạ dày thực quản [21]. Ngoài ra, theo M.A. Kim đặc điểm mô bệnh học và một số dấu ấn phân tử của ung thư tâm vị và ung thư vùng không tâm vị cũng khác nhau [17]. Có lẽ đây là những yếu tố làm cho sự biểu lộ HER2/neu khác nhau giữa ung thư tâm vị và UTDD không thuộc tâm vị.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ có HER2/neu dương tính trong nhóm bệnh nhân ung thư dạ dày thể ruột cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm UTDD thể lan tỏa theo phân loại Lauren, 20,7% so với 5,9% ($p = 0,010$). Hầu hết các nghiên cứu của nhiều tác giả trên thế giới đều nhận thấy tỷ lệ có khuếch đại gene HER-2/neu trong thể ruột cao hơn trong thể lan tỏa. Nghiên cứu ở Hàn Quốc (2006) của Park trên 182 bệnh nhân ung thư dạ dày đã phát hiện được 7 trường hợp khuếch đại gene HER-2/neu, và tác giả cũng kết luận tỷ lệ có khuếch đại trong thể ruột cao hơn trong thể lan tỏa có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ [22]. Nghiên cứu của Gravalos (Tây Ban Nha, 2008) cho thấy tỷ lệ HER-2/neu dương tính ở thể ruột là 16%, trong khi ở thể lan tỏa chỉ 7% [12]. Nghiên cứu ở Phần Lan (2005) của Tanner đã kể ở trên cũng cho thấy tỷ lệ có khuếch đại gene HER-2/neu trong thể ruột khá cao, đến 21,5%, trong khi ở thể lan tỏa chỉ có 2% [27]. Đặc biệt, nghiên cứu ToGA năm 2010 là một nghiên cứu trên quy mô rộng, với số lượng bệnh nhân ung thư dạ dày được chẩn đoán HER-2/neu bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch và FISH lên đến 3803 người đã cho thấy tỷ lệ có HER-2 dương tính trong thể ruột là 32%, cao hơn so với thể lan tỏa chỉ 6% [26].

Theo Gravalos (2008), mối liên quan giữa gene ung thư với một thể mô bệnh học đặc hiệu chứng tỏ có một vài đặc tính có thể được biểu hiện cùng nhau (ví dụ quá biểu hiện HER-2/neu và thể ruột

trong ung thư dạ dày). Tuy nhiên, nguyên nhân dẫn đến gene HER-2/neu bị khuếch đại và quá biểu hiện ở ung thư dạ dày thể ruột là khá phức tạp và cần có nhiều nghiên cứu sâu hơn [12].

Khi khảo sát mối liên quan giữa HER2/neu với độ biệt hóa khối u, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ HER2/neu dương tính ở nhóm biệt hóa tốt và biệt hóa vừa khá cao, lần lượt là 18,6% và 23,8%, trong khi đó tỷ lệ này ở nhóm biệt hóa kém là rất thấp chỉ 5,8%; với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,046$). Nhận định của chúng tôi cũng phù hợp với một số nghiên cứu của các tác giả khác như: Kim J.W. (Hàn Quốc, 2012) đã nghiên cứu trên 114 bệnh nhân UTDD và nhận thấy tỷ lệ HER2/neu dương tính ở nhóm biệt hóa vừa cũng cao như chúng tôi, đến 24,2%, trong khi đó nhóm biệt hóa kém có tỷ lệ này chỉ là 3% (với $p = 0,004$) [16]. Tương tự, nghiên cứu của Grabsch (2010) trên 418 bệnh nhân UTDD ở Đức và 506 bệnh nhân UTDD ở Anh cũng nhận thấy tỷ lệ HER2/neu ở nhóm biệt hóa tốt và vừa (G1 và G2) là 12%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm biệt hóa kém và không biệt hóa (G3 và G4) là 3%, với $p = 0,007$ [11]. Tác giả He ghi nhận tỷ lệ HER2/neu dương tính trong UTDD biệt hóa tốt cao hơn UTDD biệt hóa kém (37,3% so với 11,6%, $p < 0,0001$) [13]. Lee K.E. (2003) nghiên cứu trên 841 bệnh nhân được cắt dạ dày triệt để tại Đại học Seoul, Hàn Quốc cũng nhận thấy sự biểu lộ HER2/neu có liên quan mức độ biệt hóa của khối u: Các khối u có biệt hóa biểu lộ HER2/neu cao hơn các khối u không biệt hóa (26,4% so với 9%) [18]. Raziei nghiên cứu trên 100 bệnh nhân UTBMT dạ dày thấy biểu lộ HER2/neu trong UTDD biệt hóa tốt là 41%, biệt hóa vừa là 11%, biệt hóa kém là 7%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,001$) [24]. Ngược lại, nghiên cứu của Czyzewska và Garcia đều nhận thấy không có mối liên quan giữa HER2/neu và các mức độ biệt hóa [8], [9]. Qua nghiên cứu này, kết hợp với ý kiến, chúng tôi thấy rằng mức độ biệt hóa khối u cũng có liên quan với sự biểu lộ HER2/neu.

Lý do của HER2/neu dương tính xuất hiện chọn lọc hơn trong UTDD thể ruột, nhóm biệt hóa tốt và vừa là phức tạp và cần phải nghiên cứu sâu hơn. Hơn nữa, theo một số nghiên cứu cho thấy UTDD thể ruột, thể biệt hóa tốt và vừa

là những thể ung thư có tiên lượng khả quan hơn so với thể lan tỏa, thể biệt hóa kém. Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi lại không tìm thấy mối liên quan với một số yếu tố khác của UTDD như phân loại Borrmann, giai đoạn TNM. Thực tế hiện nay, vấn đề vai trò tiên lượng của HER2/neu trong UTDD vẫn đang còn tranh cãi và chưa có kết luận đồng thuận, ngay cả các nghiên cứu có đánh giá thời gian sống còn sau 5 năm của UTDD vẫn có những kết luận trái chiều.

Tóm lại, bước đầu chúng tôi đã ứng dụng thành công cả hai kỹ thuật quan trọng trong việc đánh giá tình trạng HER2/neu ở UTDD là hóa mô miễn dịch (đánh giá mức biểu lộ protein) và lai tại chỗ huỳnh quang đánh giá khuếch đại gene với độ tương hợp cao. Từ nay, cơ sở của chúng tôi đã có thể thực hiện các kỹ thuật này để chọn lựa những bệnh nhân UTDD có khả năng đáp ứng tốt với hóa trị liệu phối hợp trastuzumab, việc điều trị thành công sẽ mở ra một triển vọng lớn về khả năng sống còn và chất lượng sống cho bệnh nhân.

5. KẾT LUẬN

Qua việc ứng dụng thành công kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (FISH) để xác định khuếch đại gene HER-2/neu và hóa mô miễn dịch (IHC) để đánh giá quá biểu lộ protein HER2/neu trên 160 bệnh nhân ung thư dạ dày, chúng tôi rút ra những kết luận như sau:

5.1. Tỷ lệ biểu lộ protein HER2/neu với IHC 0, 1+, 2+ và 3+ lần lượt là 70%, 10,6%, 10,6% và 8,8%. Tỷ lệ có khuếch đại gene HER-2/neu là 13,1%. Độ tương hợp của hai kỹ thuật hóa mô miễn dịch và lai tại chỗ huỳnh quang là 90,0%. Tỷ lệ được đánh giá HER2/neu bằng cả hai kỹ thuật là 13,1%.

5.2. Tình trạng HER-2/neu có liên quan đến các đặc điểm của ung thư dạ dày là vị trí khối u với tỷ lệ HER2/neu dương tính ở ung thư tâm vị cao hơn ung thư không tâm vị (36,4% và 11,4%), phân loại Lauren với tỷ lệ HER2/neu dương tính ở thể ruột cao hơn thể lan tỏa (20,7% và 5,9%) và độ biệt hóa với tỷ lệ HER2/neu dương tính ở nhóm biệt hóa tốt và biệt hóa vừa cao hơn nhóm biệt hóa kém (18,6% và 23,8% so với 5,8%). Tình trạng HER2/neu không liên quan đến tuổi, giới, phân loại Borrmann và giai đoạn TNM.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hội Giải phẫu bệnh - Tế bào bệnh học Việt Nam (2013), *Hướng dẫn xét nghiệm HER2 trong ung thư vú và ung thư dạ dày*, Nhà xuất bản Y học.
2. Trần Văn Huy, Hà Thị Minh Thi, Văn Trung Nghĩa V. T., Lê Phan Tường Quỳnh, Lê Tuấn Linh, Đoàn Hữu Nhật Bình, Đặng Công Thuận, Hồ Hữu Thiện, Phạm Như Hiệp (2014), “Bước đầu ứng dụng kỹ thuật lai tại chỗ huỳnh quang (FISH) để xác định tình trạng khuếch đại gene HER2/neu trong ung thư dạ dày”, *Tạp chí Y Dược học, trường Đại học Y Dược Huế*, 21 tr. 15-20.
3. Nguyễn Văn Thành, Lâm Thanh Cầm (2011), “Đặc điểm biểu hiện HER2 trên carcinom tuyến dạ dày”, *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh*, 15(2), tr. 43-47.
4. Allgayer H., Babic R., Gruetzner K. U., Tarabichi A., Schildberg F. W., Heiss M. M. (2000), “c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems”, *Journal of Clinical Oncology*, 18(11), pp. 2201-2209.
5. Barros-Silva J., Leitao D., Afonso L., Vieira J., Dinis-Ribeiro M., Frago M., Bento M., Santos L., Ferreira P., Rêgo S. (2009), “Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients”, *British Journal of cancer*, 100(3), pp. 487-493.
6. Boku N. (2014), “HER2-positive gastric cancer”, *Gastric Cancer*, 17(1), pp. 1-12.
7. Brien T. P., Depowski P. L., Sheehan C. E., Ross J. S., McKenna B. J. (1998), “Prognostic factors in gastric cancer”, *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 11(9), pp. 870-877.
8. Czyżewska J., Guzinska-Ustymowicz K., Kemon A. (2009), “Correlation of c-erbB-2, EGF and EGFR expression with postoperative survival of patients with advanced carcinoma of the stomach”, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 47(4), pp. 653-661.
9. Garcia I., Vizoso F., Martin A., Sanz L., Abdel-Lah O., Raigoso P., García-Muñiz J. (2003), “Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer”, *Annals of surgical oncology*, 10(3), pp. 234-241.
10. Gordon M. A., Gundacker H., Benedetti J., Macdonald J. S., Baranda J. C., Levin W. J., Blanke C., Elatre W., Weng P., Zhou J. (2013), “Assessment of HER2 gene amplification in adenocarcinomas of the stomach or gastroesophageal junction in the INT-0116/SWOG9008 clinical trial”, *Annals of oncology*, pp. mdt106.
11. Grabsch H., Sivakumar S., Gray S., Gabbert H. E., Müller W. (2010), “HER2 expression in gastric cancer: rare, heterogeneous and of no prognostic value—conclusions from 924 cases of two independent series”, *Analytical Cellular Pathology*, 32(1-2), pp. 57-65.
12. Gravalos C., Jimeno A. (2008), “HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target”, *Annals of Oncology*, 19(9), pp. 1523-1529.
13. He C., Bian X.-Y., Ni X.-Z., Shen D.-P., Shen Y.-Y., Liu H., Shen Z.-Y., Liu Q. (2013), “Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer”, *World journal of gastroenterology: WJG*, 19(14), pp. 2171.
14. Hofmann M., Stoss O., Shi D., Büttner R., Van de Vijver M., Kim W., Ochiai A., Rüschoff J., Henkel T. (2008), “Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study”, *Histopathology*, 52(7), pp. 797-805.
15. Jemal A., Center M. M., DeSantis C., Ward E. M. (2010), “Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends”, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(8), pp. 1893-1907.
16. Kim J. W., Im S.-A., Kim M., Cha Y., Lee K.-H., Keam B., Kim M. A., Han S.-W., Oh D.-Y., Kim T.-Y. (2012), “The prognostic significance of HER2 positivity for advanced gastric cancer patients undergoing first-line modified FOLFOX-6 regimen”, *Anticancer research*, 32(4), pp. 1547-1553.
17. Kim M. A., Lee H. S., Yang H. K., Kim W. H. (2005), “Clinicopathologic and protein expression differences between cardia carcinoma and noncardia carcinoma of the stomach”, *Cancer*, 103(7), pp. 1439-1446.
18. Lee K. E., Lee H.-J., Kim Y. H., Yu H. J., Yang H.-K., Kim W.-H., Lee K. U., Choe K. J., Kim J.-P. (2003), “Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer”, *Japanese journal of clinical oncology*, 33(4), pp. 173-179.
19. Lordick F., Bang Y., Kang Y., Reyes D. O.,

- Manikhas G., Shen L., Kulikov E., Stoss O., Jordan B., Van Cutsem E. (2007), "3541 POSTER HER2-positive advanced gastric cancer: similar HER2-positivity levels to breast cancer", *European Journal of Cancer Supplements*, 5(4), pp. 272.
20. Matsubara J., Yamada Y., Hirashima Y., Takahara D., Okita N. T., Kato K., Hamaguchi T., Shirao K., Shimada Y., Shimoda T. (2008), "Impact of insulin-like growth factor type 1 receptor, epidermal growth factor receptor, and HER2 expressions on outcomes of patients with gastric cancer", *Clinical Cancer Research*, 14(10), pp. 3022-3029.
 21. McColl K. E. (2006), "Cancer of the gastric cardia", *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 20(4), pp. 687-696.
 22. Park D. I., Yun J. W., Park J. H., Oh S. J., Kim H. J., Cho Y. K., Sohn C. I., Jeon W. K., Kim B. I., Yoo C. H. (2006), "HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer", *Digestive diseases and sciences*, 51(8), pp. 1371-1379.
 23. Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R, Leitão D, Preto JR, Seixas M, A. P. (2002), "c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma", *Int J Surg Pathol.*, 10(4), pp. 247-56.
 24. Raziei H., Taghizadeh K. A., GHAFARZADEGAN K., SHAKERI M., GHAVAM N. M. (2007), "HER-2/neu Expression in Resectable Gastric Cancer and its Relationship with Histopathologic Subtype, Grade, and Stage", pp.
 25. Stoss O., Nagelmeier I., Zielinski D., Rüschoff J. (2010), "The ToGA (Trastuzumab for Gastric Cancer) Trial: Importance from a Biomarker Perspective", *Connection*, 9(pp. 52.
 26. Tanner M., Hollmen M., Junttila T., Kapanen A., Tammola S., Soini Y., Helin H., Salo J., Joensuu H., Sihvo E. (2005), "Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIa gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab", *Annals of Oncology*, 16(2), pp. 273-278.
 27. Yan B., Yau E. X., Omar S. S. B., Ong C. W., Pang B., Yeoh K. G., Salto-Tellez M. (2010), "A study of HER2 gene amplification and protein expression in gastric cancer", *Journal of clinical pathology*, 63(9), pp. 839-842.
 28. Yano T., Ohtsu A., Boku N., Hashizume K., Nakanishi M., Ochiai A. (2006), "Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer", *Oncology reports*, 15(1), pp. 65-71.