

MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN MICA/B VÀ MỐI LIÊN QUAN VỚI HPV TRONG UNG THƯ VÒM HỌNG

Nguyễn Hoàng Việt^{1,2}, Trần Tín Nghĩa³, Lê Văn Hưng¹, Nguyễn Kim Đồng¹, Nguyễn Đình Thạch⁴, Phạm Anh Tuấn⁵

TÓM TẮT

Ung thư vòm họng là một trong những loại ung thư đặc trưng cho vùng phía Đông Nam Châu Á, trong đó bao gồm Việt Nam. Nhiễm human papillomavirus (HPV) đóng vai trò là yếu tố nguy cơ cao trong sự phát triển của loại hình ung thư này. Sự biểu hiện của protein MICA/B-kháng nguyên kích hoạt hệ thống miễn dịch tiêu diệt u tế bào, là yếu tố tác động quan trọng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm mối quan hệ cũng như sự ảnh hưởng của HPV lên mức độ biểu hiện MICA/B ở mô ung thư vòm họng. 84 mẫu mô ung thư vòm họng được thực hiện xác định nhiễm HPV bằng kỹ thuật Nested-PCR và mức độ biểu hiện protein MICA/B được thực hiện bằng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch. Kết quả cho thấy, phần lớn ung thư xảy ra ở nam và phân loại ở thể kém biệt hóa, chiếm tỉ lệ lần lượt là 70,23% và 77,38%. Mức độ biểu hiện của MICA/B đặc biệt giảm ở đối tượng dương tính với HPV ($p=0,04$). Đây là một gợi ý cho chúng ta thấy rằng, sự lây nhiễm HPV trong ung thư vòm họng đã giúp tế bào khối u lẩn tránh được hệ thống miễn dịch. Vì vậy, tìm hiểu mối liên hệ giữa biểu hiện của MICA và HPV mang yếu tố tiềm năng giúp tìm ra hướng đi mới trong điều trị ung thư vòm họng bằng liệu pháp miễn dịch.

Từ khóa: ung thư vòm họng, human papillomavirus, mức độ biểu hiện MICA/B

SUMMARY

ASSOCIATION BETWEEN MICA/B EXPRESSION AND HPV IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is one of the most commonly cancer occurred in Southern East Asia, including in Viet Nam. The infection of HPV (human papillomavirus) or the expression of MICA/B- a protein responsible for stimulating immune system to kill cancer cells, both of them recently have been demonstrated that relating to many kinds of human cancers. In this study, we want to figure out the relationship between HPV and MICA/B in NPC cancer. We collected 84 samples of NPC cancer patients to

analyze by Nested-PCR and immunohistochemistry (IHC) method. The results showed that 11/84 (13,1%) HPV positive. Moreover, MICA/B expression was significantly decreased in positive HPV group compared to none infected by HPV. Leading to a hypothesis that HPV maybe was an important reason for promoting cancer cells escape from immune system protection. Therefore, understanding the affection of HPV on level of MICA/B expression may further improve treatment on patients with NPC by immunotherapy.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma, Human Papillomavirus, MICA/B expression

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư vòm họng là loại ung thư ác tính, phát sinh từ biểu mô niêm mạc của vòm họng¹, rất phổ biến và có xu hướng gia tăng ở các nước trên thế giới, đặc biệt với khu vực Đông Nam Châu Á³. Tại Việt Nam, theo Globacan thống kê năm 2021, ung thư vòm họng đứng vị trí thứ 9 trong các loại ung thư thường xảy ra hiện nay, trong đó có hơn 6.000 ca bệnh được phát hiện, nhưng chiếm tỉ lệ tử vong cao (3.706 ca). Sự phát triển và di căn của tế bào ung thư là nguyên nhân khiến việc điều trị càng trở nên khó khăn và dẫn đến thất bại.

HPV là một virus có vật chất di truyền là DNA vòng xoắn kép, khép kín, kích thước xấp xỉ 8kb và có khả năng lây nhiễm vào tế bào biểu mô. Dựa trên mối tương quan với bệnh ung thư, HPV được chia thành 2 nhóm. Nhóm không gây đột biến gen (nononcogene) hoặc nguy cơ thấp là những nhóm thường liên quan đến nổi mụn cóc sinh dục và xuất hiện u nhú đường hô hấp tái phát (respiratory papillomatosis- RRP). Nhóm thứ hai là nhóm gây nhiễm trung dai dẳng hoặc có khả năng gây ung thư. Đây là nhóm đặc biệt quan trọng vì có yếu tố nguy cơ cao dẫn đến phát triển ung thư, bao gồm các loại như: ung thư cổ tử cung và ung thư vòm họng. Những nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng, ung thư vòm họng có liên quan đến sự hiện diện của virus HPV, rõ hơn là những bệnh nhân âm tính với HPV cho kết quả điều trị khả quan hơn so với những bệnh nhân có HPV dương tính⁴. Tuy nhiên, hiểu rõ hơn về vai trò cũng như tác động của HPV trên ung thư vòm họng. Vì vậy, những nghiên cứu tiếp theo hứa hẹn sẽ đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ đưa ra phác đồ điều

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội

³Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

⁴Viện K Tân Triều- Hà Nội

⁵Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung Ương

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hoàng Việt

Email: hoangviet@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 27.5.2022

Ngày phản biện khoa học: 20.7.2022

Ngày duyệt bài: 27.7.2022

trị thích hợp và cải thiện kết quả ở bệnh nhân.

MICA (Major histocompatibility complex class I chain-related peptide A) và MICB (Major histocompatibility complex class I chain-related peptide B) là 2 kháng nguyên nằm trên bề mặt tế bào, được mã hóa bởi gene MICA và MICB, có chức năng kích hoạt hệ thống miễn dịch tiêu diệt tế bào u. Thông thường, sự tăng tiết MICA/B được quan sát ở hầu hết các dạng ung thư, đây là tín hiệu cảnh báo để tế bào diệt tự nhiên NK trong hệ miễn dịch sẽ được phát động mạnh và ly giải các tế bào u⁵. Vì vậy, MICA/B đóng vai trò quan trọng trong phản ứng miễn dịch chống lại ung thư, tuy nhiên, mức độ protein cũng như ý nghĩa của nó trong từng giai đoạn u tiến triển, kể cả trong ung thư vòm họng thì vẫn chưa được

làm rõ. Tại đây, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục đích tìm hiểu mối liên quan giữa nồng độ biểu hiện protein MICA/B và tác nhân HPV trên bệnh nhân ung thư vòm họng tại Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng. 84 mẫu mô đúc nền được thu thập của bệnh nhân đã được chẩn đoán ung thư vòm họng tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ tháng 4/2019 đến tháng 12/2020. Những bệnh nhân này chưa nhận bất kỳ một phương pháp điều trị nào, mẫu mô ung thư được chẩn đoán và lưu trữ tại khoa Giải phẫu bệnh, trường Đại học Y Hà Nội.

2. Phương pháp. Xác định HPV DNA bằng kỹ thuật Nested-PCR

Bảng 1. Trình tự mỗi sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mỗi	Trình tự	Độ dài khuếch đại
1	GP5 ⁺ M1 - 2	5' - TTTTRTTACTGTTGTWGATACTAC - 3'	140 bp
2	GP5 ⁺ M2 - 2	5' - TGTWACTGTTGTWGATACCAC - 3'	
3	GP5 ⁺ M3 - 2	5' - GT WACTGTTGTRGACACCAC - 3'	
4	GP6 ⁺ M1 - 2	5' - AATTGAAAWATAAACTGTAAWTCATATTC - 3'	
5	GP6 ⁺ M2 - 2	5' - GAAACATAAAYTGTAAATCAWATTC - 3'	
6	GP6 ⁺ M3	5' - GAAAATYTGCAAATCAWACTC - 3'	
7	GP5 ⁺	5' - TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC - 3'	
8	GP6 ⁺	5' - GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C - 3'	

Đoạn trình tự DNA có độ dài 140 bp nằm trên gene L1 của HPV được khuếch đại bằng kỹ thuật Nested - PCR thông qua sử dụng các cặp mỗi GP5⁺ và GP6⁺ cải tiến. Các mẫu cho kết quả âm tính với HPV được kiểm tra lại bằng phản ứng Nested - PCR sử dụng cặp mỗi GP5⁺ và GP6⁺ nguyên bản⁶. Trình tự các đoạn mỗi được tổng hợp ở Bảng 1.

Phản ứng PCR được thực hiện theo hai vòng dựa vào nguyên lý Nested - PCR. Vòng 1 của phản ứng PCR được sử dụng chu trình nhiệt: 95°C/5 phút; 40 chu kỳ [95°C/30 giây, 45°C/30 giây và 72°C/30 giây]; 72°C/10 phút rồi bảo quản sản phẩm phản ứng ở 4°C. Ở phản ứng PCR vòng 2, chu trình nhiệt được lặp lại nhưng nhiệt độ gắn mỗi được nâng lên 58°C trong 42 chu kỳ. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% kèm theo thang marker 100bp chuẩn (Invitrogen 100bp DNA ladder, 15628 -19) cùng với mẫu chuẩn dương của HPV để phát hiện những mẫu dương tính với DNA HPV.

Nhuộm hóa mô miễn dịch. Sự biểu hiện của MICA/B được đánh giá bằng phương pháp hóa mô miễn dịch và được nhuộm trên thiết bị BenchMark XT. Mảnh sinh thiết vùi trong parafin được cắt thành tiêu bản có độ dày 4 µm và trải lên lam kính điện. Theo sau đó là quá trình khử

parafin trong xylene và khử nước lần lượt trong cồn 100%, 90% và 80%. Tiếp theo, tiêu bản được ủ trong đệm Citrate (pH=9) tại 95°C trong 1 giờ. Men peroxidase nội sinh được bất hoạt bởi ultraVIEW Universal DAB (Ventana, Cat#253-4291) trong 4 phút ở 37°C. Sau khi rửa 3 lần bằng đệm PBS (phosphate-buffered saline), tiêu bản được ủ với kháng thể đa dòng MICA/B kháng thỏ (tỉ lệ pha loãng 1:100, Abcam, 203679) trong 32 phút tại 37°C. Chứng âm và chứng dương đều được thực hiện song song với mẫu nghiên cứu. Trong đó, chứng dương được sử dụng là mẫu mô của ung thư biểu mô phổi theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chứng âm là mẫu nghiên cứu không được phủ kháng thể 1. Tiếp theo, mẫu được rửa lại 3 lần bằng PBS rồi đem ủ với ultraVIEW Universal HRP Multimerto (Ventana, Catalog number 253-4290) trong 8 phút tại 37°C. Tiếp tục rửa với PBS 3 lần, tiêu bản được quan sát thông qua một kết tủa màu nâu, tạo ra bởi HRP khi bổ sung ultraVIEW Universal hydrogen peroxide (Ventana, Cat#253-4293) và kit nhuộm ultraVIEW Universal DAB (Ventana, Cat#253-4292) trong 8 phút tại 37°C. DAB được đổi màu khi thêm vào ultraVIEW Universal Copper (Ventana, Cat#253-4294) trong 4 phút ở 37°C. Sau đó, mẫu bệnh phẩm được

nhuộm bằng hematoxylin II (Ventana, Cat#790-2280) và ủ với Bluing Reagent (Ventana, Cat#790-2037) trong cùng điều kiện. Cuối cùng, mẫu được rửa bằng hỗn hợp nước rửa và khử nước bằng cồn, làm sạch bằng xylene, được bao phủ bởi Richard-Allan Scientific Mounting Medium (ThermoFisher Scientific, ID 4112) và quan sát dưới kính hiển vi.

Định lượng mức độ biểu hiện protein MICA/B trên mô. Protein MICA/B được biểu hiện trên bề mặt của tế bào biểu mô. Mức độ biểu hiện của MICA/B được xác định bằng việc đánh giá cường độ nhuộm và tỉ lệ dương tính của tế bào biểu mô. Cường độ nhuộm được chấm điểm theo hệ thống chấm điểm Allred: âm tính (0); yếu (+); trung bình (++) và mạnh (+++). Tỉ lệ dương tính của tế bào mô được chấm điểm lần lượt là: âm tính (0P); < 1% (1P); 1 - 10% (2P); 11 - 33% (3P); 34 - 66% (4P) và > 67% (5P). Mức độ biểu hiện MICA/B tổng thể được tính toán bằng cách tính tổng cường độ và tỉ lệ phần trăm kết quả, giá trị nằm trong khoảng từ 0 đến 8. Cuối cùng, 84 mẫu bệnh phẩm được đánh mù rồi được đánh giá và tính điểm bởi 2 chuyên gia mô bệnh học độc lập tại trường Đại học Y Hà Nội. Kết quả không ghi nhận thấy sự khác biệt giữa 2 bên.

Phân tích thống kê. Sự biểu hiện khác nhau của MICA/B trong đối với HPV (-) và (+) trên nhóm bệnh nhân ung thư vòm họng được thống kê bằng Student's T-test. Trong tất cả các kết quả phân tích, $p < 0,05$ được chỉ ra sự khác biệt thống kê có ý nghĩa. Các giả thuyết được kiểm định bằng phần mềm GraphPad Prism 8 (San Diego, USA).

3. Đạo đức nghiên cứu. Nghiên cứu này đã được chấp thuận bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học của Trường Đại học Y Hà Nội số 26/HMUIRB. Các thông tin cá nhân hoàn toàn được bảo mật.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm nhóm nghiên cứu

Bảng 2: Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

Giới tính (%)	Nam	59(70,23%)
	Nữ	25(29,77%)
Tuổi (trung bình ± độ lệch chuẩn)		52,81 ± 12,32
Phân loại tế bào học	Ung thư thể kém biệt hóa	65 (77,38%)
	Ung thư thể tế bào vảy	19 (22,62%)
Tổng số		84

84 mẫu bệnh phẩm được chẩn đoán ung thư vòm họng tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội được

chọn để tham gia nghiên cứu. Trong đó, tỉ lệ nam giới chiếm phần lớn so với nữ giới, cụ thể lần lượt là 70,23% và 29,77%, với độ tuổi trung bình là $52,81 \pm 12,32$ tuổi. Bên cạnh đó, tỉ lệ ung thư vòm họng được phát hiện chủ yếu ở thể kém biệt hóa với tỉ lệ 77,38% so với thể tế bào vảy (22,62%).

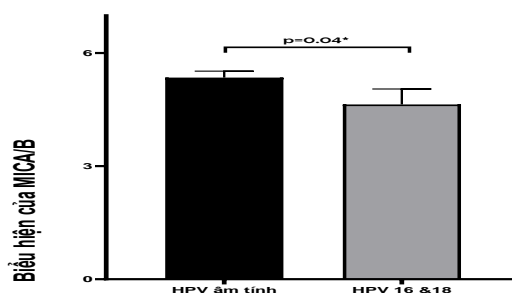
2. Phân loại tỉ lệ nhiễm HPV trong nghiên cứu

Bảng 3: Tỷ lệ nhiễm HPV phát hiện được trong nghiên cứu

Tổng số (N)	84
HPV âm tính	73 (86,9%)
HPV dương tính	11 (13,1%)

Chúng tôi phát hiện 11 mẫu dương tính với HPV (chiếm 13,1%) trong tổng số 84 mẫu bệnh phẩm được khảo sát.

3. Đánh giá sự liên quan giữa mức độ biểu hiện của MICA/B và HPV



Hình 1: Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện của protein MICA/B và tình trạng nhiễm HPV trên mẫu ung thư vòm họng

Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch sau khi định lượng cho ta thấy mức độ biểu hiện của protein MICA/B đặc biệt giảm có ý nghĩa thống kê với $p = 0,04$ so với bệnh nhân ung thư vòm họng dương tính với HPV. Thông qua kết quả thí nghiệm này, chúng tôi nhận định rằng, sự hiện diện của HPV có thể là nguyên nhân gây suy giảm hệ thống miễn dịch phòng vệ tự nhiên của cơ thể chống lại ung thư thông qua lượng giảm MICA/B protein so với những bệnh nhân ung thư vòm họng có HPV âm tính.

IV. BÀN LUẬN

Tỉ lệ tử vong của các bệnh liên quan đến ung thư được xếp cao thứ 2 trên thế giới. Tuy nhiên, số lượng nhiễm HPV liên quan đến ung thư chiếm chủ yếu trong các bệnh về lây truyền qua đường sinh dục ở cả nam và nữ. HPV thuộc họ Papillomaviridae, mang bộ gene là DNA sợi kép. Capsid hình tứ diện bao bọc vật chất di truyền, có cấu trúc chính là L1 và cấu trúc phụ là L2. Dựa vào trình tự cấu trúc L1, gene sẽ mã hóa

thành protein capsid chính để định danh và hình thành hơn 200 loại HPV đặc trưng. Thông thường, hệ thống miễn dịch sẽ tiêu diệt các tác nhân virus lạ này nếu chúng xâm nhập vào cơ thể. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, tế bào sau khi bị lây nhiễm với các chủng HPV được xếp vào loại nguy cơ cao, có thể dẫn đến mất cân bằng tăng trưởng và không bị kiểm soát bởi hệ thống miễn dịch, đó là nguyên do dẫn tới việc hình thành khối u hoặc tiền ung thư⁷. Sự góp mặt của HPV đã được công bố liên quan đến nhiều loại ung thư khác nhau, ví dụ như ung thư cổ tử cung, ung thư bẩm sinh và ung thư vùng đầu và cổ. Song, vẫn chưa có nghiên cứu nào chỉ rõ cơ chế gây bệnh và con đường tác động của HPV lên hệ miễn dịch của bệnh nhân ung thư vòm họng, đặc biệt là trên quần thể người Việt Nam.

Tế bào NK (Natural killer) là tế bào bạch huyết trong hệ miễn dịch, đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể chống lại tế bào u bằng cơ chế trung hòa độc tố. Trong đó, MICA/B là 2 phối tử quan trọng để hoạt hóa tế bào NK hoạt động⁵. Ở người bình thường, MICA/B hiếm khi biểu hiện, nhưng lại tăng tiết khi có sự hiện diện của tế bào ung thư, ví dụ trong ung thư đại trực tràng, ung thư vú, hay ở ung thư tuyến tụy. Bên cạnh đó, trong một vài nghiên cứu gần đây đưa ra, sự biểu hiện MICA/B giảm ở bệnh nhân, tạo cơ hội để tế bào u tiến triển và rút ngắn thời gian sống sót của những bệnh nhân này⁸. Vì vậy, việc tìm hiểu các yếu tố tác động liên quan đến biểu hiện của MICA/B là rất cần thiết. Tuy nhiên, trong ung thư vòm họng, vấn đề này vẫn là câu hỏi cần được giải đáp. Vì vậy, nghiên cứu của chúng tôi tập trung vào phân tích mối quan hệ của 2 yếu tố quan trọng trong ung thư vòm họng là HPV và biểu hiện của MICA/B. Kết quả của thí nghiệm cho rằng, những bệnh nhân bị ung thư vòm họng mà dương tính với HPV có thể gây giảm độ đặc hiệu của hệ thống miễn dịch thông qua sự giảm tiết MICA- là một protein chịu trách nhiệm kích hoạt hệ thống tiêu diệt tế bào ung thư trong cơ thể. Đây là điều kiện tốt để tế bào ung thư vòm họng gia tăng khả năng tồn tại, phát triển và di căn. Vì vậy, hiệu quả của con đường miễn dịch liên quan đến sự biểu hiện MICA/B mang ý nghĩa lớn trong việc điều trị ung thư vòm họng trong tương lai mà chúng ta cần hướng đến trong các nghiên cứu tiếp theo.

Do quy mô nghiên cứu còn hạn chế, nên các số liệu thu thập còn thiếu sót, ví dụ như tỷ lệ sống còn và phân loại giai đoạn ung thư của từng bệnh nhân vẫn chưa được cung cấp, cũng như tiến sâu vào tìm hiểu con đường hình thành

và cơ chế tác động của HPV lên sự biểu hiện của các dấu ấn sinh học trong hệ thống miễn dịch còn chưa được thực hiện. Tuy nhiên, đây cũng là bước khởi đầu, mở ra hướng nghiên cứu mới để tiếp tục làm sáng tỏ.

V. KẾT LUẬN

Trong 84 bệnh nhân ung thư vòm họng được quan sát, phần lớn gặp ở nam giới với tỉ lệ 70,23% và phổ biến thuộc phân loại ung thư kém biệt hóa (65/84 chiếm tỉ lệ 77,38% trên tổng số). Ngoài ra, chúng tôi đã phát hiện 11 trường hợp dương tính với HPV. Bằng kĩ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch, sự biểu hiện của protein MICA/B cho thấy nồng độ protein MICA/B trong những bệnh nhân có HPV dương tính giảm có ý nghĩa thống kê so với những trường hợp âm tính với HPV. Điều đó chỉ ra rằng, sự lây nhiễm HPV có thể là một trong những nguyên nhân gây suy giảm hiệu quả của hệ thống miễn dịch cũng là lá chắn bảo vệ tự nhiên của cơ thể.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.02-2018.312

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chen YP, Chan ATC, Le QT, Blanchard P, Sun Y, Ma J.** Nasopharyngeal carcinoma. *The Lancet*. 2019;394(10192):64-80. doi:10.1016/S0140-6736(19)30956-0
2. **Asante DB, Asmah RH, Adjei AA, et al.** Detection of Human Papillomavirus Genotypes and Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal Carcinomas at the Korle-Bu Teaching Hospital, Ghana. *ScientificWorldJournal*. 2017;2017:2721367. doi:10.1155/2017/2721367
3. **Lee HM, Okuda KS, González FE, Patel V.** Current Perspectives on Nasopharyngeal Carcinoma. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1164:11-34. doi:10.1007/978-3-030-22254-3_2
4. **Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al.** Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(1):24-35. doi:10.1056/NEJMoa0912217
5. **Ghadially H, Brown L, Lloyd C, et al.** MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br J Cancer*. 2017;116(9):1208-1217. doi:10.1038/bjc.2017.79
6. **Le HHL, Bi X, Ishizaki A, et al.** Human papillomavirus infection in male patients with STI-related symptoms in Hanoi, Vietnam. *J Med Virol*. 2016;88(6):1059-1066. doi:10.1002/jmv.24422
7. **Szymonowicz KA, Chen J.** Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer Biol Med*. 2020;17(4):864-878. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370
8. **Fang L, Gong J, Wang Y, et al.** MICA/B expression is inhibited by unfolded protein response and associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2014;33:76. doi:10.1186/s13046-014-0076-7