

BIỂU HIỆN GRANZYME B Ở TỔN THƯƠNG DA ĐẶC HIỆU LUPUS

Lê Huyền My¹, ✉, Lê Hữu Doanh², Trần Lan Anh³

¹Bệnh viện Da Liễu Trung ương,

²Trường Đại học Y Hà Nội,

³Bệnh viện Da Liễu Hà Nội

Tổn thương da trong lupus ban đỏ chia thành tổn thương đặc hiệu và không đặc hiệu. Granzym B do các tế bào lympho T độc, tế bào diệt tự nhiên (NK)... tiết ra, có khả năng gây hiện tượng chết theo chương trình, một trong những cơ chế bệnh sinh của tổn thương da đặc hiệu lupus. Mục đích của nghiên cứu: Nhuộm hóa mô miễn dịch với marker granzym B để tìm hiểu sự biểu hiện của granzym B tại tổn thương da đặc hiệu lupus. Kết quả: 85,7% tổn thương da đặc hiệu lupus dương tính với granzym B, trong đó ACLE 81,2%, SCLE 92,3%, CCLE 93,8%. Mật độ trung bình tế bào biểu hiện granzym B dương tính/vi trường ở ACLE, SCLE, CCLE là 16,5±19,1, 17,7±12,8, 22,8±17,1%. Tỷ lệ dày sừng nang lông và viêm quanh phần phụ cao hơn ở nhóm biểu hiện granzym B dương tính so với nhóm âm tính.

Từ khóa: Lupus ban đỏ hệ thống, tổn thương da đặc hiệu lupus, granzym B.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lupus ban đỏ hệ thống (Systemic lupus erythematosus - SLE) thuộc nhóm bệnh mô liên kết tự miễn mạn tính, có tần xuất xuất hiện tổn thương da tương đối cao.¹ Tổn thương da trong lupus ban đỏ chia thành tổn thương đặc hiệu và không đặc hiệu, các tổn thương đặc hiệu gồm tổn thương cấp tính, bán cấp và mạn tính.² Có nhiều minh chứng về sinh bệnh học tổn thương da liên quan tới cả yếu tố gen và môi trường, vai trò của tia UV làm sản sinh các cytokin tiền viêm, các chemokine, phân tử kết dính. Hiện tượng chết theo chương trình, hoại tử mô, tự kháng thể, tế bào tua gai dạng tương bào (pDC), tế bào B, tế bào T, biến đổi ở mạch máu đều góp phần gây ra và duy trì các tổn thương da lupus.^{3,4} Granzym B là enzym serine proteases, do các tế bào lympho T độc, tế bào diệt tự nhiên (NK), lympho T diệt tự nhiên (NK

T), pDC... tiết ra.⁵ Granzym B có khả năng gây hiện tượng chết theo chương trình mà quá trình này gây phân cắt các tự kháng nguyên dẫn tới hình thành các tự kháng thể bệnh lý.^{6,7} Sự có mặt các tế bào dị sừng cùng dấu hiệu thâm nhiễm lympho gây tổn thương các tế bào sừng màng đáy gợi ý vai trò của chết theo chương trình các tế bào sừng trong sinh bệnh học tổn thương da đặc hiệu lupus.

Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này với mục tiêu: Tìm hiểu sự biểu hiện của granzym B tại tổn thương da đặc hiệu lupus.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Các bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc bệnh lupus ban đỏ hệ thống (SLE), có tổn thương da tại bệnh viện Da Liễu Trung Ương từ tháng 12/2015 - 12/2017.

2. Phương pháp

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

- Các bước tiến hành:

Tác giả liên hệ: Lê Huyền My,

Bệnh viện Da liễu Trung ương

Email: lemy_vietnam@yahoo.com

Ngày nhận: 20/12/2019

Ngày được chấp nhận: 14/02/2020

Nhóm bệnh:

- Bệnh nhân được khám lâm sàng và làm các xét nghiệm chẩn đoán xác định là SLE (Theo tiêu chuẩn của Hội Thấp khớp học Hoa Kỳ (ACR) năm 1997).

- Đánh giá các loại tổn thương da đặc hiệu lupus:

+ Tổn thương lupus da cấp tính (Acute Cutaneous LE - ACLE): Ban cánh bướm, tổn thương ACLE lan tỏa (ban sẩn đỏ, dát dạng mày đay, ưu thế ở vùng tiếp xúc với ánh nắng).

+ Tổn thương bán cấp (Subacute Cutaneous LE - SCLE): Tổn thương dạng vòng (dát đỏ hình bầu dục hoặc đa cung, trung tâm lành, đôi khi có mụn nước ở rìa tổn thương), tổn thương dạng vảy nến (sẩn đỏ riêng rẽ hoặc liên kết thành đám, trên có vảy trắng).

+ Tổn thương mạn tính (Chronic Cutaneous LE - CCLE): Tổn thương dạng đĩa (mảng thâm nhiễm, dày sừng ở trung tâm, vảy dính, dày ở nang lông giãn nở, sẹo và teo da), tổn thương viêm mô mỡ dưới da (cục cứng hay tổn thương lõm trên da, da phía trên tổn thương có thể bình thường hoặc teo da), lupus cước (sẩn, mảng màu đỏ tím, căng, đau, tạo thành những bóng nước, vết nứt)...

- Sinh thiết tổn thương da đặc hiệu hoạt tính.

- Nhuộm HE đánh giá một số biến đổi mô bệnh học tổn thương da đặc hiệu lupus. Hóa chất: Hematoxylin Harris (Diapath - Italia), Eosin (Thermo Scientific - Anh).

- Nhuộm hóa mô miễn dịch với marker granzym B xác định tế bào granzym B +.

+ Nhóm chứng: Nhuộm hóa mô miễn dịch với marker granzym B trên 20 mẫu da lành của người khỏe mạnh.

- Kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch với granzym B: Dựa trên nguyên lý sử dụng các kháng thể đơn dòng phát hiện các kháng nguyên đặc hiệu có trong các mảnh cắt mô đã

chuyển đúc trong paraffin. Kháng thể đơn dòng kháng granzym B được sản xuất bởi hãng Cell Marque - Mỹ; dung dịch bộc lộ kháng nguyên, dung dịch rửa tiêu bản Tris Bufer Saline (TBS), dung dịch Envision + Dualink System Peroxidase, Diamino - Benzidin (DAB) của hãng Dako Cytomation (Đan Mạch). Nồng độ pha loãng kháng thể và quy trình nhuộm theo hướng dẫn của nhà sản xuất đối với từng loại kháng thể.

Kết quả:

- Dương tính: có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên tế bào, hiển thị bằng màu vàng nâu.

- Âm tính: không có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên tế bào, không được hiển thị bằng màu vàng nâu

Đánh giá mức độ thâm nhiễm tế bào granzym B+: dựa trên phần trăm số tế bào biểu hiện granzym B+ trong tổng số tế bào viêm/vi trường.

+ Âm tính: Không có mặt tế bào granzym B+

+ Ít: 1 - 10% tế bào dương tính/vi trường.

+ Vừa: 10 - 50% tế bào dương tính/vi trường.

+ Nhiều: > 50% tế bào dương tính/vi trường.

- Địa điểm nghiên cứu: tại Bệnh viện Da liễu Trung ương.

- Xử lý số liệu theo chương trình SPSS 20.0. So sánh sự khác biệt về các biến định tính của hai hay nhiều nhóm bằng test χ^2 . Sử dụng Anova test để so sánh các trung bình.

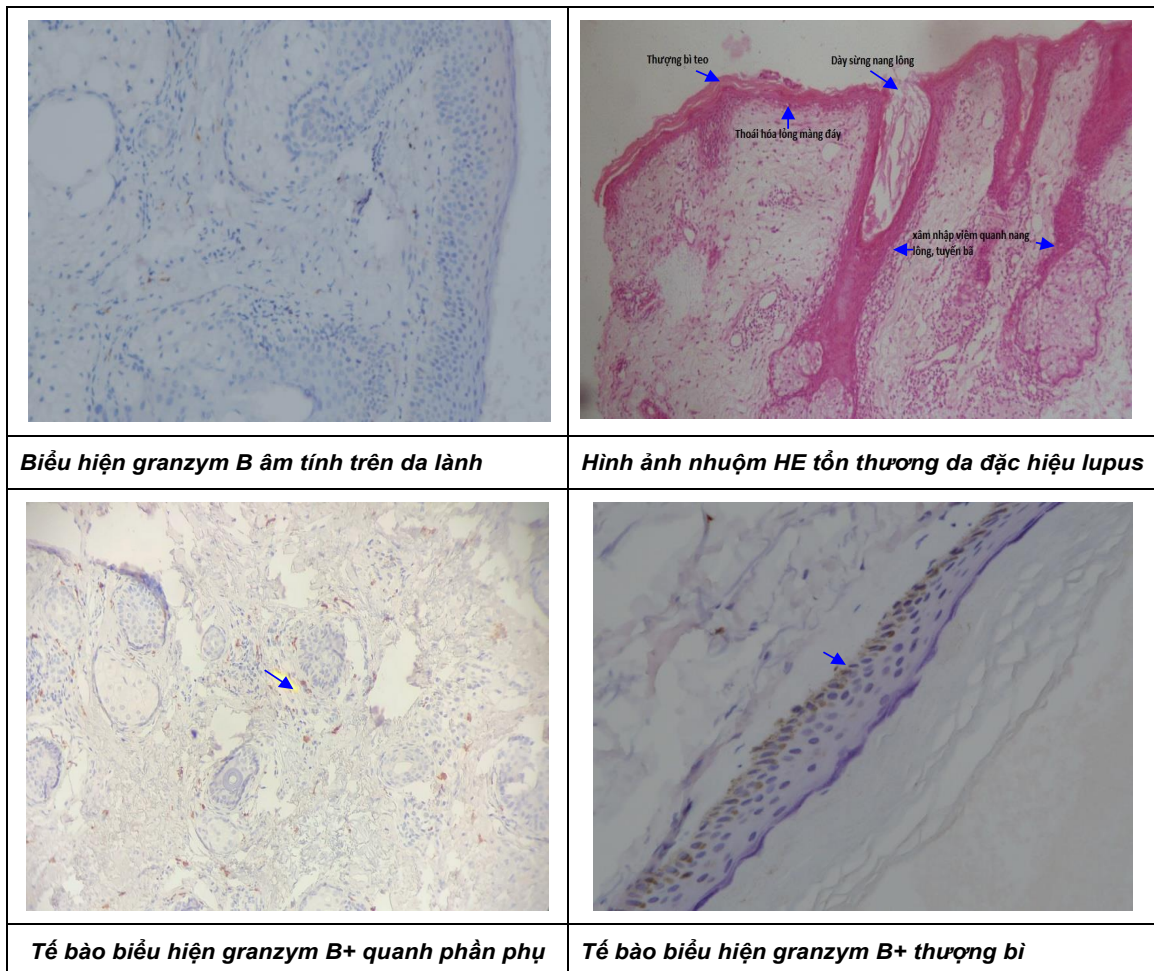
- Đạo đức nghiên cứu: Các bệnh nhân được tư vấn cụ thể và tự nguyện tham gia nghiên cứu. Các thông tin của bệnh nhân được giữ kín và lưu hồ sơ. Nghiên cứu này đã được thông qua Hội đồng xét duyệt luận án nghiên cứu sinh Trường Đại học Y Hà Nội theo quyết định số 2863/QĐ - ĐHYHN ngày 19 tháng 8 năm 2014.

III. KẾT QUẢ

1. Biểu hiện granzym B ở nhóm bệnh và nhóm chứng

Bảng 1. Tỷ lệ biểu hiện granzym B ở nhóm bệnh và nhóm chứng

Granzym B	Nhóm bệnh nhân		Nhóm chứng		p
	n	%	n	%	
Âm tính	11	14,3	18	90,0	< 0,0001
Dương tính	66	85,7	2	10,0	
Tổng số	77	100	20	100	



Hình 1. Hình ảnh mô bệnh học nhuộm HE và granzyme B

Chúng tôi tiến hành nhuộm hóa mô miễn dịch với granzym B trên 77 mẫu sinh thiết tổn thương da đặc hiệu lupus và 20 mẫu da lành. Kết quả 85,7% mẫu da bệnh dương tính với granzym B cao hơn so với nhóm chứng (10%). Sự khác biệt có nghĩa thống kê với $p < 0,0001$ (bảng 1, hình 1).

2. Biểu hiện granzym B ở các tổn thương da đặc hiệu

Bảng 2. Biểu hiện granzym B ở các tổn thương da đặc hiệu

Granzym B	ACLE		SCLE		CCLE		p
	n	%	n	%	n	%	
Âm tính	9	18,8	1	7,7	1	6,2	0,42
Dương tính	39	81,2	12	92,3	15	93,8	
Trung bình % tế bào dương tính/vi trường	16,5 ± 19,1		17,7 ± 12,8		22,8 ± 17,1		0,16

77 mẫu sinh thiết tổn thương da đặc hiệu gồm ACLE 60%, SCLE 16,3% và CCLE 20,0%. Tỷ lệ tổn thương ACLE dương tính với granzym B là 81,2%, SCLE 92,3%, CCLE 93,8%. Mật độ trung bình tế bào biểu hiện granzym B dương tính/vi trường ở ACLE, SCLE, CCLE lần lượt là 16,5 ± 19,1, 17,7 ± 12,8, 22,8 ± 17,1 %. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3. Một số dấu hiệu mô bệnh học ở nhóm biểu hiện granzym B dương tính và âm tính

Bảng 3. Một số dấu hiệu mô bệnh học ở nhóm biểu hiện granzym B dương tính và âm tính

Triệu chứng	Granzym B		p
	Âm tính (%) (n = 11)	Dương tính (%) (n = 66)	
Dày sừng	36,4	57,6	0,33
Thượng bì teo	63,6	42,4	0,33
Dày màng đáy	54,5	60,6	0,75
Thoái hóa lỏng màng đáy	100	77,3	0,11
TB dị sừng thượng bì	18,2	24,2	1,0
TB dị sừng trung bì	0	15,2	0,34
Giãn mạch	90,9	93,9	0,55
Dày sừng nang lông	72,7	92,5	0,04
Mất cấu trúc phần phụ	0	7,6	1,0
Viêm quanh phần phụ	54,5	87,9	0,02
Thoái hóa lỏng phần phụ	63,6	62,1	1,0
Bạch cầu trung tính	18,5	33,3	0,29
Thâm nhiễm LP nông	93,8	100,0	1,0
Thâm nhiễm LP sâu	86,2	86,7	1,0

Các mẫu sinh thiết được nhuộm hóa mô miễn dịch xác định tế bào dương tính với granzym B, nhuộm HE đánh giá các biến đổi mô bệnh học của tổn thương da đặc hiệu lupus bao gồm dày sừng, dày sừng nang lông, thượng bì teo, thoái hóa lỏng lớp tế bào đáy, dày màng đáy, tế bào dị

sừng, thâm nhiễm bạch cầu đơn nhân, trung tính, viêm và phá hủy cấu trúc phần phụ. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ dày sừng nang lông và viêm quanh phần phụ cao hơn ở nhóm biểu hiện granzym B dương tính so với nhóm âm tính ($p < 0,05$) (bảng 3).

IV. BÀN LUẬN

Granzym B là một enzym thủy phân các liên kết peptid được tìm thấy trong các hạt của lympho T độc, tế bào diệt tự nhiên, pDC... có khả năng khởi phát sự chết theo chương trình. Khi nhuộm hóa mô miễn dịch, ở nhóm bệnh nhân, 85,7% tổn thương da đặc hiệu lupus dương tính với granzym B cao hơn so với nhóm chứng (10%), $p < 0,0001$. Kết quả của chúng tôi tương tự tác giả Abdou (2013) thấy có tăng rõ rệt biểu hiện granzym B ở tổn thương da lupus so với da lành.⁸

Đối với từng loại tổn thương lupus da, tỷ lệ tổn thương dương tính với granzym B ở SCLE (92,3%) và CCLE (93,8%) lớn hơn so với ACLE (81,2%). Các nghiên cứu về biểu hiện granzym B+ ở tổn thương da lupus trên thế giới chưa nhiều. Grassi (2009) nhuộm hóa mô miễn dịch xác định granzym B trên 22 mẫu tổn thương da lupus bao gồm 9 tổn thương CCLE (đều là tổn thương dạng đĩa DLE), 9 SCLE, 4 ACLE. Granzym B dương tính gặp ở 17/22 bệnh nhân (3/9 ca SCLE, 2/9 ca DLE và 3/4 ca ACLE) [70]. Abdou (2013) chỉ khảo sát trên tổn thương dạng đĩa (DLE), tỷ lệ dương tính là 60%.⁹ Như vậy, so với các tác giả trên, tỷ lệ xuất hiện tế bào granzym B+ ở từng loại tổn thương ACLE, SCLE, CCLE của chúng tôi đều cao hơn. Sự khác biệt có lẽ cũng do mức độ nặng của tổn thương da được lựa chọn để sinh thiết ở các nghiên cứu khác nhau, số mẫu của các nghiên cứu đều thấp (22 và 25 mẫu sinh thiết), hơn nữa, các nghiên cứu này thực hiện trên bệnh nhân lupus ban đỏ ở da còn chúng tôi tiến hành trên bệnh nhân lupus ban đỏ hệ thống.

Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu đều cho thấy có sự biểu hiện granzym B ở phần lớn các tổn thương lupus da. Còn ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về lĩnh vực này được thực hiện nên chúng tôi không có số liệu để so sánh.

Sự biểu hiện granzym B+ ở mức độ vừa (10 - 50% tế bào dương tính/vi trường). Mật độ trung bình tế bào biểu hiện granzym B dương tính/vi trường ở ACLE, SCLE, CCLE lần lượt là $16,5 \pm 19,1$, $17,7 \pm 12,8$, $22,8 \pm 17,1$ % (bảng 2). Kết quả của chúng tôi cũng khá tương đồng với Fogagnolo (2014).¹⁰ Mẫu nghiên cứu là mảnh sinh thiết tổn thương lupus da của 59 bệnh nhân: 21 DLE, 17 SCLE và 21 TCLE (Tumidus cutaneous LE). Mật độ trung bình tế bào biểu hiện granzym B+ ở DLE là 23,37 (8,00 – 38,67), ở SCLE là 24,29 (6,33–38,67). Cả tỷ lệ và mật độ trung bình tế bào biểu hiện granzym B+ ở tổn thương CCLE và SCLE của chúng tôi đều cao hơn tổn thương ACLE. Có thể là do các tổn thương SCLE và CCLE trong nghiên cứu có số lượng tế bào dị sừng cao hơn ACLE, tỷ lệ và mức độ thoái hóa lỏng màng đáy nhiều hơn, thâm nhiễm lympho ở trung bì nông nhiều. Điều này gợi ý rằng hiện tượng chết theo chương trình xảy ra ở các tổn thương CCLE, SCLE nhiều hơn ACLE. Do đó, sự biểu hiện granzym B+ ở SCLE, CCLE cũng nhiều hơn, mức độ cao hơn ACLE. Tuy nhiên, sự khác biệt lại chưa có ý nghĩa thống kê, có thể do cỡ mẫu của từng loại tổn thương da đặc hiệu chưa đủ lớn.

Chúng tôi thấy tỷ lệ dày sừng nang lông và viêm quanh phần phụ (nang lông, tuyến bã, tuyến mồ hôi) cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm biểu hiện granzym B dương tính so với nhóm âm tính. Granzym B chủ yếu do T độc, tế bào diệt tự nhiên tiết ra, tuy nhiên nhiều loại tế bào khác cũng có thể biểu hiện granzym B như T điều hòa, bạch cầu trung tính, pDC... Vì thế ở những tổn thương xâm nhập nhiều loại tế bào viêm sẽ có thể tăng biểu hiện granzym B+. Như

vậy biểu hiện granzym B+ liên quan tới thâm nhiễm viêm ở thượng bì, quanh phần phụ và hiện tượng hủy hoại mô.

V. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu trên 77 mẫu sinh thiết tổn thương da đặc hiệu lupus của bệnh nhân SLE, chúng tôi thu được kết quả: Tỷ lệ tổn thương dương tính với granzym B ở nhóm bệnh nhân nghiên cứu là 85,7%, trong đó ACLE 81,2%, SCLE 92,3%, CCLE 93,8%. Mật độ trung bình tế bào biểu hiện granzym B dương tính/vi trường ở ACLE, SCLE, CCLE là $16,5 \pm 19,1$, $17,7 \pm 12,8$, $22,8 \pm 17,1$ %. Tỷ lệ dày sừng nang lông và viêm quanh phần phụ cao hơn ở nhóm biểu hiện granzym B dương tính so với nhóm âm tính.

Lời cảm ơn

Chúng tôi chân thành cảm ơn bệnh viện Da Liễu Trung Ương đã giúp đỡ hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Freitas JP, Marques Gomes M, Filipe P. Cutaneous Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Diseases*. doi:10.1155/2012/834291
2. Ghosh A. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Indian J Rheumatol*. 2007;2(4):156 - 164. doi:10.1016/S0973 - 3698(10)60060 - X
3. Privette ED, Werth VP. Update on pathogenesis and treatment of CLE. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(5):584 - 590. doi:10.1097/BOR.0b013e32836437ba

4. Werth VP. Cutaneous lupus: insights into pathogenesis and disease classification. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007;65(3):200 - 204.

5. Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol Med*. 2012;18(12):732 - 741. doi:10.1016/j.molmed.2012.09.009

6. Rosen A, Casciola - Rosen L. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ*. 1999;6(1):6 - 12. doi:10.1038/sj.cdd.4400460

7. Casciola - Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med*. 1999;190(6):815 - 826. doi:10.1084/jem.190.6.815

8. Abdou AG, Shoeib M, Bakry OA, El - Bality H. Immunohistochemical expression of granzyme B and perforin in discoid lupus erythematosus. *Ultrastruct Pathol*. 2013;37(6):408 - 416. doi:10.3109/01913123.2013.816400

9. Grassi M, Capello F, Bertolino L, Seia Z, Pippione M. Identification of granzyme B - expressing CD - 8 - positive T cells in lymphocytic inflammatory infiltrate in cutaneous lupus erythematosus and in dermatomyositis. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34(8):910 - 914. doi:10.1111/j.1365 - 2230.2009.03297.x

10. Fogagnolo L, Soares TCB, Senna CG, Souza EM, Blotta MHSL, Cintra ML. Cytotoxic granules in distinct subsets of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol*. 2014;39(7):835 - 839. doi:10.1111/ced.12428

Summary

GRANZYME B EXPRESSION IN LUPUS ERYTHEMATOSUS SPECIFIC LESIONS

Cutaneous manifestations in SLE are divided into LE-specific and LE-nonspecific lesions. Granzyme B is secreted by toxic T lymphocytes, NK (...), which can cause apoptosis, one of the pathogenesis mechanisms of lupus-specific skin lesions. Objective: The aim of this study was to use immunohistochemical staining for granzyme B to investigate the expression of granzyme B in LE-specific lesions of SLE patients. The result showed that: 85.7% of lupus-specific skin lesions were positive for granzym B, of which ACLE accounted for 81.2%, SCLE 92.3%, and CCLE 93.8%. The average numbers of cells showing granzyme B positive per field were 16.5 ± 19.1 in ACLE, 17.7 ± 12.8 in SCLE, and 22.8 ± 17.1 % in CCLE. The percentages of follicular plugging and adnexal inflammatory infiltration were significantly higher in cases showing granzyme B positive compared with those negative.

Keywords: SLE, LE-specific lesions, granzyme B