

การวินิจฉัยแยกโรคมะเร็งตับชนิด Hepatocellular Carcinoma กับมะเร็งชนิดอื่น ๆ โดยใช้ Hep Par 1 Antibody

ปณิธาน วิชาลสวัสดิ์, พ.บ.*

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma (HCC), cholangiocarcinoma (CCC) และ metastatic carcinoma ในบางครั้งจะแยกกันไม่ได้ ต้องมีการตรวจเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการวินิจฉัย Hep Par 1 antibody (Ab) เป็น monoclonal Ab ชนิดใหม่ที่มีความจำเพาะต่อ HCC **วัตถุประสงค์:** เพื่อทดสอบความจำเพาะของ Hep Par 1 Ab ต่อ HCC และความสัมพันธ์ต่อ histologic grade **วัสดุและวิธีการ:** Paraffin block และสไลด์ของผู้ป่วยจำนวน 37 รายของกลุ่มงานพยาธิวิทยาภาค โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาว่าเป็น HCC (16 ราย) CCC (3 ราย) metastatic adenocarcinoma (14 ราย) metastatic squamous cell carcinoma (2 ราย) malignant lymphoma (1 ราย) และ hepatoblastoma (1 ราย) ได้นำมาศึกษาทาง immunohistochemistry ด้วย Hep Par 1 Ab โดย HCC grading จะทำการใช้ Edmondson and Steiner grading system เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง degree of differentiation กับการติดสีของ Hep Par 1 Ab ด้วย **ผลการศึกษา:** HCC 16 ราย ให้ผลบวก 12 ราย ส่วน CCC, metastatic adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, และ lymphoma ให้ผลลบทั้งหมด ยกเว้น metastatic adenocarcinoma 1 รายที่ให้ผลบวก สำหรับ hepatoblastoma ให้ผลบวก และพบว่าการติดสีของ Hep Par 1 Ab ไม่มีความสัมพันธ์กับ degree of tumor differentiation **สรุป:** Hep Par 1 Ab เป็น monoclonal Ab ตัวใหม่ที่มีความจำเพาะและความไวสูงต่อ HCC อาจนำมาใช้ในการวินิจฉัยแยกโรคทางพยาธิวิทยากับมะเร็งชนิดอื่น ๆ

* แพทย์ประจำกลุ่มงานพยาธิวิทยาภาค โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา นครราชสีมา 30000

Abstract

A Study of Hep Par 1 Antibody in Differential Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma from Other Hepatic Tumors

Panithan Visalsawadi, M.D.

Department of Anatomical Pathology, Maharat Nakhon Ratchasima Hospital.

Nakhon Ratch Med Bull 2005; 29:15-22.

Background: Many cases of hepatocellular carcinoma (HCC) have histologic pattern that are similar to cholangiocarcinoma (CCC) and metastatic adenocarcinoma. Histochemical and immunohistochemical studies are needed in these cases. A new antibody (Ab) 'Hep Par 1' is used in this study to evaluate its specificity to HCC and its relationship to degree of differentiation of the tumor. **Material and Method:** Paraffin blocks and slides of 37 cases of hepatic tumors from surgical pathology in Department of Pathology, Maharat Nakhon Ratchasima hospital had been retrieved. There were 16 HCC, 3 CCC, 14 metastatic adenocarcinoma, 2 metastatic squamous cell carcinoma, 1 malignant lymphoma, and 1 hepatoblastoma. All HCC cases were graded according to Edmondson and Steiner grading system, Immunohistochemical study for Hep Par 1 Ab using Streptavidin biotin method was done in all cases. **Result:** Hep Par 1 Ab was positive in 12/16 cases of HCC, 1/1 hepatoblastoma, and 1/14 metastatic adenocarcinoma. All the rest were negative. The positivity did not correlate with degree of differentiation of the tumors. **Conclusion:** Hep Par 1 Ab is specific and sensitive for HCC as seen in this study. It is a promising Ab in differential diagnosis of HCC from CCC and adenocarcinoma.

Key words : hepatocellular carcinoma, Hep Par 1 Ab

ภูมิหลัง

มะเร็งในตับส่วนใหญ่จะเป็นมะเร็งชนิดเยื่อบุผิว (epithelial tumor) ที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มนี้คือ hepatocellular carcinoma (HCC) และ cholangiocarcinoma (CCC)⁽¹⁾ โดย HCC เชื่อว่ามีต้นกำเนิดจากเซลล์ตับ (hepatocytes) ส่วน CCC มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์บุทางเดินน้ำดี (biliary epithelial cells)⁽²⁾ แต่ก็มีบางกรณีที่เซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ต้นกำเนิด (progenitor) เดียวกัน⁽³⁾ โดยผลจากการศึกษาทาง chemical carcinogenesis พบเซลล์รูปไข่ (oval cell) ที่มี hepatocyte และ biliary cell marker เซลล์นี้มีความ

คล้ายคลึงกับ pluripotent cell และมีความสามารถในการที่จะเจริญเติบโตไปเป็น hepatocyte หรือ biliary epithelial cell⁽⁴⁾ และการพบมะเร็งตับชนิด combined hepatocellular-cholangiocarcinoma เป็นการช่วยยืนยันสมมติฐานนี้^(5,6)

การวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (histopathologic features) ของมะเร็งทั้งสองชนิด กรณีมี differentiation ดี (well differentiated tumor) จะมีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่ในบางรายที่ differentiation ไม่ดี ลักษณะทางพยาธิวิทยาอาจคล้ายคลึงกันทำให้แยกมะเร็งทั้งสองนี้ออกจากกันได้ยาก นอกจากนี้มะเร็ง

ชนิด adenocarcinoma ที่มี differentiation ไม่ดีและแพร่กระจายมายังตับ (hepatic metastasis) จะมีลักษณะคล้าย poorly differentiated HCC หรือ CCC ได้ ก่อให้เกิดปัญหาในการวินิจฉัยโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติ primary extrahepatic tumor วิธีการที่ช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น การตรวจทาง immunohistochemistry เพื่อตรวจหา specific antigen (Ag) หรือ marker อาจช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคได้ ซึ่ง markers เหล่านี้ได้แก่ Alpha-fetoprotein (AFP), Alpha - 1 - antitrypsin, carcinoembryonic antigen (CEA), factor XIIa, ferritin, albumin และ cytokeratins 8, 18, 7 และ 19⁽⁷⁾ อย่างไรก็ตาม markers เหล่านี้ไม่ได้มีความจำเพาะต่อมะเร็งตับเท่านั้น ต่อมา มีการค้นพบ monoclonal antibody ชนิดใหม่ คือ Hep Par 1 antibody (Ab) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ hepatocyte ทั้งชนิดปกติและชนิดที่เป็นมะเร็ง และไม่จำเพาะต่อเซลล์บุทางเดินน้ำดี (biliary epithelial cells) จึงเป็นทางออกที่จะช่วยในการแยก HCC จากมะเร็งชนิดอื่น^(7,8)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบความจำเพาะของ Hep Par 1 Ab ด้วยการตรวจทาง immunohistochemistry โดยใช้เนื้อเยื่อที่ได้รับการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาว่าเป็น HCC, CCC, metastatic tumor อื่น ๆ เพื่อเปรียบเทียบการย้อมติดสีต่อ HepPar 1 Ab และศึกษาความสัมพันธ์ของ histologic grade ของ HCC กับ Hep Par 1 Ab

วัสดุและวิธีการ

ได้ทำการศึกษา Paraffin block และสไลด์ ของผู้ป่วยจำนวน 37 รายของกลุ่มงานพยาธิวิทยาภาควิชา โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น HCC (16 ราย) CCC (3 ราย) metastatic adenocarcinoma (14 ราย) metastatic squamous cell carcinoma (2 ราย) malignant lymphoma (1 ราย) และ

hepatoblastoma (1 ราย) โดยทุกรายมีประวัติ ลักษณะทางคลินิก ตลอดจนลักษณะทางพยาธิวิทยาที่ตรงกับการวินิจฉัยโรค

สไลด์ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น HCC จะทำการ grading โดยใช้ Edmondson and Steiner grading system ดังตารางที่ 1⁽¹⁾

Paraffin block ของทุกรายนำมาศึกษาทาง immunohistochemistry ด้วยวิธี Streptavidin biotin method โดยใช้ Hep Par 1 Ab (clone OCH1E5) เป็น primary Ab ส่วน Ab อื่น ๆ ที่ใช้ประกอบในการย้อมได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 พร้อม positive และ negative control การแปรผล เซลล์ที่ให้ผลบวกจะมีลักษณะ distinct granular cytoplasmic staining⁽⁹⁾ โดยมีขั้นตอนดังนี้ ตัด tissue section หนา 4 μm ลงบนสไลด์ที่ coated ด้วย 3% aminopropyl triethoxy silane นำสไลด์เข้าสู่อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส deparaffinized ด้วย xylene, rehydrated ด้วย isopropyl alcohol, block endogenous peroxidase ด้วย 0.5% H_2O_2 ล้างสไลด์ด้วย running water แล้วตามด้วยน้ำกลั่น แช่สไลด์ใน 0.01M sodium citrate pH 6.0 ต้มในน้ำเดือดในตู้ไมโครเวฟ ล้างสไลด์ด้วย running water แล้วตามด้วยน้ำกลั่น แช่สไลด์ใน phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4 หยด protein blocking agent (PBA), primary antibody 1 ถิ่น, secondary antibody, streptavidin-peroxidase, chromogen substrate solution (Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)), counter stain ด้วย Mayer's haematoxylin, dehydrate, clear and mount.

ผลการศึกษา

ผลการย้อม immunohistochemical study และ grading ของ HCC ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4

ลักษณะการติดของ Ab ใน non-neoplastic hepatocytes จะมีลักษณะ diffuse cytoplasmic staining

ตารางที่ 1 Edmondson and Steiner histologic grading system of hepatocellular carcinoma

Well differentiated (Grade I/II)	Thin plates, three or fewer hepatocytes thick, that are typically smaller than normal, demonstrate minimal nuclear atypia, and have a nuclear density greater than twice that of the nonneoplastic liver. Fatty change and pseudoglandular architecture are common. Clear-cut histologic distinction from hepatocellular adenoma may not be possible in some cases without finding other, more poorly differentiated foci and knowing the status of the nonneoplastic liver. This pattern is typical of small (<2 cm) HCC
Moderately differentiated (Grade II/III)	Typically characterized by a trabecular pattern in which tumor cells are arranged in plates more than three cells thick. Tumor cells are larger and have more abundant eosinophilic cytoplasm and distinct nucleoli, compared with well-differentiated tumors. Pseudoglandular structures and bile are usually seen, and tumor giant cells may be present. This is the most common type of differentiation seen in advanced (>2 cm) HCC
Poorly differentiated (Grades III/IV)	Tumor cells have larger and more hyperchromatic nuclei and are typically arranged in a compact (solid) growth pattern with rare or no trabeculae or bile. Pleomorphism may be prominent and spindle-cell or small-cell areas may be seen. May be difficult to recognize as hepatocellular in origin

และมี distinct coarse granular pattern การติดสีจะสม่ำเสมอใน normal และ cirrhotic liver (รูปที่ 1) แต่ใน HCC การติดสีจะไม่สม่ำเสมอทั้งรูปที่ 2 โดยเซลล์แต่ละตัวจะติดสีเข้มไม่เท่ากันและ biliary epithelial cell ปกติจะย้อมไม่ติด Ab

ใน HCC 16 ราย ให้ผล positive 12 ราย โดย 2 รายย้อมติดแบบ focal และ 2 รายนี้โดย HCC grade II ย้อมติดแบบ focal weak จำนวน 1 ราย ส่วน grade III ย้อมติดแบบ focal strong จำนวน 1 ราย รายอื่น ๆ ที่เหลือย้อมติดแบบ diffuse strong

ตารางที่ 2 antibodies และน้ำยาที่ใช้ในการศึกษานี้

Reagent	Sequence	Source	Dilution
Hep Par 1 (clone OCH1E5)	1°	Dako, Denmark	1:10,000
Goat anti mouse Ig G	2°	-	1:500
Streptavidin biotin	3°	Immunotech, France	1:1,500
DAB	chromogen	Immunotech, France	-

DAB: Diaminobenzidine tetrahydrochloride

ตารางที่ 3 ผลการย้อมด้วย Hep Par 1 antibody

Tumor	no of cases	Hep Par 1 Ab	
		Positive	Negative
Hepatocellular carcinoma	16	12	4
Cholangiocarcinoma	3	0	3
Metastatic adenocarcinoma	14	1 (F)	13
Metastatic squamous cell carcinoma	2	0	2
Malignant lymphoma	1	0	1
Hepatoblastoma	1	1	0

F: focal

สำหรับ CCC 3 ราย metastatic adenocarcinoma 13 ราย squamous cell carcinoma 2 ราย และ lymphoma 1 รายให้ผลลบทั้งหมด มี metastatic adenocarcinoma 1 รายเท่านั้นที่ย้อมติดแบบ focal strong สำหรับ hepatoblastoma ย้อมติดแบบ strong positive

วิจารณ์

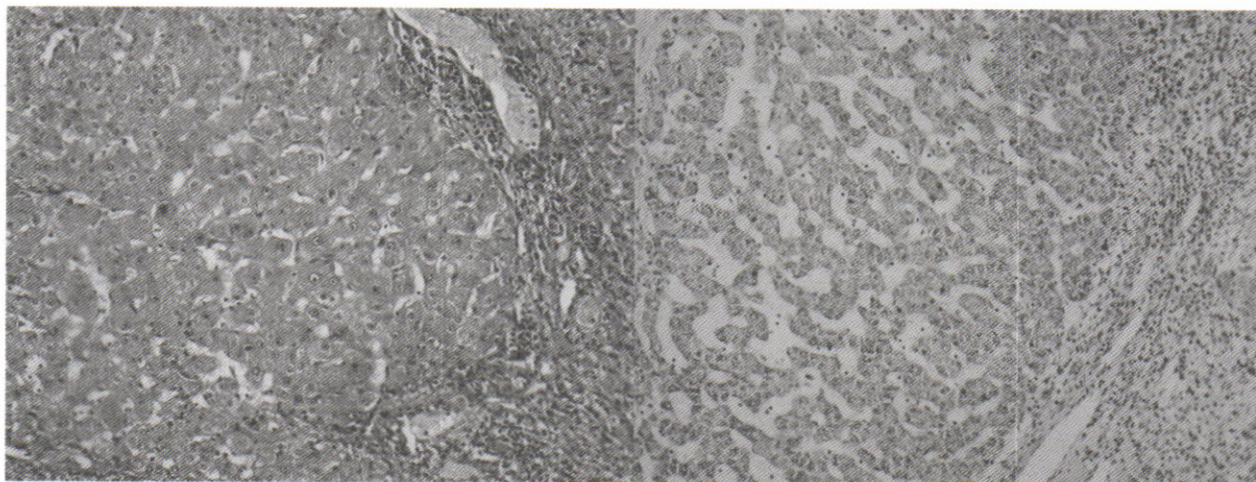
การวินิจฉัย HCC สามารถวินิจฉัยได้ง่ายในรายที่มีลักษณะเฉพาะทางพยาธิวิทยาหรือตรวจพบ bile

ภายในเซลล์มะเร็ง แต่ใน poorly differentiated tumor, tumor ที่มี anaplastic change หรือมี pseudoglandular formation ทำให้วินิจฉัยแยกโรคยากจาก CCC, metastatic adenocarcinoma หรือ combined hepatocellular-cholangiocarcinoma โดยใช้ลักษณะทาง histologic pattern อย่างเดียว ไม่เพียงพอในการวินิจฉัย

การตรวจพบ bile ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของ HCC นั้นพบได้น้อยใน การย้อม bile stain โดยมีความไวเพียงร้อยละ 5-30 เท่านั้น^(10,11,12) สำหรับการย้อม

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่าง tumor grade ของ HCC และ Hep Par 1 Ab

Grade	Hep Par 1 Ab			
	Negative	Positive		
		Focal weak	Focal strong	diffuse strong
1	-	-	-	1
2	4	1	-	8
3	-	-	1	1



รูปที่ 1 hepatocytes ใน cirrhotic nodule และลักษณะการติดสีเมื่อย้อมด้วย Hep Par 1

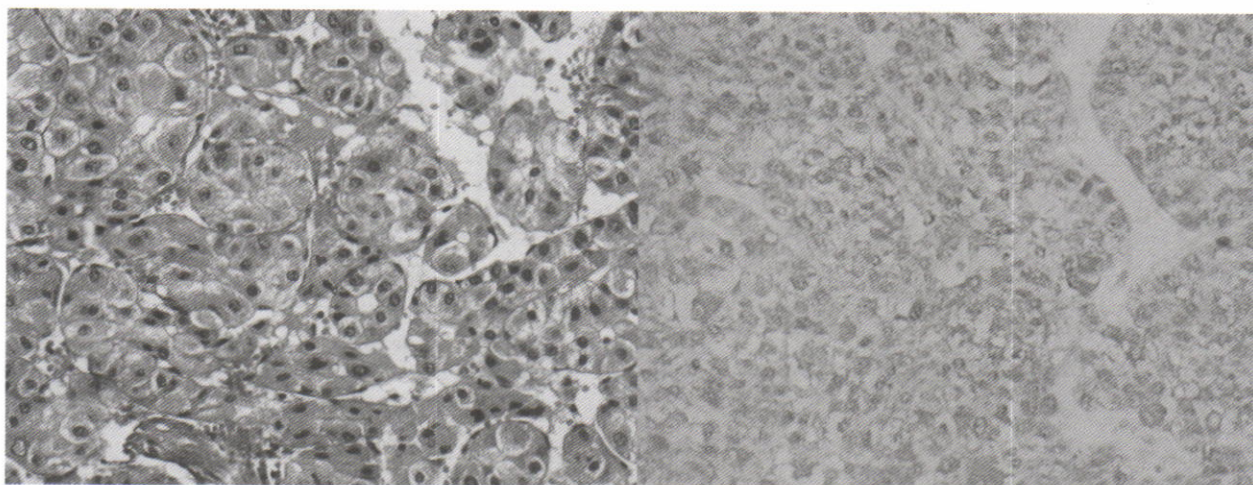
mucin จะให้ผลบวกใน CCC และ metastatic adenocarcinoma ส่วน HCC จะให้ผลลบ อย่างไรก็ตามร้อยละ 10-15 ของ HCC จะพบ eosinophilic cytoplasmic globule ซึ่งติดสี periodic acid-schiff และ diastase resistant อาจเข้าใจผิดว่าเป็น mucin ได้ โดย globule เหล่านี้จะประกอบไปด้วย AFP, Alpha -1- antitrypsin และ Alpha -1-antichymotrypsin

การตรวจพบ AFP ใน tumor cell ด้วยวิธี immunohistochemistry ไม่ได้จำเพาะต่อ HCC เพียงชนิดเดียว เนื่องจากอาจพบ AFP ใน metastatic tumor จาก ovary

หรือ pancreas บางชนิด นอกจากนี้การตรวจ AFP ยังมีความไวต่ำโดยพบเพียงร้อยละ 50 เท่านั้น⁽¹³⁾

การตรวจ CEA จะให้ canalicular staining pattern ซึ่งจำเพาะต่อ HCC มากกว่า CCC และ metastatic adenocarcinoma โดยมีความไวแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 15-80^(14,15,16) ซึ่งเกิดจาก cross reaction ของ CEA epitope กับ biliary glycoprotein I

ส่วน markers อื่น ๆ ทาง immunohistochemistry เช่น ferritin, blood group Ag, fibrinogen, Alpha -1- antitrypsin และ Alpha -1- antichymotrypsin ซึ่งไม่จำเพาะต่อ HCC



รูปที่ 2 hepatocellular carcinoma และการติดสีที่ไม่สม่ำเสมอเมื่อย้อมด้วย HepPar 1

สำหรับ Hep Par 1 Ab ซึ่งเป็น monoclonal Ab ที่ทำปฏิกิริยากับ hepatocyte-specific epitope ที่ทนต่อ formalin fixation และกระบวนการ tissue processing⁽⁹⁾ โดย target Ag ใน hepatocyte ยังไม่แน่ชัด โดยสันนิษฐานว่าเป็น large molecular weight N-acetylated protein ซึ่งการติดสีที่เป็น coarse granular pattern ทำให้เชื่อว่า Ag น่าจะอยู่ใน cytoplasmic organelle โดยเฉพาะ membrane of hepatocellular mitochondria ซึ่ง Ag ชนิดนี้ไม่ได้เป็น species specific สามารถพบได้ในตับของ หนู ลิง บานูน และ สุนัข⁽⁸⁾

ผลการศึกษานี้พบว่า Hep Par 1 Ab มีความจำเพาะต่อ HCC ซึ่งมีปริมาณ positive เพียง 12 ราย แต่ก็พอบอกได้ว่าโดยความเข้มการติดสีของ Ab ไม่มีส่วนสัมพันธ์กับ degree of tumor differentiation ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาอื่น ๆ^(8,9) แต่มีบางรายงานพบมี cross reactivity ของ Hep par 1 Ab ต่อ CCC และ metastatic adenocarcinoma ได้⁽⁹⁾ จึงมีข้อเสนอแนะว่าควรใช้การย้อมกลุ่มของ Ab โดยใช้ Hep Par 1 ร่วมกับ AFP และ CEA ซึ่งจะให้ความไวและความจำเพาะสูงมากขึ้น^(8,9)

สรุป

การวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาในการแยกโรคระหว่าง hepatocellular carcinoma และ cholangiocarcinoma หรือ metastatic adenocarcinoma นั้น ในบางครั้งไม่สามารถแยกโดยใช้ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียว ต้องใช้การศึกษาทาง histochemistry และ immunohistochemistry ร่วมด้วย การศึกษานี้พบว่า Hep Par 1 antibody เป็น antibody ที่มีความจำเพาะต่อ hepatocellular carcinoma และมีความไวสูง จะมีส่วนช่วยอย่างมากในการวินิจฉัยแยกโรค

เอกสารอ้างอิง

1. Washington K. Masses of the liver. In: Mills SE, editors.

- Sternberg's diagnostic surgical pathology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2004. p. 1705-74.
2. Wu PC, Fang JWS, Lau VKT, Lai CL, Lo CK, Lau JYN. Classification of hepatocellular carcinoma according to hepatocellular and biliary differentiation markers: Clinical and biological implications. Am J Pathol 1996; 149: 1167-75.
3. Aterman K. The stem cells of the liver: a selective review. J Cancer Res Clin Oncol 1992; 118: 87-115.
4. Bennoun M, Rissel M, Engelhardt N, Guillozo A, Briand P, Weber Benarous A. Oval cell proliferation in early stages of hepatocarcinogenesis in simian virus 40 large T transgenic mice. Am J Pathol 1993; 143: 1326-36.
5. Allen RA, Lisa JR. Combined liver cell and bile duct carcinoma. Am J Pathol 1994; 25: 647-55.
6. Tickoo SK, Zee SY, Obiekwe S, Xiao H, Koea J, Robiou C, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: A histopathologic, immunohistochemical, and in situ hybridization study. Am J Surg Pathol 2002; 26: 989-97.
7. Leong AS-Y, Sormunen RT, Tsui WMS, Liew CT. Hep Par 1 and selected antibodies in the immunohistological distinction of hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma, combined tumors and metastatic carcinoma. Histopathology 1998; 33: 318-24.
8. Minervini MI, Demetris AJ, Lee RG, Carr BI, Madariaga J, Nalesnik MA. Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. Mod Pathol 1997; 10: 686-92.
9. Wennerberg AE, Nalesnik MA, Coleman WB. Hepatocyte Paraffin 1: A monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. Am J Pathol 1993; 143: 1050-4.
10. Anthony PP. Primary carcinoma of the liver: a study of 282 cases in Ugandan Africans. J Pathol 1973; 116: 37-48.
11. Cohen C. Intracytoplasmic hyaline globules in hepatocellular carcinoma. Cancer 1976; 37: 1754-8.

12. MacSween RNM. A clinicopathologic review of 100 cases of primary malignant tumors of the liver. *J Clin Pathol* 1974; 27: 669-82.
13. Thung SN, Gerber MA, Sarno E, Popper H. Distribution of 5 antigens in hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 1979; 41: 101-5.
14. Ferrandez-Izquierdo A, Llombart-Bosch A. Immunohistochemical characterization of 130 cases of primary hepatic carcinomas. *Path Res Pract* 1987; 182: 783-91.
15. Koelma IA, Nap M, Hjitema S, Krom RAF, Houthoff HJ. Hepatocellular carcinoma, adenoma, and focal nodular hyperplasia. Comparative histopathologic study with immunohistochemical parameters. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 1035-40.
16. Balaton AJ, Nehama-Sibony M, Gotheil C, Callard P, Baviera EE. Distinction between hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic carcinoma based on immunohistochemical staining for carcinoembryonic antigen and for cytokeratin 19 on paraffin sections. *J Pathol* 1988; 156: 305-10.