



## 霍奇金淋巴瘤组织中H/RS细胞与其背景细胞的微切割及其IgH基因重排检测

### 1 材料与方法

H/RS细胞(Hodgkin and Reed-Sternberg cells)是霍奇金淋巴瘤(HL)的恶性肿瘤细胞,一般只占肿瘤组织的极少部分(不到1%),且分布在背景细胞间,其来源和性质及其与周围背景的关系一直是困扰人们的一个难题。近年来,有研究者认为H/RS细胞来源于B细胞[1][2]。本研究从基因水平对33例经典霍奇金淋巴瘤(classical Hodgkin's lymphoma, cHL)石蜡刮片组织进行了免疫球蛋白重链(immunoglobulin heavy chain, IgH)基因克隆性重排检测,并采用B细胞特异性激活蛋白(B-cell-specific activator protein, BSAP)作为免疫定位标记,对部分组织重排阳性病例的H/RS细胞和背景淋巴细胞行微切割,旨在探讨H/RS细胞的B细胞起源、H/RS细胞的克隆性以及与其周围背景细胞的相关性。

#### 1.1 标本

用于石蜡组织刮片的33例cHL标本来自南方医院和广州军区总医院病理科,男性27例、女性6例,年龄3~57岁,平均26.4岁。全部病例重切后HE染色复查,按WHO造血和淋巴组织肿瘤疾病1997年新分类[3]分型确诊。

#### 1.2 试剂

1.2.1 基因重排试剂 IgH基因克隆性重排的一对半引物由上海生工生物工程公司合成,引物序列为[4]: FR3A: 5' ACACGGC(C/T)(G/C)TGTATTACTGT3'; LJH: 5' TGAGGAGACGGTGACC3'; VLJH: 5' GTGAC CAGGGTNCCTTGCCCCAG 3'。Taq酶和dNTP购自上海生工生物工程公司。

1.2.2 免疫标记试剂 BSAP为羊抗人多克隆抗体(浓缩型, SANTA公司); SABC免疫组化检测试剂盒(包括通用型和抗羊型, 福建迈新公司提供)。

1.2.3 孵育消化液 含0.2% CaCl<sub>2</sub>的PBS液中加胶原酶H、胰蛋白酶,使其浓度分别为0.6%、0.5%(自行配制)。

#### 1.3 仪器

Olympus倒置显微镜及Narishige公司微操作仪; Narishige公司拉制器及打磨器; Hema4800PCR仪。

#### 1.4 方法

##### 1.4.1 石蜡刮片组织IgH基因重排

1.4.1.1 DNA的提取 按我室建立的石蜡切片刮片法[5],提取DNA。

1.4.1.2 PCR扩增 反应体系为25 μl,含模板1 μl(约100~200 ng)、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、2.5 μl 10 × Buffer、0.5 μl 10 mmol/L dNTPs、Taq酶1.5 U、浓度为10 μmol/L引物各1 μl。采用半巢式PCR,第一轮扩增用引物FR3A和LJH,反应条件为94 °C, 5 min; 30循环(94 °C、20 s; 55 °C、45 s; 72 °C、30 s),最后72 °C延伸5 min。将第一轮扩增产物1:100稀释,取1 μl作为第二轮扩增的模板,用引物FR3A和

VLJH扩增，反应条件是将第一轮反应的退火温度升为63℃，循环数改为27轮，其它条件不变。实验中设置无DNA样品管作为阴性对照，设置扩增阳性的B细胞淋巴瘤及扩增阳性的B淋巴瘤细胞株(BJAB，美国加州大学AIDS研究所孙仁教授惠赠)为扩增模板的阳性对照。

1.4.1.3 电泳及结果判断 扩增完毕后，取10 μl扩增产物，经8%聚丙烯酰胺凝胶电泳，PBR322/Hae III DNA Marker作为DNA产物长度标记，EB染色，紫外灯下观察，在80~120 bp之间有明确条带都可认为是阳性。

#### 1.4.2 显微切割细胞IgH基因重排

1.4.2.1 微切割前准备 从石蜡刮片组织DNA出现IgH基因重排阳性的标本中选取6例，取7 μm厚的常规石蜡切片，采用链霉素抗生物素过氧化物酶法[6]，BSAP抗体1:400稀释，每张切片滴加50 μl，采用微波抗原修复，免疫着色后苏木素复染，不封片，加消化液37℃孵育30 min，高纯水冲洗后，加1×PCR反应Buffer覆盖组织片。在Narishige控制器上将直径0.5 mm的空心玻璃微管拉制成用于切割细胞和吸取细胞两种类型尖端大小不同的玻璃针，切割用针尖端约1 μm，并将针尖弯成15度角，吸取用针尖端约20 μm。

1.4.2.2 单细胞挑取 将Olympus三维水压微操纵仪固定于倒置显微镜操作平台，在显微镜下找到有BSAP(+)的待切割目的细胞的视野后，滴加1×Buffer，用切割针将切割的细胞与周围细胞分割开，使其游离，再用吸取针吸取并吹打入含18 μl高纯水及5 μl PCR反应Buffer的Eppendorf管中，单个RS细胞的显微切割见图1。

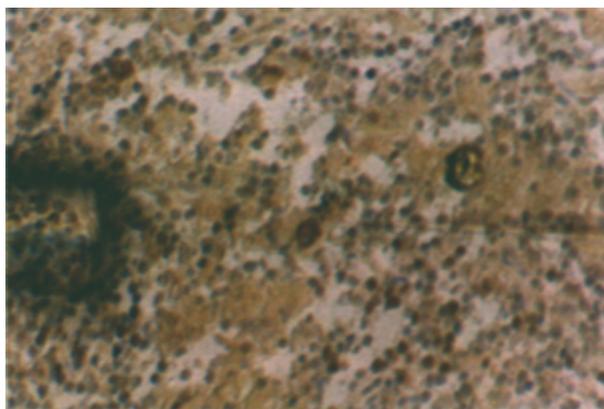


图1 显微切割单个H/RS细胞

Fig.1 Microdissection of single Hodgkin and Reed-Sternberg cell

在6例cHL切片上，每例挑取细胞约30个左右单个BSAP(+)的RS或其变异型细胞，置入19个Eppendorf管中，每管细胞数1~15个不等。在围绕已挑取的H/RS细胞周围，挑取10到100个数目不等的BSAP(+)背景淋巴细胞，置入12个Eppendorf管中。获得的细胞可于-20℃保存。

#### 1.4.2.3 切割后细胞PCR

1.4.2.3.1 DNA提取 将含切割细胞的Eppendorf管12 000×g离心，加蛋白酶K浓度至200 μg/ml，在56℃水浴中孵育2 h后，100℃煮沸10 min，离心后供PCR用。

1.4.2.3.2 PCR扩增 仍采用IgH的半巢式基因重排，将提取的DNA全部移入50 μl体系中进行第一轮反应，并将第一轮产物稀释100倍取2 μl作为第二轮扩增底物，扩增条件同组织PCR。设置的阴性对照和阳性对照同组织PCR。

1.4.2.3.3 产物鉴定 扩增产物以8%聚丙烯酰胺凝胶电泳，使用pBR322 DNA Hea III Marker作为DNA产物长度标记。电泳结果进行银染，结果判断同组织IgH基因重排结果的判断标准。

#### 1.5 统计学处理

采用χ<sup>2</sup>检验，用SPSS10.0统计软件处理。

## 2.1 石蜡刮片组织IgH基因重排结果

33例石蜡刮片组织提取的DNA进行IgH基因重排的半巢式扩增后，有16例(48.48%)在80~120 bp之间出现明显的克隆性条带。

## 2.2 微切割细胞IgH基因重排

6例IgH基因重排阳性的石蜡组织切片，结合BSAP免疫着色，通过显微操纵系统精细控制下的单细胞显微切割，成功地分别将BSAP(+)的H/RS细胞和背景淋巴细胞从周围细胞中精确分离。消化提取DNA后经IgH基因重排扩增显示：19管H/RS细胞有14管出现重排阳性，12管背景淋巴细胞有2管出现重排阳性，经8%PAGE检测后的部分结果见图2。细胞数目不同的各管扩增情况见表1，经统计分析，细胞数目不同的各管阳性率无显著性差异。6例cHL切片上挑取的BSAP(+)的H/RS细胞和背景淋巴细胞扩增情况见表2，可见微切割H/RS细胞重排阳性率显著高于背景淋巴细胞的重排率。

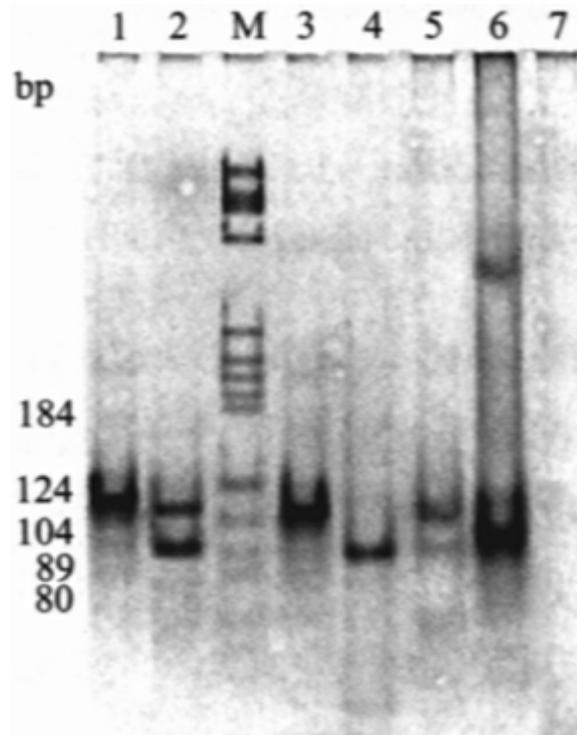


图2 微切割H/RS细胞基因重排PCR产物电泳图

Fig2. Electrophoresis of the PCR product for gene rearrangement in microdissected H/RS cells

M: pBR322 DNA HaeIII Marker; Lanes 1-5: Positive PCR products; Lane 6: Positive control; Lane 7: Blank control

表 1 细胞数不同的各管 H/RS 细胞重排结果

**Tab.1 Detection of gene rearrangement of the tubes containing different numbers of H/RS cells**

Cell number	Number of the tubes	Positivity tube number	Positivity rate (%)
1	6	3	50.0
2-9	7	6	85.71
≥10	6	5	83.33
Total	19	14	73.68

$$\chi^2=2.435, P=0.290$$

表 2 6 例 cHL 切片上挑取的 BSAP(+)的 H/RS 细胞和背景淋巴细胞 IgH 基因重排结果

**Tab.2 Rearrangement detection of H/RS cells and background lymphocytes positive for BSAP in the 6 cases of classical Hodgkin's lymphoma**

No.	H/RS cells			Background lymphocytes		
	Tube number	Positivity tube number	Positivity rate(%)	Tube number	Positivity tube number	Positivity rate(%)
1	5	4	80.0	4	1	25.0
2	3	1	33.33	2	0	0
3	3	3	100.0	1	0	0
4	3	3	100.0	1	0	0
5	3	1	33.3	2	0	0
6	2	2	100.0	2	1	50.0
Total	19	14	73.68	12	2	16.67

BSAP: B-cell-specific activator protein; cHL:

Classical Hodgkin's lymphoma;  $\chi^2=9.574, P=0.002$

### 3 讨论

IgH基因重排检测可以有效地诊断B细胞性淋巴瘤，因此检测IgH基因的重排可研究H/RS细胞的B细胞起源性及其克隆性。我们采用IgH一对半引物，对33例cHL的石蜡标本的刮片组织进行IgH半巢式基因重排扩增，结果有16例(48.48%)在80~120 bp之间有明确条带出现。

HL是恶性淋巴瘤的一个独特类型，瘤组织成分多样，除特征性的呈散在性分布且只占组织成分的1%以下的瘤细胞（RS细胞及其变异型）外，还有大量淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、组织细胞等

多种非瘤细胞成分。在刮片组织中提取的DNA模板不仅包含了来自RS细胞及其变异型瘤细胞成分，同时也包含了来自背景细胞的成分。因此其PCR结果并不能直接反应肿瘤细胞的状况。为了证实扩增的产物来自于H/RS细胞还是背景淋巴细胞，我们分别对H/RS细胞和背景淋巴细胞同时进行研究。

自1993年Hansmann等[7]推广了从组织切片上进行单细胞分离和PCR方法后，单细胞显微切割应用日益广泛，在HL的应用更是为RS细胞及其相关的研究带来了突飞猛进的发展[8]。本研究采用了液压式显微操纵系统配合倒置显微镜，对6例石蜡刮片组织基因重排阳性的HL切片上的H/RS细胞和背景细胞经BSAP标记后进行了显微切割，并成功地从6例组织重排阳性的石蜡切片上得到数目不一的19管单个和多个H/RS细胞，经IgH基因重排后，有14管出现IgH基因重排。我们对细胞数不同的各管H/RS细胞进行比较后，发现PCR底物无论是含一个细胞还是多个细胞，扩增后的结果无显著性差异( $P=0.290$ )，说明细胞数对重排结果影响不大。本实验还有部分切割的H/RS细胞没有检测到克隆性扩增，但并不能证明这些细胞就没有发生重排。因为我们采用的是石蜡标本，其中DNA成分已经有程度不一的降解，加上微切割所得到的细胞少，所含的DNA成分不能保证扩增所需的量，可能会出现阴性结果。同时也有可能与体细胞突变发生在PCR引物结合区，阻断了相应重排的扩增有关。

从33例cHL石蜡刮片组织和切割BSAP(+)的H/RS细胞IgH基因重排的结果看，支持H/RS细胞来源于B细胞，但是还有部分无重排和BSAP(-)的H/RS细胞，报道可能为其他来源[9]。在对cHL中BSAP表达阳性的H/RS细胞进行IgH基因重排的同时，本研究对切割H/RS细胞周围BSAP(+)的背景淋巴细胞也进行了IgH基因重排检测，12管中有2管出现了重排。尽管背景B淋巴细胞的阳性率(16.67%)低于H/RS细胞的阳性率(73.68%)，但是背景淋巴细胞的IgH基因重排是存在的，因此在研究石蜡刮片组织中H/RS细胞的起源和性质时，背景淋巴细胞对结果存在影响，很有必要对H/RS细胞进行切割，以减少背景细胞对H/RS细胞重排结果的干扰。BSAP(+)的背景淋巴细胞出现IgH基因重排，提示背景B淋巴细胞并非全是单纯反应性增生细胞，部分可能具有瘤性增生活性，参与HL恶性细胞的前体细胞组成。HL组织DNA的克隆性成分是否包括这些背景淋巴细胞，H/RS细胞和背景淋巴细胞的克隆性是否一致，H/RS细胞是不是由周围背景淋巴细胞演变而来，还存在一系列疑问，需要进一步测序分析来探究，关于HL背景淋巴细胞的克隆性以及H/RS细胞的起源相关性也有待进一步证实。

另外，本实验在挑取细胞前首次使用了核着色的BSAP标记，它和传统的CD30标记相比具有更多优点。第一，BSAP是B细胞特异性转录因子，在淋巴系统中只在B细胞和B淋巴瘤细胞上表达，而在HL的表达率高达90%以上[10][11]，采用BSAP作标记，能保证所挑取的目的细胞在蛋白水平上是B细胞性的，排除了T细胞或其它细胞来源的H/RS细胞，适合研究H/RS细胞的B细胞起源。第二，BSAP检测后的阳性颗粒定位在细胞核，和膜着色相比，BSAP着色后的H/RS细胞的细胞核形状、大小和数目更加清晰，有利于H/RS细胞的辨认，使挑取的细胞更加准确。第三，在倒置显微镜下挑取核着色的BSAP(+)的H/RS细胞，切割所得的成分只含靶细胞细胞核，不含胞质成分或含量很少，减少了对PCR扩增的影响。第四，BSAP不仅在H/RS细胞上表达，在周围的B淋巴细胞中也有强表达，使我们在挑取H/RS细胞的同时，可以对周围的背景淋巴细胞进行同步分析，使两者的相关性研究成为可能。因此本研究在倒置显微镜下采用BSAP标记，使整个细胞提取过程在直视下进行，保证了靶细胞挑取的准确性，避免了其它细胞和成分的干扰，使实验结果能更准确反映靶细胞的性质。同时结合PCR方法对切割细胞核成分进行了IgH基因克隆性重排，将形态学与分子生物学方法很好地结合起来，并兼顾了周围背景淋巴细胞。因此，采用BSAP标记进行微切割，使HL的研究在组织水平上更进了一步。

#### 参考文献:

[1] Marafioti T, Hummel M, Foss HD, et al. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription[J]. Blood, 2000, 95(4): 1443-50.

[2] 李甘地, 邓飞. 何杰金病H/R-S细胞起源和克隆性的研究进展(一)[J]. 诊断病理学杂志(J Diag Pathol), 1999, 6(1): 43-4.

[3] Jaffe ES, Harris NL, Chan JK, et al. Proposed World Health Organization classification of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues[J]. Am J Surg Pathol, 1999, 93(3): 114-21.

[4] Scrideli CA, Defavery R, Bernardes JE, et al. Prognostic significance of bi/oligoclonality in childhood acute lymphoblastic leukemia as determined by polymerase chain reaction[J]. Sao Paulo Med J, 2001, 119(5): 175-80.

[5] 张素娟, 赵 彤, 董敬朋, 等. 石蜡切片DNA提取方法的改良及其临床应用[J]. 临床与实验病理学杂志(J Clin Exp Pathol), 1996, 12(4): 363-4.

[6] 张素娟, 余英豪. 介绍一种新的免疫组化染色方法[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 1994, 14(1): 19.

[7] Hansmann ML, Küppers R. Pathology and “molecular histology” of Hodgkin’s disease and the border to non-Hodgkin’s lymphomas[J]. Baillieres Clin Haematol, 1996, 9(3): 459-77.

[8] 江培洲, 沈新明, 黄 华, 等. 显微操作仪快速分离癌细胞并提取微量RNA的方法[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 551-3.

Jiang PZ, Shen XM, Huang H, et al. Rapid isolation of cancer from tumor tissue by micromanipulator and extraction of tiny amount of RNA[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 551-3.

[9] Uehira K, Amakawa R, Ito T, et al. A Hodgkin’s disease cell line, KM-H2, shows biphenotypic features of dendritic cells and B cells[J]. Int J Hematol, 2001, 73(2): 236-44.

[10] 周新华, 赵 彤, 齐宗利, 等. B细胞特异性激活蛋白在经典霍奇金淋巴瘤中的表达及其意义[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(22): 1532-5.

Zhou xinhua, Zhaotong, Qi zongli, et al. Expression and signification of B-cell-specific activator protein of H/RS cell in classical Hodgkin’s lymphoma[J]. Nat Med J Chin, 2002, 82(22): 1532-5.

[11] Foss HD, Reusch R, Demel G, et al. Frequent expression of the B- cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin’s disease provides further evidence for its B-cell origin[J]. Blood, 1999, 94(9): 3108-13.

#### 参考文献:

[1] Marafioti T, Hummel M, Foss HD, et al. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription[J]. Blood, 2000, 95(4): 1443-50.

[2] 李甘地, 邓 飞. 何杰金病H/R-S细胞起源和克隆性的研究进展(一)[J]. 诊断病理学杂志(J Diag Pathol), 1999, 6(1): 43-4.

[3] Jaffe ES, Harris NL, Chan JK, et al. Proposed World Health Organization classification of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues[J]. Am J Surg Pathol, 1999, 93(3): 114-21.

[4] Scrideli CA, Defavery R, Bernardes JE, et al. Prognostic significance of bi/oligoclonality in childhood acute lymphoblastic leukemia as determined by polymerase chain reaction[J]. Sao Paulo Med J, 2001, 119(5): 175-80.

[5] 张素娟, 赵 彤, 董敬朋, 等. 石蜡切片DNA提取方法的改良及其临床应用[J]. 临床与实验病理学杂志(J Clin Exp Pathol), 1996, 12(4): 363-4.

[6] 张素娟, 余英豪. 介绍一种新的免疫组化染色方法[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 1994, 14(1): 19.

[7] Hansmann ML, Küppers R. Pathology and “molecular histology” of Hodgkin’s disease and the border to non-Hodgkin’s lymphomas[J]. Baillieres Clin Haematol, 1996, 9 (3): 459-77.

[8] 江培洲, 沈新明, 黄 华, 等. 显微操作仪快速分离癌细胞并提取微量RNA的方法[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 551-3.

Jiang PZ, Shen XM, Huang H, et al. Rapid isolation of cancer from tumor tissue by micromanipulator and extraction of tiny amount of RNA[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 551-3.

[9] Uehira K, Amakawa R, Ito T, et al. A Hodgkin’s disease cell line, KM-H2, shows biphenotypic features of dendritic cells and B cells[J]. Int J Hematol, 2001, 73(2): 236-44.

[10] 周新华, 赵 彤, 齐宗利, 等. B细胞特异性激活蛋白在经典型霍奇金淋巴瘤中的表达及其意义[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(22): 1532-5.

Zhou xinhua, Zhaotong, Qi zongli, et al. Expression and signification of B-cell-specific activator protein of H/RS cell in classical Hodgkin’s lymphoma[J]. Nat Med J Chin, 2002, 82(22): 1532-5.

[11] Foss HD, Reusch R, Demel G, et al. Frequent expression of the B- cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin’s disease provides further evidence for its B-cell origin[J]. Blood, 1999, 94(9): 3108-13.