

# 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

周新华<sup>1</sup>, 赵彤<sup>1</sup>, 沈新明<sup>1</sup>, 余江<sup>2</sup>, 朱梅刚<sup>1</sup> (第一军医大学<sup>1</sup>病理学教研室,<sup>2</sup>南方医院普外科, 广东 广州 510515)

**摘要:**目的 从基因水平探讨霍奇金淋巴瘤(HL)组织中 H/RS 细胞(Hodgkin and Reed-Sternberg cells)是否起源于 B 细胞、H/RS 细胞的克隆性以及与其背景淋巴细胞的相互关系。方法 对 33 例经典霍奇金淋巴瘤(cHL)石蜡刮片组织进行 IgH 基因重排分析,并对其中 6 例重排阳性的病例经 B 细胞特异性激活蛋白(BSAP)免疫标记,将标记阳性的 H/RS 细胞和背景淋巴细胞进行微切割后进一步行 IgH 基因重排分析。结果 16 例石蜡刮片组织 IgH 基因重排阳性。对 6 例经 BSAP 标记的 cHL 成功进行了微切割,其中 19 管 H/RS 细胞中,有 14 管出现重排阳性,细胞数目不同的各管阳性率无显著性差异 ( $P=0.290$ );12 管背景淋巴细胞有 2 管出现重排阳性,H/RS 细胞与背景淋巴细胞的阳性率有显著性差异 ( $P=0.002$ )。结论 支持 H/RS 细胞来源于 B 细胞的理论,认为部分背景淋巴细胞可能具有瘤性增生活性,参与 H/RS 细胞的前体细胞组成。

**关键词:**霍奇金淋巴瘤 / 免疫学;基因重排;B 细胞特异性激活蛋白;背景淋巴细胞

中图分类号:R730.21 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)03-0286-04

## Detection of IgH gene rearrangement in Reed-Sternberg cells microdissected from classical Hodgkin's lymphoma

ZHOU Xinhua<sup>1</sup>, ZHAO Tong<sup>1</sup>, SHEN Xin-ming<sup>1</sup>, YU Jiang<sup>2</sup>, ZHU Mei-gang<sup>1</sup>

Department of Pathology<sup>1</sup>, Department of General Surgery, Nanfang Hospital<sup>2</sup>, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract: Objective** To study the origins and clonality of Hodgkin and Reed-Sternberg (H/RS) cells and their relations with the background lymphocytes in classical Hodgkin's lymphoma. **Method** IgH gene rearrangement was detected in paraffin-embedded tissues from 33 patients with Hodgkin's lymphoma and a further analysis of the gene rearrangement was conducted in 6 of the positive cases identified after immunostaining of the sections with B-cell-specific activator protein (BSAP) followed by microdissection of the positivity labeled H/RS cells and background lymphocytes. **Results** IgH gene rearrangement was identified in 16 of the 33 cases. Microdissection of the lymphoma tissues was successfully performed in the 6 positive cases, and of the 19 tubes of H/RS cells obtained, 14 presented clonal bands of the rearrangement, and difference in cell numbers did not significantly influence the positive rate ( $P=0.290$ ); in the 12 tubes of microdissected background lymphocytes obtained, 2 were positive for the rearrangement, and the positive rates for the rearrangement significantly differed between H/RS cells and the background lymphocytes ( $P=0.002$ ). **Conclusion** The results appear to support the hypothesis that H/RS cells originates from B cells, and a part of the background lymphocytes may possess neoplastic proliferation potentials to function as the precursors of H/RS cells.

**Key words:** Hodgkin's lymphoma/immunology; gene rearrangement; B-cell-specific activator protein; background lymphocyte

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<sup>[1,2]</sup>。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。

收稿日期:2003-09-21

基金项目:国家自然科学基金(39970692)

Supported by National Natural Science Foundation of China (39970692)

作者简介:周新华(1975-),女,2002 年毕业于第一军医大学,硕士,助教,电话:020-61648223, E-mail:balbc@fimmu.com

### 1 材料与方法

#### 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<sup>[3]</sup>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<sup>[4]</sup>: FR3A: 5'ACACGGC (C/T)(G/C)TGTATTACTGT3'; LJH: 5'TGAGGAGACGGTGACC3'; VLJH: 5'GTGAC CAGGGTNCCTTGGCCCCAG 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<sup>[5]</sup>, 提取 DNA。

1.4.1.2 PCR 扩增 反应体系为 25  $\mu$ l, 含模板 1  $\mu$ l (约 100~200 ng)、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、2.5  $\mu$ l 10 $\times$ Buffer、0.5  $\mu$ l 10 mmol/L dNTPs、Taq 酶 1.5 U、浓度为 10  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ l。采用半巢式 PCR, 第一轮扩增用引物 FR3A 和 LJH, 反应条件为 94  $^{\circ}$ C, 5 min; 30 循环(94  $^{\circ}$ C、20 s; 55  $^{\circ}$ C、45 s; 72  $^{\circ}$ C、30 s), 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将第一轮扩增产物 1:100 稀释, 取 1  $\mu$ l 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  $^{\circ}$ C, 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  $\mu$ l 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  $\mu$ m 厚的常规石蜡切片, 采用链霉素抗生物素过氧化物酶法<sup>[6]</sup>, BSAP 抗体 1:400 稀释, 每张切片滴加 50  $\mu$ l, 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  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 高纯水冲洗后, 加 1 $\times$ PCR 反应 Buffer 覆盖组织片。在 Narishige 拉制器上将直径 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  $\mu$ m, 并将针尖弯成 15 度角, 吸取用针尖端约 20  $\mu$ m。

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 $\times$ 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  $\mu$ l 高纯水及 5  $\mu$ l PCR 反应 Buffer 的 Eppendorf 管中, 单个 RS 细胞的显微切割见图 1。

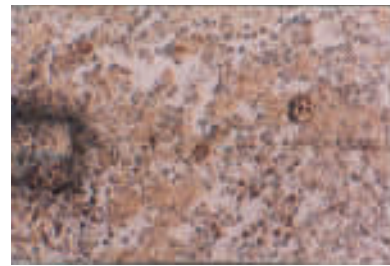


图 1 显微切割单个 H/RS 细胞  
Fig.1 Microdissection of single Hodgkin and Reed-Sternberg cell

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  $^{\circ}$ C 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 $\times$ g 离心, 加蛋白酶 K 浓度至 200  $\mu$ g/ml, 在 56  $^{\circ}$ C 水浴中孵育 2 h 后, 100  $^{\circ}$ C 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  $\mu$ l 体系中进行第一轮反应, 并将第一轮产物稀释 100 倍取 2  $\mu$ l 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 pBR322DNA Hae 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  $\chi^2$  检验,用 SPSS10.0 统计软件处理。

2 结果

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。

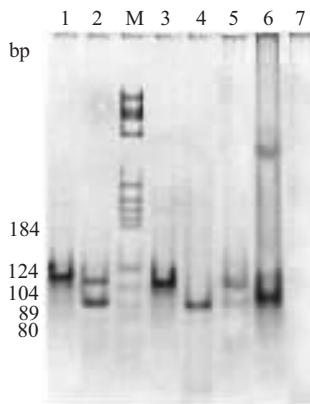


图 2 微切割 H/RS 细胞基因重排 PCR 产物电泳图  
**Fig2. Electrophoresis of the PCR product for gene rearrangement in microdissected H/RS cells**  
 M: pBR322 DNA *Hae* III Marker; Lanes 1-5: Positive PCR products; Lane 6: Positive control; Lane 7: Blank control

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<sup>[7]</sup>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<sup>[8]</sup>。本研究采用了液压力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<sup>[9]</sup>。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<sup>[10,11]</sup>,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, Defavary 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 significance 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.