

应用多重标记法探讨经典型 Hodgkin 淋巴瘤 H/RS 细胞的细胞属性

郝彦凤,王晋芬,焦士兰,殷卫东,白文启

Primitive Study of Cell Lineage of H/RS Cell in Classical Hodgkin Lymphoma by Using Multiple Staining Techniques

XI Yan-feng, WANG Jin-fen, JIAO Shi-lan, YING Wei-dong, BAI Wen-qi

Department of Pathology, Shanxi Tumor Hospital, Taiyuan 030013, China

Abstract: Objective To investigate the lineage of H/RS cell in classical Hodgkin lymphoma. **Methods** To analysis the expression of CD3、CD20、CD15、CD30、CD10、MPO、bcl-6、mRNA and mRNA in 62 cases of H/RS cells in classical Hodgkin lymphoma by using immunohistochemical multiple staining technique and in situ hybridizations. **Results** In all 62 cases, the H/RS cells were all positive for CD30, 41 cases positive for CD15, only 5 cases positive for CD20, all cases negative for CD3、MPO、bcl-6、CD10、mRNA and mRNA. **Conclusion** H/RS cells of classical Hodgkin lymphoma were originated from later stage germinal center developed B cells. H/RS cells have great varies for B lineage markers. H/RS cells were negative for immunoglobulin and due to the neoplasm cells can't synthesize of immunoglobulin. H/RS cells were not antigen driven, there have some unclearly mechanism in its hyperplasia.

Key words: Classical Hodgkin lymphoma; H/RS cell; Lineage; Multiple staining technique; In situ hybridization

摘要:目的 探讨经典型 Hodgkin 淋巴瘤 H/RS 细胞的细胞属性。方法 应用免疫组化多重标记法和原位杂交技术检测 CD3、CD20、CD15、CD30、CD10、MPO、bcl-6、mRNA 和 mRNA 在 62 例经典型 Hodgkin 淋巴瘤 H/RS 细胞的表达。结果 62 例的 H/RS 细胞 CD30 全部阳性, 41 例表达 CD15, 只有 5 例表达 CD20, 均不表达 CD3、bcl-6、CD10、mRNA、mRNA。结论 经典型 Hodgkin 淋巴瘤的 H/RS 细胞为生发中心后期分化的 B 细胞起源; H/RS 细胞对 B 系标记有较大的变异。它不表达免疫球蛋白轻链和, 可能是这些肿瘤细胞无免疫球蛋白的合成。

关键词:经典型 Hodgkin 淋巴瘤; H/RS 细胞; 细胞属性; 免疫组化多重标记; 原位杂交

中图分类号: R733.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)03-0155-03

0 引言

霍奇金淋巴瘤(Hodgkin Lymphoma HL)是一种淋巴造血系统恶性肿瘤,其特征是少量的肿瘤细胞—Hodgkin 或 Reed-Sternberg(H/RS)细胞(常<1%)散在于大量的淋巴细胞及炎性细胞中。2002 年最新的 WHO 分类中^[1],已明确结节型淋巴细胞为主型 Hodgkin 淋巴瘤(NLPHL)是生发中心 B 细胞起源。关于经典型霍奇金氏淋巴瘤(classical Hodgkin lymphoma CHL)新近应用免疫组化、PCR、原位杂交甚至单细胞研究都有大量报道,但 H/RS 细胞的细胞属性仍存在较大争议。

由于 CHL 的 H/RS 细胞少且散在的特点,多年来对 H/RS 细胞的研究成为难点。我们的研究应用免疫组化多重标记法有针对性的对 CD30 阳性的 H/RS 细胞进行研究,经检索在国内尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料 选用山西省肿瘤医院 1994~2002 年经典型 Hodgkin 淋巴瘤存档蜡块 62 例,弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、NLPHL 和淋巴结反应性增生各 2 例作为对照。每例均经两位有临床经验的高年病理医师复阅片,根据 WHO 分类标准^[1],进行亚型的划分。62 例蜡块均行 CD30、CD15、CD20、CD3 免疫组化标记,进一步明确诊断。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 高压锅煮沸的方法进行抗原的修复。免疫组化 ABC-DAB 法标记 CD30、CD15、CD20、CD3。弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、NLPHL 和淋巴结反应性增生作为阳性对照。省去一抗作为阴性对照。

1.2.2 免疫组织化学多重标记法 应用 ABC-DAB/SABAP 法显示 CD30 阳性的 H/RS 细胞对 CD10、MPO、bcl-6、CD20 的表达情况,省去苏木素

收稿日期:2004-03-02;修回日期:2004-07-09

作者单位:030013 太原,山西省肿瘤医院病理科

复染。省去一抗作为阴性对照。(1)高压锅煮沸进行抗原的修复。(2)应用 ABC-DAB 法进行第一种抗体的标记(一般选用核表达的抗体先标记,浆或膜表达的抗体后标记)。(3)重新进行抗原的修复。(4)应用 SABAP (streptavidin ³/ biotin alkaline phosphatase vector blue/ red) 法进行第二种抗体的标记。如进行第三种抗体的标记可重复(3)、(4)步骤,只是最后选用不同的显色剂。

1.2.3 原位杂交/免疫组织化学双重标记法 (1) mRNA、mRNA 原位杂交:常规脱蜡水化,蛋白酶 K(购自 DA KO 公司)消化 30min,荧光素连接的探针 55 90min,强洗液 55 25min,抗 FITC 30min,显色剂 60min。(2)免疫组化 ABC-DAB 法显示 CD30 阳性的 H/RS 细胞,不进行苏木素复染。省去探针与一抗作为阴性对照。

1.3 所用抗体及探针名称、克隆/编号及来源见表 1。

表 1 所用抗体及探针名称、克隆/编号及来源

名称	克隆	来源
CD3	Anti-CD3	Cell Marque
CD20	L26	Ventana
CD15	PAB116	Ventana
CD30	Ki-1	DA KO
MPO		DA KO
bcl-6	BL6.02	DA KO
CD10D		DA KO
Kappa and Lambda mRNA	Y5202	DA KO
PNA Probe		

1.4 结果判断 由于 CHL 中 H/RS 细胞较少,所有结果只作定性判断。

免疫组化结果根据各抗体定位的不同确定各自的阳性结果:CD30 定位于细胞膜或/和核旁,CD3、CD20、CD15、CD10 定位于细胞膜,MPO 定位于细胞浆,bcl-6、mRNA、mRNA 均定位于细胞核。原位杂交/免疫组化双标记和多重标记结果则观察 CD30 阳性的 H/RS 细胞同时对其他标记的显示情况,同时显色为阳性结果,只有单一显色或不显色为阴性。

1.5 统计学方法 统计应用 ² 检验, P < 0.05 视为差异有显著性。

2 结果

2.1 患者的临床资料 62 例中男性 43 例(69.35%),女性 19 例(30.65%);年龄 4~72 岁,中位年龄 27 岁;发病部位以颈部最多 45 例(72.58%),锁骨上次之 9 例(14.52%),腋下 4 例(6.45%),腹膜后、纵隔、系膜各 1 例。临床分期

期 29 例(46.77%), 期 21 例(33.87%), 期 8 例(12.90%), 期 4 例(6.45%)。

2.2 免疫标记与原位杂交结果见表 2。

表 2 免疫标记与原位杂交结果

亚型 (例)	CD30	CD15	CD3	CD20/ CD30	CD10/ CD30	MPO/ CD30	bcl-6/ CD30	/ CD30	/ CD30
NSHL (35)	35	26	0	2	0	0	0	0	0
MCHL (17)	17	11	0	2	0	0	0	0	0
LRHL (8)	8	2	0	0	0	0	0	0	0
LPHL (2)	2	2	0	1	0	0	0	0	0
共计	62	41	0	5	0	0	0	0	0

NSHL(结节硬化型)、MCHL(混合细胞型)、LRHL(富于淋巴细胞型)、LPHL(淋巴细胞消退型)

从表 2 可以看出:62 例 CHL 的 H/RS 细胞均表达 CD30,41 例表达 CD15,只有 5 例表达 CD20,无 1 例表达 CD3。CD30 阳性的 H/RS 细胞对 CD10、MPO、bcl-6(见图 1)、mRNA(见图 2)、mRNA 均不表达。

3 讨论

关于 CHL 的 H/RS 细胞的起源,目前仍存在许多争议。争议的焦点主要在 B 细胞的分化阶段。在最新的 WHO 分类中,认为 98% 的 CHL 的 H/RS 细胞起源于生发中心后期分化阶段的 B 细胞,极少数起源于外周 T 细胞。

我们的研究发现髓系标记物 MPO 及 T 系标记物 CD3 在 CHL 的 H/RS 细胞均不表达,基本上可以排除髓系及 T 系起源的可能性。针对目前主要是生发中心 B 细胞起源和生发中心后期分化阶段 B 细胞起源的争议,我们选用 B 系标记物 CD20、bcl-6、CD10 及 mRNA、mRNA 探针进行了研究。结果发现只有 5/62(8%) 的病例表达 CD20。文献报道^[2,3] CHL 的 H/RS 细胞对 CD20 的表达为 5%~80% 不等。提示 CHL 的 H/RS 细胞对 B 系标记物存在较大的不稳定性。bcl-6 是目前公认的一种生发中心 B 细胞的特征性标记物^[4-6]。在生发中心 B 细胞及其起源的肿瘤细胞都有强的表达,它对 B 细胞的分化有重要的调节作用,此外可参与对细胞周期的调控^[7]。在 CHL 中,文献报道仅有 9% 的病例表达^[4],我们应用免疫组化多重标记法对 CD30 阳性的 H/RS 细胞进行 bcl-6 的标记,结果却发现无 1 例表达,提示 CHL 是非生发中心 B 细胞起源。

CD10(急性淋巴瘤母细胞型白血病共同抗原)是一种前 B 细胞和生发中心 B 细胞的标记物^[7]。国外 Hsu 等人^[8]报道 CHL 的 H/RS 细胞不表达 CD10, 但 Watanabe K 等却报道 3/51 例 (5.4%) 表达 CD10。我们的研究结果显示所有 CHL 的 H/RS 细胞均不表达 CD10。进一步排除了 CHL 的 H/RS 细胞起源于前 B 或生发中心 B 细胞的可能。我们应用 mRNA、mRNA 探针对 CD30 阳性的 H/RS 细胞进行标记, 结果均为阴性。B 系起源的 CHL 的 H/RS 细胞, 为什么不能检测到免疫球蛋白、, 这也是 CHL 的 H/RS 细胞与其他 B 系起源的淋巴瘤的独特之处, 国外 Taylor 等^[9,10] 研究认为, CHL 的 H/RS 细胞是一种变异的 B 细胞, 它发生了无功能的 Vh 基因重组, 所以不能合成免疫球蛋白轻链, 其原因可能是其特殊的结构或终止密码子干扰了免疫球蛋白的合成, 所以我们的实验中检测不到免疫球蛋白轻链、。

根据以上分析, 我们对 CHL 的 H/RS 细胞的起源得出以下结论: CHL 的 H/RS 细胞为生发中心后期分化的 B 细胞起源, 它对 B 系标记物 CD20 等存在较大的变异; 无免疫球蛋白轻链、的表达, 可能是这些肿瘤细胞无免疫球蛋白的合成。

此外, CHL 中仍有一些 H/RS 细胞既无 B 系也无 T 系标记物的表达, 既检测不到 Vh 基因的重组也无 TCR 基因的重组, 提示 CHL 中有少数病例目前仍是 null 细胞型的, 这些细胞的起源仍待人们去探讨。

(本文图见封 3)

参考文献:

- [1] Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. New York, WHO Publication Center, 2001. 237-252.
- [2] Foss H, Reusch R, Demel G, et al. Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cell of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin[J]. Blood, 1999, 94(9): 3108-3113.
- [3] Watanabe k, Yamashita Y, Nakayama A, et al. Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease[J]. Histopathol, 2000, 36(4): 353-361.
- [4] Carbone A, Gloghini A, Gaidano G, et al. Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies distinct histogenetic subtypes of Hodgkin's disease[J]. Blood, 1998, 92(7): 2220-2228.
- [5] Artiga M, Saez A, Romero C, et al. A short mutation hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphoma[J]. Am J Pathol, 2002, 160(4): 1371-1380.
- [6] Kraus MD, Haley J. Lymphocyte predominance Hodgkin's disease. The use of bcl-6 and CD57 in diagnosis and differential diagnosis[J]. Am J Surg Pathol, 2000, 24(10): 1068-1078.
- [7] REE HJ, YANG WI, KIM CW, et al. Coexpression of bcl-6 and CD10 in diffuse large B-cell lymphomas[J]. Hum Pathol, 2001, 32(9): 954-962.
- [8] Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures[J]. J. Histochem. Cytochem, 1981, 29(6): 577-580.
- [9] C. R. Taylor and C. R. Riley. Molecular morphology of Hodgkin lymphoma[J]. Immunohistochem, 2001, 9(3): 187-201.
- [10] Taylor CR, Riley CR. Evolving concepts of the Hodgkin's disease[J]. Ann Diag Pathol, 2000, 4(5): 337-346.

[编辑: 刘红武; 校对: 贺文]

COX-2 基因与基质金属蛋白酶在星形细胞瘤中的表达 及二者相关性研究

(正文见 135 页)

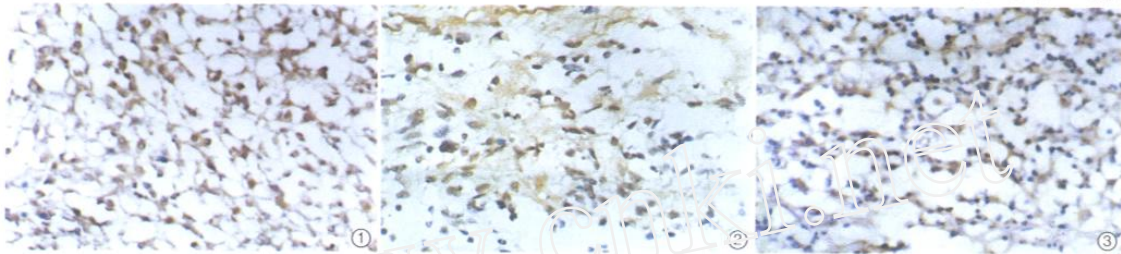


图1 COX-2mRNA 在IV级星形细胞瘤的强阳性表达 (× 400)
图2 MMP-2 在COX-2mRNA(+)IV级星形细胞瘤的强阳性表达 (× 400)
图3 MMP-9 在COX-2mRNA(+)IV级星形细胞瘤的强阳性表达 (× 400)

环氧合酶-2 在子宫内膜癌中的表达及其 与肿瘤血管形成的关系

(正文见 146 页)

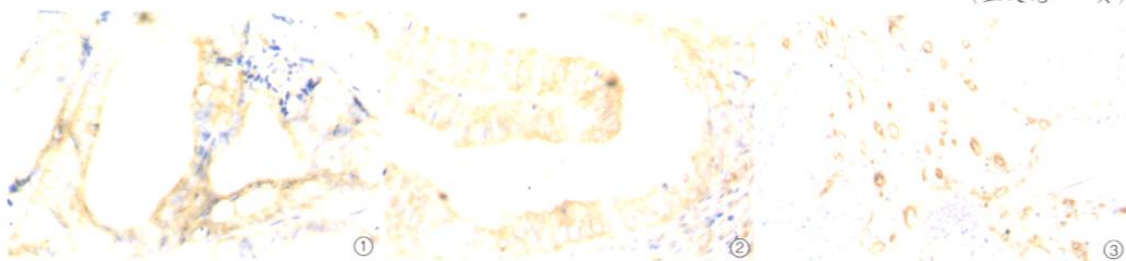


图1 子宫内膜癌组织中COX-2免疫组化染色, 阳性产物定位于肿瘤细胞浆 (SP, × 400)
图2 子宫内膜癌组织中VEGF免疫组化染色 (SP, × 400)
图3 子宫内膜癌组织中MVD免疫组化染色 (SP, × 400)

应用多重标记法探讨经典型 Hodgkin 淋巴瘤 H/RS 细胞的细胞属性

(正文见 155 页)

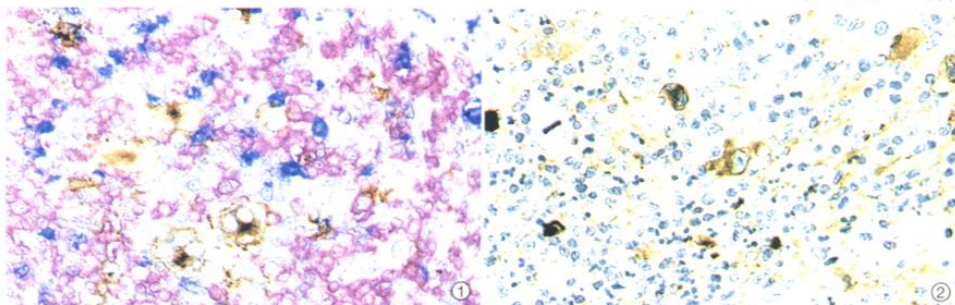


图1 Bcl-6(核蓝色)/CD₂₀(膜粉白色)/CD₂₀(膜浆棕色)多重标记。CD₂₀阳性的H/RS细胞对Bcl-6、CD₂₀均不表达 (× 400)
图2 KmRNA(核兰黑色)/CD₂₀(膜浆棕色)双标记。CD₂₀阳性的H/RS细胞不表达KmRNA (× 400)