

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)18-1708-03

鼻 NK/T 细胞淋巴瘤中组织蛋白酶 D 和 E-选择素的表达及意义

王娟红, 黄高昇, 王哲, 冯骥良, 杨国嵘, 郭英 (第四军医大学西京医院病理科, 陕西 西安 710033)

Expressions and significances of cathepsin D and E-selectin in nasal NK/T cell lymphoma

WANG Juan-Hong, HUANG Gao-Sheng, WANG Zhe, FENG Ji-Liang, YANG Guo-Rong, GUO Ying

Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To explore the expressions and significances of cathepsin D (CD) and E-selectin in the newly recognized nasal NK/T cell lymphoma. **METHODS:** Immunohistochemical SP method was used in 41 cases of nasal non-Hodgkin's lymphoma to examine the expressions of CD₄₅RO, CD_{3_e}, CD₂₀, CD_{79_α}, CD₅₆ and TIA-1; *In situ* hybridization for EBER1/2 (EBER-ISH) was used to examine Epstein-Barr virus (EBV) infection. As a result, 21 cases of nasal NK/T cell lymphoma were diagnosed according to the newly published WHO standard. The expressions of CD and E-selectin were detected immunohistochemically in the 21 cases of nasal NK/T cell lymphoma and 10 cases of lymphoid hyperplasia. **RESULTS:** CD was expressed intensively in plasma of scattered stromal histiocytes and the positive signal of CD in nasal NK/T cell lymphoma was much stronger than that in lymphoid hyperplasia ($t = 39.12, P = 0.000$). The positive signal of E-selectin was expressed in vascular endothelium and the mean positive rates of the 2 groups had no significant difference statistically ($t = 0.688, P = 0.497$). **CONCLUSION:** The higher expression of CD in the stroma of nasal NK/T cell lymphoma may relate to the high aggressiveness of nasal NK/T cell lymphoma, while E-selectin may have no intimate correlation with it.

【Keywords】 nasal neoplasms; lymphoma, T cell; killer cells, natural; immunohistochemistry; *in situ* hybridization; cathepsin D; E-selectin

【摘要】 目的: 探讨组织蛋白酶 D (CD) 和 E-选择素 (E-selectin) 在鼻 NK/T 细胞淋巴瘤中的表达及意义。方法: 采用免疫组化 SP 法检测 41 例鼻部非霍奇金恶性淋巴瘤 CD₄₅RO, CD_{3_e}, CD₂₀, CD_{79_α}, CD₅₆ 和 TIA-1 的表达, EBER 原位杂交法检测 EB 病毒感染情况, 根据最新 WHO 分类及诊断标准诊断鼻 NK/T 细胞淋巴瘤, 对完全符合诊断标准的 21 例鼻 NK/T 细胞淋巴瘤和 10 例鼻咽增生淋巴组织活检标本, 用免疫组化

方法检测 CD 和 E-选择素的表达。结果: 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤间质中组织细胞 CD 阳性信号的表达明显高于增生淋巴组织 ($t = 39.12, P = 0.000$)。E-选择素表达于血管内皮细胞, 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤与鼻咽增生淋巴组织中 E-选择素平均血管阳性率差异无统计学意义 ($t = 0.688, P = 0.497$)。结论: 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤间质中 CD 的表达明显增高, 与该瘤高度侵袭性相关, E-选择素与鼻 NK/T 细胞淋巴瘤恶性生物学行为无直接相关性。

【关键词】 鼻肿瘤, 淋巴瘤, T 细胞, 杀伤细胞, 天然, 免疫组织化学, 原位杂交, 组织蛋白酶 D, E-选择素

【中图分类号】 R393.1 **【文献标识码】** A

0 引言

新的研究表明, 蛋白水解酶 D (cathepsin D, CD) 表达增高与许多恶性肿瘤的侵袭转移密切相关^[1-3], E-选择素 (E-selectin) 作为介导肿瘤细胞与血管内皮细胞发生黏附的一种黏附分子, 其受体和配体的相互作用在肿瘤转移过程中也发挥了一定作用^[4-5]。鼻 NK/T 细胞淋巴瘤是一种新的单独病变实体, 也是鼻部区域最常见的恶性淋巴瘤, 其临床具高度侵袭性, 并有血管中心性破坏的特点。我们应用免疫组化和原位杂交方法, 根据最新 WHO 诊断标准严格诊断鼻 NK/T 细胞淋巴瘤, 并对其 CD 和 E-选择素表达的研究, 旨在探讨 CD 和 E-选择素在鼻 NK/T 细胞淋巴瘤不良生物学行为中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 41 例鼻咽部非霍奇金恶性淋巴瘤和 10 例鼻咽部增生淋巴组织石蜡标本均取自第四军医大学西京医院病理科。免疫组化选用的一抗有 mAb CD₄₅RO (Dako), CD₂₀ (Dako), CD_{79_α} (Neomarkers), CD₅₆ (Neomarkers), TIA-1 (Counlter), E-selectin (Neomarkers), 多克隆抗体 CD_{3_e} (Neomarkers) 和 cathepsin D (Santa Cruz)。超敏 SP 试剂盒, 购自福州迈新生物技术开发公司; 液体 DAB 酶底物显色试剂盒, 购自武汉博士德生物工程有限公司; PNA-RNA 原位杂交检测 EBV 基因转录产物 EBER1/2 所用 FITC 标记的 EBER1/2 肽核酸探针 (Y5200) 和原位杂交检测试剂盒 (Y5201) 购自丹麦 Dako 公司; 原位杂交专用

收稿日期 2006-01-04; 接受日期 2006-04-25

通讯作者: 黄高昇. Tel: (029) 84774946 Email: huanggs@fmmu.edu.cn

作者简介: 王娟红, 博士生 (导师黄高昇), 主治医师. Tel: (029)

84774541 Ext. 318 Email: wangjuanhong@hotmail.com

盖玻片和二乙基焦碳酸盐(dethyl pyrocarbonate, DEPC) 购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤细胞表型检测 对 41 例鼻部非何杰金氏恶性淋巴瘤采用免疫组化 SP 法检测 T 细胞抗原 CD₄₅RO 和 CD_{3ε}, B 细胞抗原 CD₂₀ 和 CD_{79α}, NK 细胞相关抗原 CD56 和毒性颗粒相关蛋白 TIA-1。CD₄₅RO, CD₂₀, CD_{79α} 和 CD₅₆ 阳性定位于细胞膜, CD_{3ε} 和 TIA-1 阳性定位于胞浆, >20% 的肿瘤细胞着色判为阳性^[6]。

1.2.2 EBER 原位杂交 杂交所用器具均经 1 mL/L DEPC 水浸泡过夜并高压灭菌处理, 载玻片常规清洁、硅化后, 180℃ 烘烤 4 h 以去除 RNA 酶。组织切片常规脱蜡, 蛋白酶 K 消化, 选用 FITC 标记的肽核酸(PNA) 探针 EBER 在石蜡切片上作原位杂交, 桥接碱性磷酸酶标记的抗 FITC 抗体, 以 NBT/BCIP 为碱性磷酸酶的底物检测杂交信号, 显色后, 3 mmol/L 核固红衬染。20% 以上细胞阳性着色诊断为 ISH 阳性。用已知 EBER-ISH 阳性的淋巴结非霍奇金恶性淋巴瘤石蜡包埋组织作阳性对照, DEPC 水代替含探针的杂交液作阴性对照。

1.2.3 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤诊断标准^[7] 病理改变为瘤细胞血管中心性浸润并破坏血管。瘤细胞具有 NK 细胞表型(CD₅₆+) 或毒性 T 细胞表型(CD_{3ε}+) 以及细胞毒表现型(TIA-1+) 并与 EB 病毒感染密切相关(EBER+)。

1.2.4 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤 CD 和 E-选择素的检测

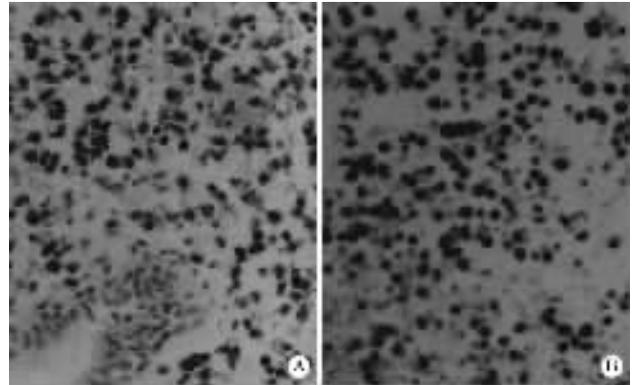
采用免疫组化 SP 法, 用已知 CD 阳性和 E-选择素阳性的切片作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。CD 阳性结果的定量采用格子系统(a grid system) 格子为 1 cm², 裱于 10× 目镜上并被分成 4 个小正方形。在每例鼻 NK/T 细胞淋巴瘤及淋巴增生组织切片上分别随机记数 10 个高倍镜视野下固定方格内 CD 阳性细胞数, 细胞计数最后被调整为个/cm²。E-选择素阳性结果的定量按照每张切片随机观察并分别计数 10 个 200 倍视野中染色阳性的血管数和总血管数, 计算平均阳性血管百分数/200 倍视野。

统计学处理: 用统计软件 SPSS10.0 版对鼻 NK/T 细胞淋巴瘤及增生淋巴组织 CD 和 E-选择素的表达进行 Student's *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

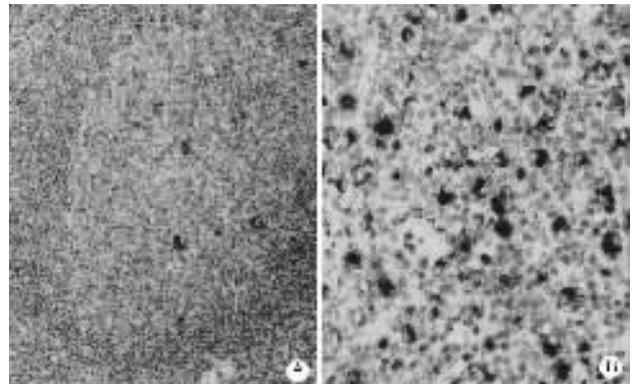
2.1 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤的诊断 结果显示 41 例非霍奇金恶性淋巴瘤中, T 细胞抗原 CD₄₅RO 阳性 29

例(70.7%), CD_{3ε} 阳性 26 例(63.4%), B 细胞抗原 CD₂₀ 阳性 5 例(12.2%), CD_{79α} 阳性 6 例(14.6%), NK 细胞相关抗原 CD₅₆ 阳性 16 例(39.0%), 毒性颗粒相关蛋白 TIA-1 阳性 25 例(60.9%), 阳性信号位于胞质, 呈颗粒状, 阳性表达瘤细胞弥漫存在(图 1A)。EBER-ISH 阳性 30 例(73.2%), 阳性信号位于瘤细胞胞质内, 多数肿瘤细胞质呈紫兰色阳性反应(图 1B)。结合免疫组化和 EBER-ISH, 确诊鼻 NK/T 细胞淋巴瘤 21 例(男 11, 女 10)例, 年龄 18~75(中位年龄 48)岁, 所有病例 HE 切片均有瘤细胞血管中心性浸润并破坏血管病理改变。



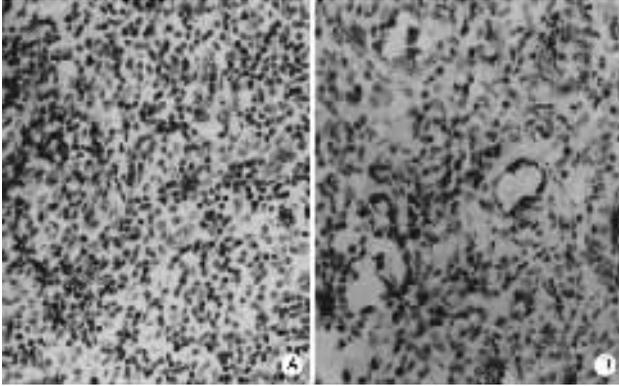
A: TIA-1 免疫组化 DAB ×400 B: EBER 原位杂交 NBT/BCIP ×400.
图 1 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤 TIA-1 表达和 EBER 原位杂交

2.2 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤 CD 的表达 鼻咽增生淋巴组织标本中, 平均每平方厘米有(26.3 ± 3.8)个 CD 阳性细胞, 阳性细胞多位于淋巴滤泡生发中心, 滤泡外少而散在(图 2A)。鼻 NK/T 细胞淋巴瘤标本中, 平均每平方厘米有(72.8 ± 7.9)个 CD 阳性细胞, 阳性信号位于间质内组织细胞胞质, 阳性细胞多, 阳性信号强, 部分覆盖细胞核, 瘤细胞不表达 CD(图 2B)。经 Student's *t* 检验, 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤 CD 阳性细胞数明显高于鼻咽增生淋巴组织($P < 0.05$)。



A: 鼻咽增生淋巴组织 DAB ×100 B: 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤 DAB ×400.
图 2 鼻咽组织 CD 的表达

2.3 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤 E-选择素的表达 10 例鼻咽增生淋巴组织和 21 例鼻 NK/T 细胞淋巴瘤中, E-选择素的表达均表现为间质血管内皮着色(图 3A, B)。前者每 200 倍视野平均阳性血管百分数为(60.1 ± 6.7)%, 后者为(61.9 ± 6.8)%, 二者差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A: 鼻咽增生淋巴组织 B: 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤。

图 3 鼻咽组织 E-选择素的表达 DAB × 400

3 讨论

鼻 NK/T 细胞淋巴瘤好发于鼻咽部, 又名中线恶性网状细胞增生症, 致死性中线肉芽肿, 恶性肉芽肿, 坏死性肉芽肿, 中线外周 T 细胞淋巴瘤等。长期以来, 缺乏对该疾病一致的认识和统一的命名, 因而对其临床高度侵袭性和血管中心性破坏现象机理的研究也很少。在 2001 年新 WHO 淋巴造血系统肿瘤分类中, 该疾病作为一种新的单独病变实体被提出, 并命名为鼻 NK/T 细胞淋巴瘤。

CD 是一种溶酶体酸性蛋白酶, 在肿瘤组织中, 活化的 CD 能催化降解基底膜和细胞外基质, 促进肿瘤的浸润和转移。以往的研究表明, CD 可以表达于肿瘤细胞, 也可以表达于间质细胞^[1-3], 但是, 肿瘤间质 CD 的表达比肿瘤细胞中的表达更有价值^[8]。我们的研究表明, 鼻 NK/T 细胞淋巴瘤中, CD 阳性信号仅出现于间质组织细胞, 且肿瘤组中 CD 表达明显高于对照组。我们认为, 间质内组织细胞 CD 表达增高, 使得大量的 CD 进入间质, 造成细胞外基质降解, 局部溶解, 有利于肿瘤细胞的侵袭。鼻 NK/T 细胞淋巴瘤临床表现侵袭性强, 常表现为鼻腔溃疡, 中线面部破坏, 以往的研究认为毒性颗粒相关蛋白和穿孔素与鼻 NK/T 细胞淋巴瘤高度侵袭性相关^[9-10], 我们的研究表明 CD 在鼻 NK/T 细胞淋巴瘤间质中的表达与该

肿瘤高度侵袭性也密切相关。

E-选择素是由唾液酸化路易斯-a 或 x 抗原(Sialyl Lewis a 或 x antigen, slea 或 slex)介导的内皮细胞与癌细胞结合的黏附因子, 血管内皮细胞表达的 E-选择素与其配体 slea 或 slex 专一性结合, 在血管浸润、肿瘤转移中起重要作用^[4]。鼻 NK/T 细胞淋巴瘤病理改变表现为多形性瘤细胞呈血管中心性生长, 浸润并破坏血管, 提示 E-选择素可能在其中发挥作用。而我们的研究结果显示鼻 NK/T 细胞淋巴瘤和鼻咽增生淋巴组织 E-选择素的表达差异无统计学意义, 表明 E-选择素的表达与该肿瘤的高度侵袭性无直接关系。我们认为, 尽管 E-选择素在血管浸润、肿瘤转移中起重要作用, 但细胞间的黏附是一个复杂的过程, E-选择素只是其中一个环节, 其配体 slea 或 slex 的活性也是很必要的, 所以 E-选择素并不是侵袭及转移唯一的或独立的因素。E-选择素如何与其他因素协同引起肿瘤的侵袭与转移尚需进一步探讨。

【参考文献】

- [1] Tetu B, Brisson J, Wang CS, et al. Expression of cathepsin D, stromelysin-3, and urokinase by reactive stromal cells on breast carcinoma prognosis [J]. *Cancer*, 2001 92(11): 2957-2964.
- [2] Ikeguchi M, Fukuda K, Oka S, et al. Clinicopathological significance of cathepsin D expression in gastric adenocarcinoma [J]. *Oncology*, 2001 61(1): 71-78.
- [3] 陈淑琴, 黄培生, 李一伟, 等. 鼻咽癌组织中 CD 和 CB 的表达及意义 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2005 12(5): 333-334.
- [4] 严润彬, 宋关斌, 罗庆, 等. E-选择素与肿瘤转移研究进展 [J]. *重庆大学学报(自然科学版)*, 2005 28(8): 100-104.
- [5] 葛春林, 何三光, 郭仁宣, 等. 小肠癌组织中 E-cadherin 和 E-selectin 的表达及临床意义 [J]. *中国医科大学学报*, 2001, 30(5): 370-372.
- [6] Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray [J]. *Blood*, 2004, 103(1): 275-282.
- [7] Elaine SJ, Nancy LH, Harald S, et al. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2001: 204-208.
- [8] 宋敏, 李柏林, 高苏, 等. E-cadherin 和 Cathepsin D 的表达与乳腺导管癌的侵袭和淋巴结转移的关系 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2002 11(6): 157-160.
- [9] 王军, 李挺, 肖水芳, 等. 细胞毒蛋白在鼻 NK/T 细胞淋巴瘤中的表达 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2005, 12(12): 761-763.
- [10] 石群立, 周晓军, 孟奎, 等. 穿孔素与颗粒酶 B 在鼻 NK/T 细胞淋巴瘤诊断中的意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2004, 20(5): 580-584.

编辑 杨湘华