

IL-12p40、IL-12p70 在经典型霍奇金淋巴瘤中的表达及意义

陈 聪^{1,2}, 刘 芳³, 张 聪^{1,2}, 陈顺华^{1,2}, 曹立宇^{1,2}, 尹 玉^{1,2}

摘要 目的 探讨白细胞介素-12p40(IL-12p40)、白细胞介素-12p70(IL-12p70)在经典型霍奇金淋巴瘤(CHL)组织中的表达及意义。方法 应用免疫组织化学法检测 IL-12p40、IL-12p70 在 41 例 CHL 组织、92 例弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)组织及 20 例反应性淋巴组织增生(RLH)中的表达。结果 IL-12p40、IL-12p70 在 41 例 CHL 及 92 例 DLBCL 中的阳性表达率分别是 51.22%、70.73% 及 0.00%、4.35%。20 例 RLH 中未见 IL-12p40 及 IL-12p70 表达。IL-12p40、IL-12p70 在 CHL 中及各亚型中的表达均明显高于 DLBCL 及 RLH($P < 0.05$)。IL-12p40 及 IL-12p70 的表达与患者性别、年龄、肿块大小、B 症状、临床分期、血清乳酸脱氢酶水平、国际预后评分等临床病理因素均无关。IL-12p40 与 IL-12p70 在 CHL 中的表达有相关性($P < 0.05$)。结论 IL-12p40、IL-12p70 在 CHL 发病中有重要作用。

关键词 霍奇金淋巴瘤; 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤; IL-12p40; IL-12p70; 免疫组织化学

中图分类号 R 733.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1308-05

经典型霍奇金淋巴瘤(classical Hodgkin lymphoma, CHL)是一种常见的淋巴造血系统恶性肿瘤, 占所有霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma, HL)病例的 95% 以上^[1]; 其组织学特点为少数的肿瘤细胞—Hodgkin 细胞和 Reed-Sternberg 细胞(HRS 细胞)浸润于大量的炎性背景细胞, 其中肿瘤性 HRS 细胞只占 1%~5%。该病的发病机制尚未完全明了, 目前认为 CHL 中的肿瘤细胞绝大多数起源于生发中心 B 细胞, 其发病与病毒感染、细胞因子及信号传导通路异常等多种因素有关。弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是一种异质性的侵袭性 B 细胞淋巴瘤, 根据免疫组化

及分子遗传学不同可分为多种亚型, 其治疗方法及预后与 CHL 不同。白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)是一种有多种免疫调节功能的异源二聚体细胞因子, 由 p35 及 p40 两个亚基通过二硫键连接而成, 主要由树突状细胞(dendritic cell, DC)、单核巨噬细胞、B 细胞以及其他的抗原提呈细胞产生^[2], 能促进 CD4⁺T 辅助细胞(Th1)的增殖, 诱导 NK 细胞和 T 细胞产生细胞因子, 在感染免疫、肿瘤免疫及自身免疫性疾病中起重要作用。关于 IL-12 不同亚基成分在淋巴瘤中的表达鲜有报道。该实验采用免疫组织化学法检测 IL-12p40、IL-12p70 在 CHL、DLBCL 组织中的表达, 探讨其在 CHL 及 DLBCL 组织发病中的作用及临床意义, 为 CHL 与 DLBCL 的鉴别诊断及治疗提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 收集安徽医科大学第一附属医院病理科 2006 年 1 月~2013 年 12 月诊断及分型均明确的 CHL 病例 41 例, 其中男 25 例, 女 16 例; 发病年龄 5~80(33.76±17.14)岁。所有病例参照文献^[3]进行组织形态学分型, 其中结节硬化型 CHL(nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma, NSCHL)22 例, 混合细胞型 CHL(mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma, MCCHL)12 例, 淋巴细胞丰富型 CHL(lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma, LRCHL)7 例, 淋巴细胞消退型 CHL(lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma, LDCHL)0 例。DLBCL 病例 92 例, 其中男 61 例, 女 31 例; 发病年龄 14~90(56.52±15.13)岁。另选 20 例反应性淋巴组织增生(reactive lymphoid hyperplasia, RLH)作为对照。所有病例经 2 位病理专家复诊。所有标本经 10% 中性福尔马林液固定, 石蜡包埋, 3 μm 连续切片, 分别作 HE、免疫组化及原位杂交染色。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 IL-12p40(ab106270)多克隆抗体购自香港 Abcam 公司; 鼠抗人 IL-12p70(sc-74150)单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 免疫组织化学二步法染色试剂盒、柠檬酸修复液

2015-05-08 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2013A150)

作者单位: ¹安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230022

³佛山科学技术学院医学院生理病生教研室, 佛山 528000

作者简介: 陈 聪, 女, 硕士研究生;

曹立宇, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: caoliuhf@163.com

(pH6.0) 及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法 免疫组织化学(EnVision 二步法)及原位杂交染色按试剂盒说明书操作,用已知阳性切片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定标准 IL-12p40、IL-12p70 免疫组化染色表达主要定位于细胞质,细胞质呈棕黄色者为阳性,血管内皮细胞阳性作为内对照;EB 病毒(epstein-barr virus, EBV)编码的小 RNA(Epstein-Barr encoded RNAs, EBER)阳性定位于细胞核,细胞核呈棕黄色者为阳性。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行分析,计数资料采用 χ^2 检验或校正的 χ^2 检验及 Fisher 精确概率法比较各组间的差异,相关性分析采用二分类变量之间的 Pearson 关联分析。

2 结果

2.1 IL-12p40、IL-12p70 在 CHL、DLBCL 及 RLH 中的表达 CHL 病理诊断及亚型均经组织学、免疫组化及原位杂交染色证实(图 1)。IL-12p40 及 IL-12p70 定位于细胞质中,CHL 中可见肿瘤性 HRS 细胞表达,非肿瘤性细胞不表达(图 2)。IL-12p40 在 NSCHL、MCCHL、LRCHL、CHL 中的表达率分别是 50.00%、41.67%、71.43%、51.22%。IL-12p40 总体阳性率有差异,NSCHL、CHL 与 DLBCL 比较($\chi^2 = 45.339, 55.957, P < 0.001$),MCCHL、LRCHL 与 DLBCL 比较(Fisher $\chi^2, P < 0.001$);NSCHL 与 RLH 比较($\chi^2 = 13.548, P < 0.001$),MCCHL 与 RLH 比较($\chi^2 = 6.969, P = 0.008$),LRCHL、CHL 与 RLH 比较($\chi^2 = 13.118, 15.622, P < 0.001$)。IL-12p70 在 NSCHL、MCCHL、LRCHL、CHL 中的表达率分别是 81.82%、58.33%、57.14%、70.73%,IL-12p70 总体阳性率有差异,NSCHL、MCCHL、CHL 与 DLBCL 比较($\chi^2 = 63.535, 27.251, 66.994, P < 0.001$),LRCHL 与 DLBCL 比较(Fisher $\chi^2, P < 0.001$);NSCHL 与 RLH 比较($\chi^2 = 28.636, P < 0.001$),MCCHL 与 RLH 比较($\chi^2 = 11.715, P = 0.001$),LRCHL 与 RLH 比较($\chi^2 = 9.270, P = 0.002$),CHL 与 RLH 比较($\chi^2 = 26.966, P < 0.001$)。IL-12p40 及 IL-12p70 在 CHL 及其亚型中的表达率均明显高于 DLBCL 及 RLH ($\chi^2 = 67.209, 79.916, P < 0.05$),见表 1。

2.2 CHL 中 IL-12p40、IL-12p70 表达与临床病理

因素间的关系 IL-12p40 及 IL-12p70 表达与患者性别、年龄、肿块大小、B 症状(发热、乏力、消瘦、盗汗、皮肤瘙痒等)、临床分期、血清乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)水平、国际预后评分(international prognostic score, IPS)等临床病理因素均无关,见表 2。

表 1 IL-12p40、IL-12p70 在 CHL、DLBCL 及 RLH 中的表达 [$n(\%)$]

类型	阳性	
	IL-12p40	IL-12p70
CHL	21(51.22)	29(70.73)
NSCHL	11(50.00)	18(81.82)
MCCHL	5(41.67)	7(58.33)
LRCHL	5(71.43)	4(57.14)
DLBCL	0(0.00)* #△	4(4.35)* #△
RLH	0(0.00)* #△	0(0.00)* #△

与 CHL 比较: * $P < 0.05$; 与 NSCHL 比较: # $P < 0.05$; 与 MCCHL 比较: △ $P < 0.05$; 与 LRCHL 比较: $P < 0.05$

表 2 CHL 中 IL-12p40、IL-12p70 表达与临床病理因素之间的关系

项目	n	IL-12p40				IL-12p70			
		-	+	χ^2	P 值	-	+	χ^2	P 值
性别									
男	25	12	13	0.016	0.901	8	17	0.017#	0.898
女	16	8	8			4	12		
年龄(岁)									
<45	31	16	15	0.076#	0.783	7	24	1.581#	0.209
≥45	10	4	6			5	5		
肿块大小(cm)									
<10	38	20	18	1.336#	0.248	12	26	Fisher	0.543
≥10	3	0	3			0	3		
B 症状									
无	22	8	14	2.930	0.087	7	15	0.149	0.699
有	19	12	7			5	14		
Ann Arbor 分期									
I ~ II	23	12	11	0.241	0.623	5	18	1.435	0.231
III ~ IV	18	8	10			7	11		
LDH(U/L)*									
<250	19	11	8	Fisher	0.420	5	14	Fisher	0.658
≥250	8	3	5			3	5		
IPS 评分*									
0 ~ 2	15	6	9	Fisher	0.226	3	12	Fisher	0.378
≥3	10	7	3			4	6		

* 代表临床病理资料齐全的实际病例数; #表示采用校正的 χ^2 检验

2.3 CHL 中 IL-12p40 与 IL-12p70 表达之间的关系 21 例 IL-12p40 阳性 CHL 病例中,IL-12p70 阳性 18 例,阴性 3 例;20 例 IL-12p40 阴性 CHL 病例中,IL-12p70 阳性 11 例,阴性 9 例。Pearson 关联分析结果显示,IL-12p40、IL-12p70 在 CHL 中的表达有相关性($r = 0.337, P = 0.031$)。

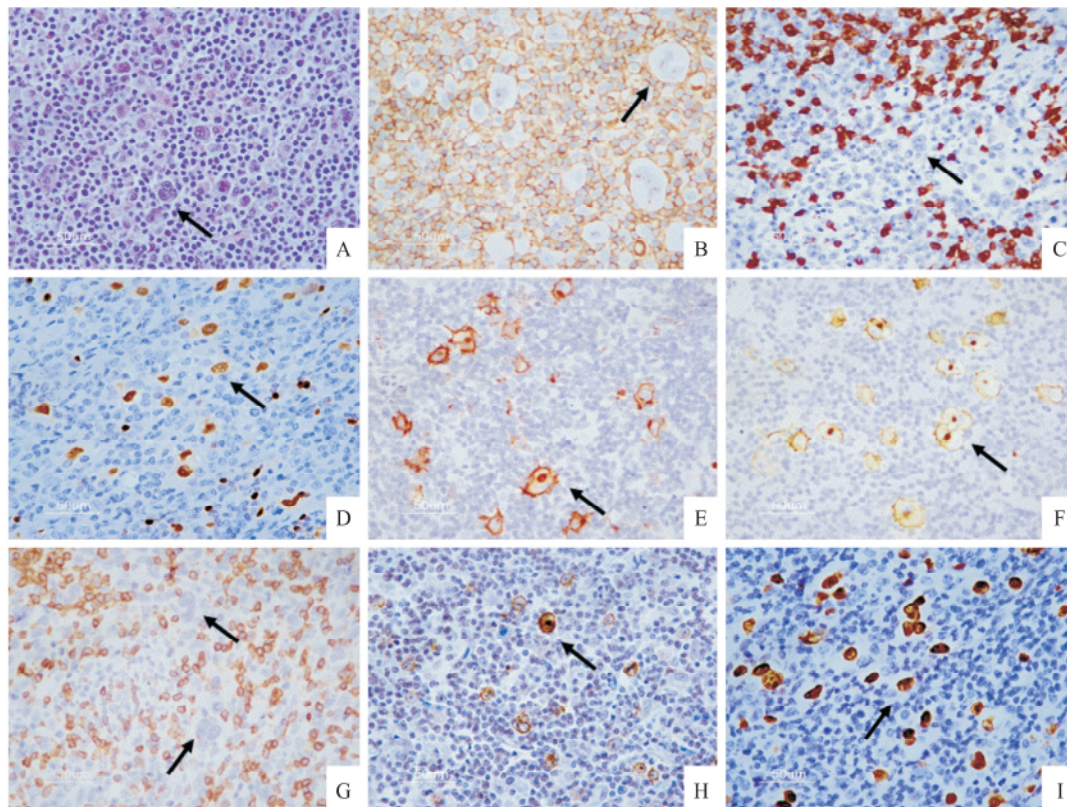


图1 LCA、CD20、Pax-5、CD30、CD15、CD3、LMP-1、EBER 在 CHL 中的表达 ×400

A: MCCHL(HE 染色); B~H: EnVision 染色; B: HRS 细胞 LCA 阴性; C: HRS 细胞 CD20 阴性; D: HRS 细胞 Pax-5 核弱阳性, 部分成熟小 B 细胞强阳性; E: HRS 细胞 CD30 膜及核周高尔基区阳性; F: HRS 细胞 CD15 膜及核周高尔基区阳性; G: HRS 细胞周围非肿瘤性小 T 细胞 CD3 阳性; H: HRS 细胞 LMP-1 阳性; I: HRS 细胞 EBER 阳性(原位杂交方法)

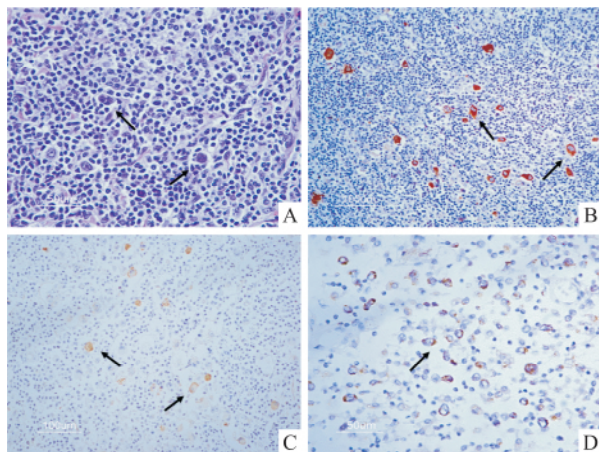


图2 IL-12p40、IL-12p70 在 CHL 及 DLBCL 中的表达

A: NSCHL(HE ×400); B~D: EnVision 染色; B: CHL 中 HRS 细胞 IL-12p70 细胞质阳性(×200); C: CHL 中 HRS 细胞 IL-12p40 细胞质阳性(×200); D: DLBCL 中大细胞 IL-12p70 细胞质阳性(×400)

3 讨论

HL 发病率在我国约占淋巴瘤总数的 8%^[4] 治

疗效果好,治愈率可达 80%~90%,近年来其发病率呈上升趋势。文献^[3]显示绝大多数(>98%) CHL 中的 HRS 细胞起源于生发中心阶段分化成熟的 B 细胞,极少数起源于胸腺后外周 T 细胞。IL-12 首先从 EBV 转染的人 B 淋巴瘤细胞系 RPMI-8866 的上清液中发现,被命名为自然杀伤细胞刺激因子(natural killer cell stimulatory factor, NKSF)^[5] 随后又从 EBV 转化的 B 细胞系 NC37 上清液中发现,被命名为细胞毒淋巴细胞成熟因子(cytotoxic lymphocyte maturation factor, CLMF)^[6] 完全纯化两者并克隆基因后,显示 NKSF 和 CLMF 是同一种细胞因子,并命名为现在的 IL-12。IL-12 是由分子量为 40 ku 的 p40 亚基及分子量为 35 ku 的 p35 亚基通过二硫键连接形成的分子量为 70 ku 的异二聚体(p70)细胞因子。在产生 IL-12 的细胞中, p35 只作为 IL-12 的一个亚基 随 p70 一起表达; p40 除随 p70 一起表达外,还能够单独表达。单独的 p40 没有生物活性,而只有与 p35 结合形成异二聚体 p70 才具有生物学活性^[7]。

本研究采用免疫组织化学法检测 IL-12p40 及 IL-12p70 在 CHL 组织中的表达, 数据显示 IL-12p40、IL-12p70 在 CHL 组织中表达的阳性率均显著高于 DLBCL 及 RLH, 提示 IL-12 在 CHL 发病中起重要作用。尽管绝大多数 CHL 被认为是 B 细胞起源的肿瘤, 但常用的 B 系标志物(如 CD20)在 HRS 细胞的阳性表达率不高, Pax-5 常为弱阳性表达, 而典型的 DLBCL 中 CD20、Pax-5 常强阳性表达, 推测其发病机制可能与 DLBCL 不同。2008 版 WHO 分类方案^[3]表明 HRS 细胞中 EBV 的感染率与 CHL 的组织学亚型有关, 其中 MCCHL 亚型 EBV 感染率最高, 约为 75%。本研究 CHL 中 LMP-1/EBER 表达率为 48.8%, 其表达与 IL-12p40 及 IL-12p70 有关, 提示 EBV 感染在 CHL 发病中起重要作用。

Schwaller et al^[8]应用免疫组织化学法发现大部分的 CHL 病例中 HRS 细胞周围聚集有 IL-12 免疫反应阳性的小淋巴细胞, 而 HRS 细胞中未见 IL-12 表达, 这样的病例被认为 IL-12 阳性, 其阳性率为 82%。在非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)、非肿瘤性的淋巴组织病变以及部分 CHL 中仅有散在的少数 IL-12 免疫反应阳性的小淋巴细胞, 这些病例被认为 IL-12 阴性, 并且所有 EBV 阳性的 CHL 病例也表达 IL-12, 而在所有 NHL 病例中未检测到 LMP-1 的表达。该研究认为在 HRS 细胞中不表达 IL-12, 是因为这些细胞是大量细胞因子的已知来源, 而细胞因子的作用是双向的, 在周围 T 细胞中表达的 IL-12 可能对 HRS 细胞的生物学功能有重要影响。Schwaller et al^[8]认为大多数 CHL 表达 IL-12 表明其可能在 HL 的发病中起重要作用, 提示该细胞因子与 EBV 阳性的 HL 有关。

CHL 患者除淋巴结进行性肿大外还经常伴有发热、体重减轻、盗汗等 B 症状, 推测肿瘤可能分泌细胞因子。研究^[9]显示 HRS 细胞能分泌多种细胞因子, 如 IL-2、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、转化生长因子- β 等。由于绝大多数 HRS 细胞是起源于 B 细胞的, 而 IL-12 是从 EBV 感染的 B 淋巴母细胞中发现的, 关于 IL-12 通过 EBV 的介导在 B 细胞中表达已有文献^[10]报道。本研究 HRS 细胞胞质中有 IL-12 的表达, 提示 HRS 细胞可能分泌 IL-12 作用于自身及周围 T 细

胞, 诱导 Th0 细胞向 Th1 细胞分化, 启动细胞免疫应答。IL-12 在 CHL 中的表达与临床因素的关系还不清楚, 本研究结果显示 IL-12p40 及 IL-12p70 表达与患者性别、年龄、肿块大小、B 症状、临床分期、LDH 水平、IPS 评分等临床病理因素均无关。

综上所述, 本研究结果显示 IL-12 在 HL 中高表达, 提示 IL-12 在 CHL 发病中起重要作用, 可能为 CHL 的免疫治疗提供新的实验依据。

参考文献

- [1] Ansell S M. Hodgkin lymphoma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management [J]. *Am J Hematol*, 2012, 87(12): 1096-103.
- [2] D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante N M, et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells [J]. *J Exp Med*, 1992, 176(5): 1387-98.
- [3] Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [M]. Lyon: IARC Press, 2008: 269-319.
- [4] 李小秋, 李甘地, 高子芬, 等. 中国淋巴瘤亚型分布: 国内多中心性病例 10002 例分析 [J]. *诊断学理论与实践*, 2012, 11(2): 111-5.
- [5] Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effect on human lymphocytes [J]. *J Exp Med*, 1989, 170(3): 827-45.
- [6] Stern A S, Podlaski F J, Hulmes J D, et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(17): 6808-12.
- [7] Puisieux I, Odin L, Poujol D, et al. Canarypox virus-mediated interleukin 12 gene transfer into murine mammary adenocarcinoma induces tumor suppression and long-term antitumoral immunity [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(17): 2481-92.
- [8] Schwaller J, Tobler A, Niklaus G, et al. Interleukin-12 expression in human lymphomas and nonneoplastic lymphoid disorders [J]. *Blood*, 1995, 85(8): 2182-8.
- [9] Maggio E, van den Berg A, Diepstra A, et al. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues [J]. *Ann oncol*, 2002, 13 suppl 1: 52-6.
- [10] Yoshimoto T, Nagase H, Yoneto T, et al. Interleukin-12 expression in B cells by transformation with Epstein-Barr virus [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 252(3): 556-60.

先天性无虹膜家系致病基因的突变检测

耿仁芳¹, 郑洁¹, 周青², 汪渊², 李寿玲¹

摘要 目的 对一常染色体显性遗传的先天性无虹膜(AN)家系进行PAX 6基因突变筛查,以确定其致病基因及致病突变。方法 收集一常染色体显性遗传的AN家系,采集该家系患者、家族健康成员外周静脉血,提取基因组DNA,应用聚合酶链式反应(PCR)方法扩增PAX 6基因 exon 4 ~ exon 13 共 11 个外显子以及外显子-内含子拼接部,将纯化后的PCR扩增产物直接测序,运用DNASar软件(综合性序列分析软件)对测序结果进行序列分析,检测PAX 6基因的突变类型,并与80名随机抽取的与该家系无血缘关系的健康人PAX 6基因序列进行比对。结果 该家系患者PAX 6基因 exon 11 存在一个杂合突变 c. 949 C > T (P. R 317 X),导致第317位精氨酸的密码子 CGA 被终止密码子 UGA 替代,造成编码PAX 6蛋白的过早终止,而该家系其他健康成员及

80名与该家系无血缘关系的健康对照组成员均未检测到该突变。结论 PAX 6基因 c. 949 C > T (P. R 317 X)突变导致PAX 6蛋白提前编码终止是该常染色体显性遗传先天性无虹膜家系的致病原因。

关键词 先天性无虹膜; PAX 6基因; 基因突变

中图分类号 R 773.1; R 394.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1312-04

先天性无虹膜(OMIM 106210, congenital aniridia, AN)是临床上较为罕见的一种眼畸形疾病,具有遗传性,其发病率为1:64 000 ~ 1:100 000^[1]。约2/3的AN病例呈家族性,多为常染色体显性遗传,具有较高外显率,但表现度不一,其余1/3病例呈散发性,无种族和性别差异^[2]。主要临床特征是虹膜组织的退化,表现为双眼虹膜的部分或完全缺失,可合并有眼部或全身其他异常表现,如角膜血管翳、白内障、青光眼、WAGR综合征等^[3]。PAX 6基因为目前该病发现的唯一致病基因,1991年,PAX 6基因便作为AN的候选基因被定位克隆,将其定位

2015-03-13 接收

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院眼科,合肥 230022

²安徽医科大学教育部“重要遗传病基因资源利用”重点实验室(省部共建),合肥 230032

作者简介:耿仁芳,女,硕士研究生;

李寿玲,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: shoulingli@126.com

Expression and significance of IL-12p40 and IL-12p70 in classical Hodgkin lymphoma

Chen Cong^{1,2}, Liu Fang³, Zhang Cong^{1,2}, et al

(¹Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ³Dept of Pathophysiology, Medical College of Foshan University, Foshan 528000)

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of interleukin-12p40 (IL-12p40) and interleukin-12p70 (IL-12p70) in patients with classical Hodgkin lymphoma (CHL). **Methods** IL-12p40 and IL-12p70 were stained by immunohistochemical EnVision two-step method in 41 cases of CHL, 92 cases of DLBCL and 20 cases of reactive lymphoid hyperplasia (RLH). **Results** The positive rates of IL-12p40 and IL-12p70 were 51.22%, 70.73% in CHL and 0.00%, 4.35% in DLBCL, no expression of IL-12 was observed in RLH. The expression rates of IL-12p40 and IL-12p70 in CHL were significantly higher than that in DLBCL and RLH ($P < 0.05$). There was no significant correlation between IL-12p40 and IL-12p70 with sex, age, bulky disease, B symptom, clinic stage, serum LDH level, and international prognostic score. IL-12p40 was positively correlated with the expression of IL-12p70 in CHL ($P < 0.05$). **Conclusion** The IL-12p40 and IL-12p70 play important roles in the pathogenesis of CHL.

Key words classical Hodgkin lymphoma; diffuse large B-cell lymphoma; IL-12p40; IL-12p70; immunohistochemistry