

# 鼻咽癌组织中HLA-D/Dr 抗原分布的观察与分析

福建医学院病理解剖学教研室 孙艳玉 沈云英

**〔摘要〕**本文应用ABC技术和单克隆抗体Anti-Leu-10观察了22例低分化鼻咽癌(NPC)和10例慢性鼻咽炎(CN)组织中HLA-D/Dr抗原的分布情况。结果发现,18例癌细胞表达HLA D/Dr抗原,占81.82%,阳性癌细胞呈灶状、巢片状、少数为散在点状分布。棕黄或棕黑色颗粒状阳性产物多位于细胞膜上。分组比较提示分化较低者D/Dr抗原的表达较强,阳性细胞数量较多。癌变上皮的D/Dr抗原强阳性反应与癌旁上皮形成强烈对照,提示D/Dr抗原的表达可做鼻咽上皮癌变的参考指标。

免疫遗传学研究提示免疫反应主要受HLA—D/Dr基因控制<sup>1)</sup>。HLA—D/Dr抗原与抗原信息传递有关,是诱发免疫反应的要重抗原。近年已有报道在结肠癌、恶性黑色素瘤、肺癌等恶性肿瘤中,可见HLA—D/Dr抗原的表达<sup>2,3)</sup>。但是,鼻咽癌组织中HLA—D/Dr抗原的表达情况国内外均未见报道。本文就鼻咽癌(Nasopharyngeal Carcinoma NPC)和慢性鼻咽炎(Chronic Nasopharyngitis CN)组织的对照分析,探索NPC组织中HLA—D/Dr抗原的表达规律以及对肿瘤免疫的影响和意义。

## 材料与方法

### 一、研究对象与标本处理

病理确诊但未经治疗的NPC病人22例,男16例,女6例。年龄29~61岁,平均43.6岁。其中15例可触及颈部肿块,临床分期<sup>4)</sup>: I期4例,II期8例,III期9例,IV期1例。10例病理确诊为CN的病人作为非癌对照组(男7例,女3例,年龄19~59岁,平均38.4岁)。以上病人的新鲜鼻咽标本立即分为二份,一份常规固定,包埋、切片、HE染色,进行一般观察并做出病理诊断;另一份OCT包埋、液氮速冻,于恒温冷冻切片机(-20℃)上作5μm厚的连续切片后即保存于-20℃冰箱,3天内进行免疫组化染色。每例冰冻切片均行HE染

色,以资对照。

### 二、抗体试剂及染色和观察方法

单克隆抗体Anti-Leu-10 (Becton Dickinson CA产品)为第一抗体,显示HLA-D/Dr抗原<sup>5,6)</sup>ABC药盒系Vector CA产品,显色剂用DAB。

ABC染色方法参照许氏<sup>7)</sup>介绍的方法稍加更改,步骤如下:冰冻切片经纯丙酮固定10分钟;适度稀释的第一抗体孵育60分钟;生物素标记马抗小鼠IgG30分钟;0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>15分钟(封闭内源性过氧化酶);ABC复合物30分钟。以上操作均在室温和湿盒内孵育,每一步后均以PBS浸洗3次,每次5分钟。DAB液中显色15分钟,过0.25%钼酸促进反应,亮绿复染常规脱水封片。阳性对照用淋巴结或扁桃体组织,阴性对照以正常小鼠血清或PBS代替第一抗体。

免疫组化染色的阳性结果,按其强度分为四级。

- +: 细胞膜上见到淡黄色稀疏的颗粒状阳性产物;
- ++: 细胞膜上见到深黄色较密集颗粒状阳性产物;
- +++: 细胞膜上见到深棕色环状阳性产物;++++: 细胞膜上见到棕黑色环状阳性产物。

## 结果与分析

### 一、HE染色观察结果

10例CN组织切片均见假复层纤毛柱状上皮。其中2例伴未成熟型鳞状化生,1例伴成熟型鳞状化生。所有病例淋巴细胞均呈

不同程度增生,有8例形成淋巴滤泡。

22例NPC组织病理诊断,1例为泡状核细胞癌,21例为低分化鳞癌。14例见到癌旁上皮,其中5例为假复层纤毛柱状上皮,7例是复层鳞状上皮,2例同时被复柱状上皮与鳞状上皮。鳞状上皮均呈不同程度增生。癌组织中见中等至多量淋巴细胞浸润。本文根据癌细胞的形态、生长方式、排列特点、核分裂数等指标将22例NPC分成分化程度略高的I组和分化程度略低的II组。

I组9例。癌细胞多边形,巢状或条索状生长,隐约可见鳞状上皮细胞排列极性。观察5个高倍视野,每个视野偶见核分裂1~2个。

II组13例。癌细胞多为合体形、梭形,有的见大量瘤巨细胞或小圆形细胞,呈片状弥漫性生长,排列无极性。观察5个高倍视野,每个视野中核分裂数大约2~3个。

## 二、免疫组化染色结果与分析

10例CN中,2例柱状上皮呈HLA—D/Dr抗原弱阳性反应,表现为淡黄色颗粒状产物分布于柱状上皮细胞膜和纤毛上。2例合并未成熟鳞状化生者、鳞化处基底细胞亦呈弱阳性反应。其余各例的柱状上皮、腺上皮和鳞状上皮均为阴性反应。HLA—D/Dr<sup>+</sup>淋巴细胞密集分布于淋巴滤泡中,滤泡周围稀少(图1)。弥漫增生的淋巴组织中,D/Dr<sup>+</sup>淋巴细胞则呈弥漫片状分布。巨噬细胞呈强阳性反应,数量极少,散在分布,可从形态上与淋巴细胞相区别。

HLA—D/Dr抗原在NPC癌细胞和癌旁上皮中的分布情况。22例NPC中有18例癌细胞呈阳性反应,占81.82%,阳性癌细胞多呈灶状、巢片状分布(图2、图3),少数为散在点状。阳性产物一般见于细胞膜上,反应极强时亦可位于胞浆内。9例癌旁复层鳞状上皮中,有7例基底细胞呈弱阳性反应,棘细胞和表层角化细胞均为阴性反应。7例癌旁柱状上皮中2例为弱阳性反应。1例癌

变上皮的HLA—D/Dr抗原强阳性反应与癌旁上皮的阴性反应形成强烈对照(图4)。D/Dr<sup>+</sup>淋巴细胞弥漫片状或灶状分布于NPC间质中,癌实质中仅见零星散在分布。巨噬细胞数量很少,呈强阳性反应,零星散在于NPC组织中。

两组NPC癌细胞中D/Dr抗原表达的比较。I组9例,6例为阳性反应,占66.67%,II组13例,12例为阳性反应,占92.31%,经统计学处理(直接概率计算法, $P>0.05$ ),差异无显著意义。但D/Dr抗原在癌细胞中的表达强度,两组NPC的差异有显著意义(Ridit分析, $P=0.05$ ),对阳性癌细胞分布形式的比较,发现I组阳性癌细胞多呈散在点、灶状分布,II组呈灶状、巢片状分布,阳性细胞分布形式实际上代表了阳性细胞的数量,经统计学处理,差异非常显著(Ridit分析, $P<0.01$ ), (见表1)。提示D/Dr抗原表达与NPC癌细胞的分化程度有密切关系,分化越低,HLA—D/Dr抗原的表达越强,分化越高,D/Dr抗原的表达越弱。

表1 丙组NPC中HLA—D/Dr抗原表达强度与阳性细胞分布形式

| 组别  | 表达强度  |    |     |      | 分布形式  |    |     | 合计例数 |
|-----|-------|----|-----|------|-------|----|-----|------|
|     | +     | ++ | +++ | ++++ | 点状    | 灶状 | 巢片状 |      |
| I组  | 3     | 2  | 1   | 0    | 2     | 4  | 0   | 6    |
| II组 | 1     | 5  | 3   | 3    | 0     | 5  | 7   | 12   |
| P值  | =0.05 |    |     |      | <0.01 |    |     |      |

NPC癌旁上皮与CN被复上皮比较,无论是柱状上皮还是鳞状上皮,D/Dr抗原的表达频率与强度都相似,故将NPC癌旁鳞状上皮与CN鳞状上皮合并分析,计有9例鳞状上皮的基底细胞表达D/Dr抗原,但表达的强度与癌细胞比较,差异非常显著(见表2)。说明复层鳞状上皮基底层生长能力强的幼稚细胞也常表达D/Dr抗原,但在强度上次于癌细胞。

## 三、NPC癌细胞HLA—D/Dr抗原表

表2 复鳞上皮基底细胞与NPC癌细胞  
HLA-D/Dr抗原表达强度

| 组别   | 表达强度  |    |     |      | 合计 |
|------|-------|----|-----|------|----|
|      | +     | ++ | +++ | ++++ | 例数 |
| 基底细胞 | 7     | 2  | 0   | 0    | 9  |
| 癌细胞  | 4     | 7  | 4   | 3    | 18 |
| P值   | <0.01 |    |     |      |    |

#### 达与临床资料的关系

本组病例中不同临床分期与癌细胞D/Dr抗原的表达,差异无显著意义,颈部淋巴结有否转移,在癌细胞D/Dr抗原的表达上亦无显著差异(Ridit分析,  $P>0.05$ ),

### 讨 论

一、NPC癌细胞表达HLA—D/Dr抗原对诊断的意义。Houghton<sup>(8)</sup>和Selby<sup>(9)</sup>报告皮肤的正常黑色素细胞与正常结肠上皮不表达HLA—Dr抗原,而Natali<sup>(10)</sup>和Rogum<sup>(11)</sup>等人在恶性黑色素瘤、结肠癌中发现了HLA—Dr抗原的表达,认为Dr抗原的表达可做为恶性转化的标记。Wilson等<sup>(3)</sup>在恶性黑色素瘤和肺癌中的观察也支持这一观点。

在我们观察的22例NPC组织中,有18例癌细胞表达了HLA—D/Dr抗原,占81.82%。尽管CN与NPC癌旁的少数柱状上皮和增生复层鳞状上皮的基底细胞也可呈D/Dr抗原弱阳性反应,但其反应弱,范围小,而癌细胞反应强,范围广,尤其是癌变与非癌变上皮交界处可形成显著对比(见图4)。鉴此,我们认为HLA—D/Dr抗原的表达可做为鼻咽上皮癌变的参考指标,协助早期诊断。

二、NPC分化程度与癌细胞表达HLA—D/Dr抗原之间的关系。Rogum<sup>(11)</sup>曾对结肠癌进行研究,认为癌细胞分化程度可影响Dr抗原的表达。我们将22例低分化NPC按照癌细胞形态、生长方式、排列特点、核

分裂多少再划分为分化略高和略低的I、II两组,比较它们的D/Dr抗原表达情况,尽管两组在表达频率上的差异无显著意义,但在表达强度和阳性癌细胞的数量上,差异显著和非常显著。说明本组NPC中,癌细胞分化程度与D/Dr抗原的表达有密切的关系。同时比较了增生复层鳞状上皮的基底细胞与癌细胞的D/Dr抗原表达,癌细胞的表达强度明显大于基底细胞。以上事实说明,细胞分化越低,增生越活跃,D/Dr抗原的表达也越强。关于HLA—D/Dr抗原表达的机理,我们推测人类基因组中存在着正常情况下不表达的HLA基因顺序,在某些因素刺激下,基因表达调控失常,致使原来静止的HLA—D/Dr基因脱阻抑,在某些增生的细胞上表达出来。

三、NPC癌细胞表达HLA—D/Dr抗原对肿瘤免疫的影响。免疫遗传学的研究证明免疫反应主要受HLA—D/Dr基因控制,在免疫应答过程中,只有在T、B淋巴细胞识别了与自身HLA—D/Dr抗原结合的抗原后,才能进行正常免疫反应。因此,癌细胞上HLA—D/Dr抗原的表达,可能关系到宿主免疫系统对癌变细胞的免疫监视和免疫排斥作用。(1)作为一种肿瘤抗原,便于机体免疫活性细胞的识别,刺激Th细胞和杀伤细胞的增殖,促进对肿瘤的排斥。(2)刺激抑制性细胞或其它抑制因子的产生,抑制对肿瘤细胞的杀伤作用。对NPC的研究发现,NPC组织中淋巴细胞明显减少<sup>(12)</sup>,提示NPC病人免疫功能存在缺陷或障碍。这与NPC癌细胞表达HLA—D/Dr抗原有关,值得探讨。总之,NPC中HLA—D/Dr抗原表达的研究,对了解该肿瘤的发生、发展、诊断和预后具有深远的理论意义和实用价值。

(本文图见封四)

(龚华实技师协助制片,特此致谢!)

### 参 考 文 献

1. 顾绍裘综述,中国医科大学学报 1983; 12(4): 91

2. Deer A S, et al, J Immunol 1982; 129: 477
3. Wilson BS, et al, Am J Pathol 1984; 115: 102
4. 1981年广州鼻咽癌分期分类法——世界卫生组织西太平洋地区办事处推荐的方案, 中华肿瘤杂志 1983; 5 (5): 386
5. Chen YX, et al, Human Immunology 1984; 10: 221
6. Brodsky FM, et al, Immunogenetics 1984; 19 (2): 179
7. Hsu SM, et al, Am J Clin Pathol 1981; 7: 816
8. Houghton AN, et al, JE J Exp Med 1982; 156: 1755

## OBERVATION AND ANALYSIS OF HLA-D/Dr ANTIGEN DISTRIBUTION IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

Sun Yan Yu et al

The distribution of HLA-D/Dr antigen in 22 cases of poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC) and 10 cases of chronic nasopharyngitis (CN) was studied by immuno-histologic technique with monoclonal antibody Anti-Leu-10. 18 cases of NPC expressed HLA-D/Dr antigen in the tumor cells. The HLA-D/Dr<sup>+</sup> tumor cells were either scattered in small groups or widely distributed in alveoli decorated by dark brownish granules on the cell membrane. The expression of HLA-D/Dr antigen on tumor cells ran parallel to the degree of cellular anaplasia. Tumor cells in carcinoma-in-situ expressing HLA-D/Dr antigen contrasted sharply with the negative expression of normal paracancerous epithelium. The result indicates that the expression of HLA-D/Dr antigen can be used as an axiliary index for malignant change of nasopharyngeal epithelium.

### 欢迎订阅《实用肿瘤杂志》

本刊由浙江医科大学主编出版, 国内外公开发行。本刊以实用见长, 除辟有论著、实验研究、综述与讲座、误诊分析、个案与短篇报道、药物与临床、中西药结合、译文摘编、国内外学术动态等专栏外, 还对肿瘤临床工作者关心的问题, 组织专题笔谈。1989年4期分别以食管癌、子宫颈癌、大肠癌、恶性淋巴瘤。1990年4期将分别以鼻咽癌、脑肿瘤、肿瘤化学治疗、肿瘤免疫治疗为重点组织专题讨论, 并增发相应有关文稿, 内容新颖实用, 以便较为集中地反映最新进展, 以开拓读者视野, 指导临床实践。欢迎读者及早向邮局办理订阅手续。本刊代号32—87。若邮局订阅延误, 可汇款至杭州浙江医科大学《实用肿瘤杂志》编辑部补订, 每期1.10元, 含平寄邮资, 如需挂号, 另加邮资0.22元。

《实用肿瘤杂志》编辑部

## 食管切除术后反流性食管炎



图1：反流性食管炎的粘膜层，HE染色 $\times 400$ 其中 左：粘膜层有灶性糜烂，基层增生和乳头延伸；右：粘膜基层增生，乳头延伸，固有层有淋巴细胞密集浸润。

## 鼻咽癌组织中HLA-D/Dy抗原分布的观察与分析

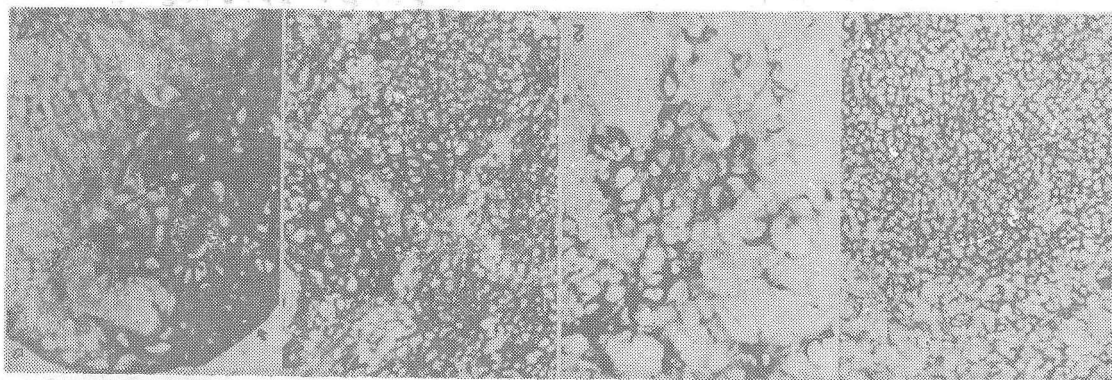


图1：慢性鼻咽炎组织中HLA-D/Dy<sup>+</sup>淋巴细胞密集分布于淋巴滤泡中，滤泡周围稀少，冰冻切片ABC染色 $\times 200$  图2：鼻咽癌组织中HLA-D/Dr3癌细胞呈灶状分布。冰冻切片ABC染色 $\times 430$  图3：鼻咽癌组织中HLA-D/Dr 癌细胞呈巢片状分布，冰冻切片ABC染色 $\times 200$  图4：鼻咽癌组织中癌变上皮呈HLA-D/Dr强阳性反（↑所示），与未癌变上皮（↑所示）形成强烈对照，冰冻切片ABC染色 $\times 300$

## 原发性肺恶性淋巴瘤1例报告



图1：纵隔窗观察，右上肺后段60.9 $\times$ 67.9mm分叶状肿块，后缘与胸壁相连，肿块内见二个点状钙化灶。

图2：气管隆突层面，肺窗观察，见肿块外缘毛糙，内缘较光整。