维普资讯 http://www.cqvip.com

抗角蛋白抗体在皮肤病理学常规检查中的应用

第一医院皮肤科 研究生 李 惠
导 师 袁承晏

提 要 本文用三种不同类型的抗角蛋白抗体和免疫酶标技术对各种常规石蜡包埋的皮肤肿瘤进行染色，结果显示三种抗角蛋白抗体（Cam5.2，AF_2和PK）均不染非上皮性肿瘤，对不同组织来源的上皮性肿瘤，其染色表现型式也各有差异。因此，在皮肤病理学的常规检查中，应用这三种抗角蛋白抗体，有助于诊断、鉴别诊断和对复杂的皮肤肿瘤进行分类

关键词 抗角蛋白抗体；免疫酶标技术；皮肤肿瘤

角蛋白是上皮细胞所特有的一组不溶于水的蛋白质，分子量为40—70千道尔顿（kd），非上皮细胞内则缺乏该种蛋白质。角蛋白的组份繁多，至今已测得至少有19种分子量不同的组份[1]。各种上皮细胞所含角蛋白的种类和数量的差异与上皮细胞类型、胚胎发育过程、组织分化阶段、细胞生长环境及疾病状态有关。本文研究的目的是通过用三种不同类型的抗角蛋白抗体，对常规石蜡包埋的各种皮肤肿瘤进行免疫组化染色，观察和分析染色结果，从而评价抗角蛋白抗体用于皮肤病理学常规检查中，在确定细胞的组织发生和肿瘤的鉴别诊断方面的应用价值。

材料和方法

1. **标本来源**：全部标本选自本院皮肤科和重庆医科大学病理室1982—1987年保存的组织蜡块，病理诊断明确。38例肿瘤标本为：

皮肤鳞状细胞癌	4 例
Bowen 病	2 例
乳房外 Paget 病	6 例
乳房 Paget 病	1 例
皮肤基底细胞癌	4 例
毛发上皮瘤	2 例
单纯性汗管棘皮瘤	1 例
小汗腺螺旋腺瘤	1 例
生乳头汗管囊腺瘤	1 例
恶性透明细胞汗腺瘤	1 例
皮肤粘膜恶性黑素瘤	3 例
表皮囊肿	3 例
小汗腺癌	1 例
汗管瘤	1 例
生乳头汗腺瘤	1 例
汗腺癌	4 例
皮肤纤维瘤	2 例

另外选择正常皮肤和良性肿瘤周围正常皮肤共12例作为正常对照。

2. **抗体的特性和来源**：（1）多克隆抗角蛋白抗体，简称PK，抗原成份为整个表皮角蛋白，系上海医大中心免疫室生产；（2）单克隆抗高分子量角蛋白抗体，简称AF_2[2]，系重庆医大病生教研室生产；（3）单克隆抗低分子量角蛋白抗体，简称Cam 5.2，为抗分子量39、43和50kd角蛋白的（相当于Moll 分类的8、18和19）抗体[3]，系 Becton-Dikenson 公司产品，经康华公司购买。

PAP 试剂由上海医大中心免疫室提供，ABC 试剂为美国 Vectastain ABC 试剂盒。

3. **制片及染色**：每例标本连续切片（5μm）

维普资讯 http://www.cqvip.com

4张，1张作H.E.染色复核诊断，另3张作免疫组化染色。切好的组织片平摊于预先涂有一薄层进口粘贴剂的载玻片上，放入恒温箱中置57℃1至2h烘干待用。免疫组化染色基本步骤：(1)二甲苯充分脱蜡20min，逐级酒精水化。(2)0.3%H_2O_2-甲醇溶液室温30min，PBS冲洗三次。(3)0.1%胰酶37℃20min，PBS三次。(4)1:20正常羊血清37℃30min，吸干不冲洗。(5)Ⅰ抗4℃过夜，PBS三次，浓度为PK1:300、$AF_2$1:100，Cam5.2为现成稀释液。(6)Ⅰ抗和Ⅱ抗分别于37℃30min，PBS洗三次；PK用PAP试剂，AF_2和Cam5.2用ABC试剂。(7)新鲜配制DAB显示剂显色3min，置光镜下观察，见显色满意，即入PBS中中止反应。最后苏木素复染，D.P.X封片。所用抗血清均用PBS稀释。

结　果

1. 正常表皮及其附件的染色结果(表1)：

Cam5.2只特异性地对汗腺分泌细胞呈强阳性反应，而对表皮角朊细胞、毛囊上皮细胞、汗腺其它细胞成份及皮脂腺均呈阴性反应。

PK对表皮全层角朊细胞、毛囊外根鞘内数层上皮细胞及汗腺管腔细胞呈强阳性反应，对毛囊内根鞘和外根鞘外一层细胞、以及皮脂腺导管细胞呈弱阳性反应，对汗腺基底细胞、分泌细胞、肌上皮细胞和皮脂腺小叶腺细胞则呈阴性反应。

AF_2染色结果与PK基本相同，但不染表皮基底层细胞和毛囊外根鞘外一层细胞，而对部分汗腺分泌细胞呈弱阳性反应。

表1　三种抗角蛋白抗体对正常表皮及其附件的反应

抗体	表皮		毛囊			汗腺				皮脂腺	
	基层上细胞	基底层细胞	内根鞘	外根鞘 内数层细胞	外根鞘 外一层细胞	导管部 管腔细胞	导管部 基底细胞	分泌部 分泌细胞	分泌部 肌上皮细胞	导管细胞	小叶腺细胞
Cam5.2	−	−	−	−	−	−	−	++	−	−	−
AF_2	++	−	+	++/+	−	++	−	−/+	−	+	−
PK	++	++	+	++	+	++	−	−	−	+	−

注：++强阳性　+弱阳性　−阴性　−/+多数细胞阴性，部分弱阳性

2. 各种皮肤肿瘤的染色结果(表2)：

表皮囊肿及表皮角朊细胞恶变的肿瘤皮肤鳞状细胞癌和Bowen病对Cam5.2呈阴性反应，对PK和AF_2呈阳性反应。皮肤鳞状细胞癌表现为强阳性的癌细胞团大小不一，形态不规则；Bowen病则表现为增生的表皮由强阳性和弱阳性的细胞混合组成、排列紊乱。乳房外和乳房Paget病的大多数Paget细胞对Cam5.2显强阳性反应，部分呈弱阳性反应，偶而也可见胞浆空泡化特别明显的Paget细胞呈阴性反应。PK对Paget细胞均呈阴性反应，而周围表皮角朊细胞则呈强阳性反应。AF_2对大多数Paget细胞呈阴性反应，仅部分Paget细胞为弱阳性，周围表皮也被染成强阳性。4例基底细胞癌均为实体型，除1例个别瘤细胞团中央的角化区对PK和AF_2呈强阳性外，其余瘤细胞对三种抗角蛋白抗体均为阴性。

皮肤附件肿瘤中，毛发上皮瘤的基底样瘤细胞对三种抗角蛋白抗体均呈阴性反应，而中央的角质囊肿对PK和AF_2呈强阳性反应，对Cam5.2呈阴性反应。小汗腺瘤的染色与正常汗腺相同，即PK和AF_2强染管腔细胞，Cam5.2强染分泌细胞。汗管瘤囊状扩张的导管管腔细胞对PK和AF_2多呈弱阳性反应，部分呈强阳性反应。生乳头汗管囊

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 三种抗角蛋白抗体对皮肤肿瘤的反应

病 名	例 数	Cam5.2	AF_2	PK
皮肤鳞状细胞癌	4	−	++	++
Bowen病	2	−	++/+	++/+
表皮囊肿	3	−	++	++
乳房外Paget病	6	++/+	−/+	−
乳房Paget病	1	++	−/+	−
皮肤基底细胞癌	4	−	−	−
毛发上皮瘤	2	−	−/++	−/++
小汗腺瘤	1	分泌细胞 ++	管腔细胞 ++	管腔细胞 ++
单纯性汗管棘皮瘤	1	−	+	+
汗管瘤	1	−	+/++	+/++
小汗腺螺旋腺瘤	1	− (个别细胞+)	−/++	−/++
生乳头汗管表腺瘤	1	+/++	− (个别细胞+)	−
生乳头汗腺瘤	1	++	+	− (个别细胞+)
恶性透明细胞汗腺瘤	1	−	++/−	++/−
汗腺癌	4	3例++ 1例−	3例−/+ 1例−	− (个别细胞++)
皮肤粘膜恶性黑素瘤	3	−	−	−
皮肤纤维瘤	2	−	−	−

注：++强阳性 +弱阳性 −阴性 −/++多数瘤细胞阴性，部分瘤细胞强阳性 ++/−多数瘤细胞强阳性，部分瘤细胞弱性

腺瘤的乳头内层柱状细胞对Cam5.2多呈弱阳性反应，对AF_2（除个别细胞弱阳性外）和PK呈阴性反应；而生乳头汗腺瘤中乳头内层柱状细胞对Cam5.2呈强阳性反应，对AF_2呈弱阳性反应，对PK呈阴性反应（仅个别细胞呈弱阳性）。小汗腺螺旋腺瘤由两种瘤细胞组成，一种核大而淡染称过渡型细胞，另一种核小而深染称未分化型细胞，前者对Cam5.2呈阴性反应（仅个别瘤细胞近腔部的胞浆呈弱阳性）而对PK和AF_2呈强阳性反应，后者对三种抗角蛋白抗体均呈阳性反应。恶性透明细胞汗腺瘤的瘤细胞向真皮呈小叶状分布，对Cam5.2呈阴性反应，对PK和AF_2的反应则为透明细胞呈阴性而余瘤细胞呈强阳性。4例汗腺癌中，有1例对三种抗角蛋白抗体均呈阴性染色，其癌细胞核深染而胞浆少，呈大片密集分布于真皮下部；余3例汗腺癌的癌细胞对Cam5.2呈强阳性反应，对PK呈阴性反应，对AF_2则有部分癌细胞呈弱阳性反应。

非上皮肿瘤，即3例皮肤粘膜恶性黑素瘤（包括1例浅表扩展型Paget样黑素瘤）和2例皮肤纤维瘤对Cam5.2、PK和AF_2均呈阴性反应。

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨　论

1．三种抗角蛋白抗体和免疫酶标技术在皮肤病理诊断中的应用价值：皮肤肿瘤，特别是皮肤附件肿瘤，其组织学较为复杂。皮肤肿瘤的诊断和归类，电镜和酶的组织化学虽然也有帮助，但仍有不足之处，且设备和操作较复杂。近年来，由于单克隆抗角蛋白抗体的生产和商品标准化，加之PAP和ABC法的高特异性和高敏感性，使得角蛋白的免疫组化定位研究在皮肤病理学常规检查中成为可能。因此，探讨角蛋白在各种上皮细胞及其衍生肿瘤中的分布和表达，对皮肤肿瘤的诊断是有价值的。本研究结果表明用抗角蛋白抗体和免疫酶标技术对石蜡包埋的组织进行染色，无论是陈旧的或新近包埋的石蜡组织都获得了较满意的结果，同类型的肿瘤染色表现也基本一致，且方法简单快速，能应用于皮肤病理学的常规检查。

38例肿瘤的染色显示三种抗角蛋白抗体均不染皮肤非上皮性肿瘤即恶性黑素瘤和皮肤纤维瘤，而对各种上皮性肿瘤的染色也具有各自的特点。能染正常表皮角朊细胞和汗腺管腔细胞的PK对鳞状细胞癌、Bowen病和单纯性汗管棘皮瘤等呈阳性反应，表明PK适用于鉴别角朊细胞和汗腺管腔细胞衍生的肿瘤。Cam5.2特异性较强，只对正常汗腺分泌细胞呈强阳性反应，不染表皮角朊细胞和汗腺管腔细胞（我们尚未观察到大汗腺导管），其染色型式与Zuk[4]等报告基本一致，Cam5.2能鉴定腺上皮来源的肿瘤如生乳头汗腺瘤等。AF_2不仅能染对PK阳性的肿瘤，而且对Cam5.2强染的部分肿瘤呈弱阳性反应，这可能是因其抗角蛋白组份的"分子量谱带"较宽的缘故。由于AF_2能识别多种类型的上皮性肿瘤，故用于鉴别上皮和非上皮性肿瘤较好。

三种抗角蛋白抗体的结合应用，有助于肿瘤的鉴别诊断。如鉴别乳房外Paget病、Bowen病和浅表扩展型Paget样黑素瘤有时较难，用这三种抗角蛋白抗体则显示Paget细胞为Cam5.2强染，Bowen病为PK和AF_2强染，而浅表扩展型Paget样黑素瘤细胞则对三种抗角蛋白抗体均呈阴性反应。

汗腺肿瘤种类较多，由于正常汗腺各细胞成份对三种抗角蛋白抗体所表现的染色型式不同，因此可根据各种汗腺肿瘤的染色结果与正常汗腺染色型式对照，分出汗腺导管肿瘤如单纯性汗管棘皮瘤、小汗腺螺旋腺瘤，这些肿瘤对PK呈阳性反应；或汗腺腺体肿瘤如生乳头汗腺瘤，这类肿瘤对Cam5.2呈阳性反应。由于Cam5.2对大小汗腺分泌细胞均强染，故本研究结果还不能对大汗腺或小汗腺分泌部肿瘤予以鉴定。当然，由于例数太少，只能作为初步探讨。

三种抗角蛋白抗体对正常毛发毛囊的研究，由于未作从毛乳头到表皮出口部毛发毛囊的连续切片染色，据现有的观察来看，这三种抗角蛋白抗体对研究毛发毛囊不同部位和组成的分化和变化，可能应用价值不大。

2．某些肿瘤的染色特点和分析：乳房Paget病于1874年首次报道，乳房外Paget病相继于1889年报道，但Paget细胞的组织学发生迄今仍为广泛研究的课题。Paget细胞内角蛋白的测定，文献中有阴性或阳性的报道[5-7]。本文研究表明Paget细胞内角蛋白组份与腺上皮细胞一致，而与角朊细胞不同，即对Cam5.2呈强阳性反应，对PK呈阴性反应。组织病理学观察：未见Paget细胞从表皮内侵入真皮，伴腺癌者也仅表现为管内癌。结合孔庆英等[8]报告Paget细胞的超微结构类似胚胎上皮细胞的特点，提示Paget细胞可能系表皮中多潜能基质细胞向腺上皮细胞分化的结果，而不是来自相应的腺上皮细胞恶变。

4例基底细胞癌均为实体型，其癌细胞对染正常表皮基底细胞的PK呈阴性反应，这可能是瘤细胞退化的结果，或是瘤细胞在

维普资讯 http://www.cqvip.com

生长过程中，受营养、代谢和分化的影响，使之所含角蛋白与其母体结构在种类和数量上都发生了差异。当然，也不排除瘤细胞胞浆少影响着色，或固定太久、操作不当影响免疫反应。

总之，本研究结果表明用不同类型的抗角蛋白抗体和免疫酶标技术，对角蛋白在上皮细胞中的分布和表达进行研究，找出各种类型上皮细胞及其衍生的肿瘤所特有的染色型式，将在皮肤病理学常规检查中，为皮肤肿瘤的诊断、分类和确定瘤细胞的来源开辟一个新的领域。

（本文承重庆医科大病生教研室提供AF_2抗体，并在技术上和工作中得到范维珂教授、李培然主管技师、胡军助教的指导和大力支持，特此致谢）

参 考 文 献

[1] Moll R, et al. Cell 1982; 31: 11—24

[2] 胡军，范维珂. 《中国免疫学杂志》 1987; 3(5): 258—262

[3] Makin CA, et al. J Clin Pathol 1984; 37: 975—983

[4] Zuk JA, et al. J Cutan Pathol 1988; 15:8—17

[5] Mazoujian G, et al. AM J Surg Pathol 1984; 8(1): 43—50

[6] Moll R and I. J Invest Dermatol 1985; 84:3—8

[7] Kariniemi A-L, et al. Br J Dermatol 1985; 112:179—183

[8] 孔庆英，等. 《临床皮肤科杂志》 1987; 16(2): 62—63

PRATICAL VALUE OF THREE TYPES OF ANTI-KERATIN ANTIBODIES AND IMMUNO-PEROXIDASE TECHNIQUE IN ROUTINE HISTOPATHOLOGICAL STUDY OF SKIN

Li Hui *Yuan Chengyan*

(Department of Dermatology, The First Hospital)

This paper reports the use of three different types of anti-keratin antibodies and immunoperoxidase technique in the staining of various skin tumors paraffin-embedded. The results showed that three types of anti-keratin antibodies (Cam5.2, AF2 and PK) didn't stain nonepithelial tumors and expressed their inherent different staining patterns for epithelial tumors derived from different tissues. Therefore, three types of anti-keratin antibodies may be helpful for diagnosis, differential diagnosis and classification of complex skin tumors in routine histopathology of skin

KEY WORDS Anti-keratin antibody; Immunoperoxidase technique; Skin tumor