黑素细胞肿瘤抗人增殖细胞抗体 Ki-67 标染研究*

高天文 刘荣卿 叶庆俏 （第三军医大学西南医院皮肤科）630038

提 要 应用抗人增殖细胞抗体 Ki-67，以 ABC 法对 15 例恶性黑素瘤（MM）、17 例后天性痣、18 例先天性小痣及 3 例先天性巨痣进行标记染色。结果显示：13 例 MM 阳性（细胞阳性率 2%～33%），3 型色素痣全部阴性。培养的 MM 细胞阳性率 88%。结果提示：就黑素细胞肿瘤而言，Ki-67 是鉴别良、恶性的一个较敏感和特异的指标；目前用 Ki-67 这种直接反应肿瘤增生活性的方法尚不足以反映不同型良性黑素细胞肿瘤之间存在的微小差别。

关键词 黑素瘤；色素痣；Ki-67

肿瘤增生活性（Proliferative activity）系指肿瘤组织的增殖状态，乃判断肿瘤良恶性及恶性程度的重要指征，是随着反映肿瘤良恶性及恶性程度的技术方法不断增加和进步，逐渐引入肿瘤研究的一个较新概念。目前能直接反映肿瘤增生活性的方法有多种，其中以抗人增殖细胞抗体 Ki-67 最敏感。本实验用 Ki-67 抗体，以 ABC 法对恶性黑素瘤（MM）及色素痣进行染色，旨在探讨 Ki-67 在黑素细胞肿瘤鉴别诊断中的意义及不同型色素痣的增生活性。

1 材料与方法

15 例 MM、17 例后天性痣、18 例先天性小痣及 3 例先天性巨痣标本主要取自本科门诊及住院患者。诊断参照 Roses 等[1]及 Ackerman 等[2]所列标准，经两名皮肤病理医师根据结构形式及细胞学特点复核，先天性痣及后天性痣根据出生时有无确定。先天性痣参照 Illig 等的划分法，CSN≤10cm，CGN＞10cm 或面积超过患者手掌大。

MM 细胞株 Libr 源于澳大利亚 IMVS。

切取标本分出常规石蜡包埋组织及电镜标本后，以液氮冻存。冰冻切片厚 5μm，吹干后以 4℃丙酮固定 10min，-20℃保存备用。Ki-67 为 Dako 公司产品，ABC 试剂盒为 Sigma 公司产品。切片以含 10% H_2O_2 的甲醇封闭 20min，1%牛血清白蛋白封背 30min 后加一抗（1∶10）、二抗（生物素化马抗鼠 IgG）及 ABC，以 AEC 显色。每批染色以培养的 MM 细胞作阳性对照，并以生物化羊抗兔 IgG 替代二抗作阴性对照。

计数方法：选细胞阳性率最高的区域，连续计数 200 个细胞，求出阳性细胞的百分率。阳性细胞核不论着色深浅均作计数。

2 结 果

阳性细胞为胞核染色（图 1）。表皮基底层及棘层下部、毛囊上皮胞浆呈明显的交叉反应（图 2）。所染 15 例 MM，13 例可见阳性细胞，细胞阳性率 2%～33%，平均 10.5±10.0%。38 例色素痣中均未见阳性细胞。培养的 MM 细胞阳性率 88%，以树突消失、胞体大、呈圆球状的细胞染色最强，而少数胞核巨大，树突明显的细胞呈阴性。此种圆球状、染色强的细胞，与 HE 染色作对照分析，为有丝分裂期细胞。

* 国家自然科学基金资助项目

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

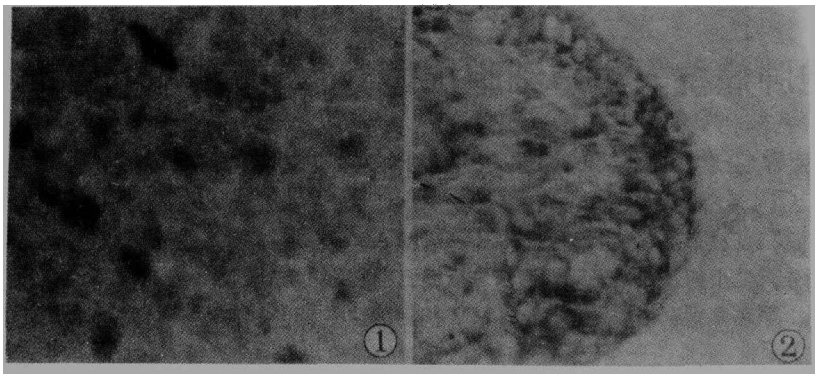


图 1 无色素性 MM Ki-67 标染 阳性细胞胞核着色(色深)。胞浆不着色 ABC 法×400

图 2 先天性小痣 Ki-67 标染 一毛囊上皮细胞胞浆呈交叉反应,毛囊周围的痣细胞阴性 ABC 法×200

3 讨 论

Ki-67 是一株目前最受重视的反映增生活性的单抗,已广泛应用于 MM、白血病、非何杰金氏淋巴瘤、纤维组织肿瘤、结肠癌等多种肿瘤研究以及其它新发现的细胞增殖性抗原的对照研究。该抗体的抗原为经分裂原刺激后的外周血淋巴细胞和单核细胞,此抗体能标记 G1、S、G2、M 期细胞核和染色体,GO 期和 G1 早期细胞核不被标记[3]。最近已明确,Ki-67 抗原为非组蛋白,免疫印迹分析证明其分子量为 395KD 和 345KD 两条带[4]。该抗原对甲醛极敏感,0.04%甲醛浸泡 3min 即可造成损伤。但对温度的要求则不严格,室温放置 4 h 或冻融后室温放置 30min 均未见抗原活性受影响,所以研究时宜采用冰冻切片[5]。

黑素细胞肿瘤研究方面,最近的研究显示,Ki-67 阳性率与 MM 的胞核体积有相关性,与肿瘤浸润深度的关系,文献结果尚不一致。对预后估计的意义,由于应用时间短,尚未见有关文献。

曾有文献提及色素痣细胞 Ki-67 阳性率低于 1%[6],本实验试图通过观察 MM 及三型色素痣细胞进入间期的状况,直接反映黑素细胞肿瘤的增生活性,但三型色素痣中均未发现阳性细胞。此结果提示,目前用于 Ki-67 这种直接反映肿瘤增生活性的方法,尚不足以反映不同型良性黑素细胞肿瘤中存在的微小差别。另一方面,所染的 15 例 MM 中,13 例有多少不等的阳性细胞。提示:就黑素细胞肿瘤而言,Ki-67 单抗是鉴别良恶性的敏感性、特异性较好的指标。

参考文献

1. Roses DF, et al. Diagnosis and management of cutaneous malignant melanoma. Philadelphia: WB Saunders, 1983: 27～76, 115～133
2. Kamina H, Ackerman AB. Maligant melanoma in situ: The evolution of malignant melanoma within the epidermes. In: Ackerman AB. Pathology of Maligmant Melanoma. New York: Masson, 1981: 59～91
3. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol, 1984; 133(4): 1710～1715
4. Gerdes J, Li Li, Schlueter, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Pathol,1991;138(4):867～873
5. Ostmeier H,Suter L. The Ki-67 antigen in primary human melanomas—its relationship to mitotic rate and tumor thickness and its stability. Dermatol Res 1989;281:173～7
6. Soyer HP, et al. Proliferation antigens in cutaneons melanocytic tumors an immunohistochemical study comparing the transferrin receptor and the Ki-67. Dermatologica 1989;179:3～9

(收稿:1991-11-27;修回:1992-04-24)

A study on the labeling of melanocytic tumors and nevi with anti-human proliferative cell antibody Ki-67

Gan Tianwen, Liu Rongqing, Ye Qingyi (Depatment of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract Fifteen cases of malignant melanoma, 17 cases of acquired nevus, 18 cases of congenital small nevus, and 3 cases of congenital giant nevus were labeled with anti-human proliferative cell antibody Ki-67 with ABC labeling method. It was found that 13 out of the 15 cases of malignant melanoma were positive and the positive rate of the tumor cells was ranged between 2% to 33%. After culture, the positive rate of the melanoma cells was 88%. But all the 3 types of melanocytic nevi were negative. The findings suggest that the labeling of anti-human proliferative cell antibody Ki-67 is a sensitive and specific method to identify melanocytic tumors and it is not sensitive enough to differentiate the minor changes of the 3 types of nevi.

Key words melanoma; melanocytic nevus; Ki-67

(上接 426 页)

害怕看到别人眼睛,在与人交往时,回避别人的目光,紧张、害怕不自然的表情,引起别人的惊讶,反馈给她,便强化了她认为别人又看到她内心想法的推测,长期这样形成恶性循环。在分析完病人问题性质之后,向病人介绍脱敏训练及放松训练方法,同时强调,只要她能与治疗者密切配合,采取行为自助,恐怖症预后是良好的。

病人第 3 次来咨询,自述经治疗者分析之后心情轻松了许多,并能按照治疗者的建议进行脱敏训练。在后几次咨询中,病人症状明显改善,但反反复复。此间重点放在肯定病人目前的能力;纠正其与人交往时错误认知——认为别人会看穿其内心思想,帮助病人建立正常交往心态;称赞病人取得的成绩;鼓励病人坚持脱敏训练,消除病人负性自动思想。同时予抗紧张、焦虑药物辅以改善紧张、焦虑的状态。经过 11 次咨询,长达 1 年多时间,病人症状完全消失。

讨论

中国心理分析在理论上,承认心理动力学的观点,承认潜意识内容对意识、行为的影响,承认幼年经验对成人心理的影响,认为将心理矛盾双方提到意识平面为治疗关键[1]。本文通过分析疏导,将压抑在病人内心深处的矛盾情绪引起来,然后以现实的态度加以分析之,使病人领悟到自己的想法是幼稚的、不成熟的,并自觉放弃它。这种领悟是病人内心深处的改变,从而为矫正外部行为跨出了关键一步。本例治疗中既重视了认知因素在行为中作用,也注意到已形成不良行为,所以也采用了行为治疗与高脱敏疗法,配合领悟疗法,以矫正外部已形成异常行为。

选择恰当的支持性谈话,及时掌握和消除病人在治疗中出现的心理阻抗,与病人建立良好的关系,争取到病人参与治疗过程本身,也是保证治疗过程的顺利进行及疗效的重要环节。

关键词 心理治疗;恐怖症

参考文献

1. 钟友彬。中国心理分析。辽宁人民出版社,1988

(收稿:1992-04-23;修回:1992-06-21)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net