

淋巴瘤样丘疹病皮损中表皮及真皮内不同表型 肿瘤细胞克隆来源相关性的探讨*

温蓬飞¹, 王婷婷¹, 王琳^{1△}, 王锐男², 唐源³, 吴文超⁴, 刘小菁⁴, 张文燕³

1. 四川大学华西医院 皮肤性病科(成都 610041); 2. 四川大学华西口腔医学院 口腔疾病研究国家重点实验室(成都 610041);
3. 四川大学华西医院 病理科(成都 610041); 4. 四川大学华西医院 再生医学中心 心血管疾病研究室(成都 610041)

【摘要】目的 通过对8例淋巴瘤样丘疹病(LyP)A型和C型患者表皮内的MF样细胞和真皮内的R-S样细胞DNA水平的对比性研究,探讨二者克隆来源的相关性。**方法** 对8例LyP(A型4例、C型4例)的病理组织行免疫表型检测、应用激光捕获显微切割技术(LCM)结合PCR技术对表皮内的MF样细胞和真皮内的R-S样细胞进行T细胞受体(TCR) γ 基因重排的对比研究。随机选取1例检测为阳性的PCR产物送测序,进行序列比对。**结果** 8例中有6例(75%)检测到TCR γ 基因克隆性重排。LyP A型及C型检出率分别为50%(2/4)、100%(4/4)。LyP表皮内MF样细胞及真皮内R-S样细胞TCR γ 基因重排检出率分别为75%(6/8)、75%(6/8)。随机选取的1例MF样细胞和R-S样细胞均有阳性条带的产物的同源性比对分析显示二者同源性达106/108(98%)。**结论** LyP表皮内MF样细胞和真皮内R-S样细胞很可能来自同一克隆。

【关键词】 淋巴瘤样丘疹病 MF样细胞 R-S样细胞 克隆来源 对比研究

Investigate the Clonal Origin of Different Phenotypic Tumor-like Cells in the Epidermis and Dermis of Skin Lesions in Lymphomatoid Papulosis WEN Peng-fei¹, WANG Ting-ting¹, WANG Lin^{1△}, WANG Rui-nan², TANG Yuan³, WU Wen-chao⁴, LIU Xiao-jing⁴, ZHANG Wen-yan³. 1. Department of Dermatology and Venereology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases, West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Laboratory of Cardiovascular Diseases, Regenerative Medicine Research Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: lkzwl@126.com

【Abstract】Objective To explore the correlation of the clone sources of MF-like cells in the epidermis and RS-like cells in the dermis of lymphomatoid papulosis (LyP), a comparative study of this two type cells in 8 LyP cases was carried out. **Methods** 8 cases of LyP (4 type A cases and 4 type C cases) were detected the immunophenotype first, and then comparative study between the MF-like cells and RS-like cells was conducted on T-cell receptor (TCR) γ -chain gene rearrangement by combining laser capture microdissection (LCM) and PCR. PCR products of one patient which had positive bands were selected randomly for sequencing and sequence alignment analysis. **Results** Monoclonal TCR γ gene rearrangement was detected in 6 cases (75%) of the 8 cases. Detection rates of LyP type A and type C were 50% (2/4) and 100% (4/4), respectively. The rates of MF-like cells and RS-like cells were 75% (6/8) and 75% (6/8), respectively. Homology of the products with positive stripes in both MF-like cells and RS-like cells in one randomly selected case was compared and analyzed, and the results showed the homology of them was 106/108 (98%). **Conclusion** The MF-like cells in the epidermis and the RS-like cells in the dermis of LyP may be from the same clone.

【Key words】 Lymphomatoid papulosis MF-like cells RS-like cells Clonal origin Contrast study

淋巴瘤样丘疹病(LyP)是仅次于蕈样霉菌病(MF)的第二常见的皮肤淋巴瘤^[1],属低度恶性T细胞淋巴瘤。2008年世界卫生组织的造血与淋巴

组织肿瘤分类^[2]中,均将LyP分为A型、B型和C型。该病预后良好^[2]。文献^[3]及我们的研究^[4]均发现约半数LyP A型和C型病例有亲表皮现象,亲表皮的细胞类似MF的肿瘤细胞,称为MF样细胞。表皮内的MF样细胞的性质及其与真皮内的R-S样细胞克隆来源的相关性,目前尚无文献报道,而明

* 国家自然科学基金(No. 81272985)资助

△ 通讯作者, E-mail: lkzwl@126.com

确以上问题将促进对 LyP 本质的认识,同时丰富肿瘤细胞分化相关的理论。因此,本研究应用激光捕获显微切割(LCM)技术结合聚合酶链反应^[1](PCR)对 8 例 LyP 患者表皮内的 MF 样细胞和真皮内的 R-S 样细胞进行了 T 细胞受体(TCR) γ 基因重排的研究,试图确定表皮内 CD30 阴性的 MF 样细胞的性质,并进一步探讨二者克隆来源有无相关性,从而加深对本病的认识。

1 材料和方法

1.1 材料

通过查阅我院 1998~2012 年的档案资料,筛选出诊断为 LyP 或疑似病例 23 例。复查 HE 切片和石蜡标本,排除误诊病例 5 例;LyP B 型 3 例;无亲表皮现象 5 例;组织太小 2 例。最终确定 8 例为研究对象,其中 LyP A 型 4 例, LyP C 型 4 例。LyP 组织学诊断依据 2008 年 WHO 淋巴造血分类中对 LyP 的组织学描述^[2]。

1.2 方法

1.2.1 临床资料 收集患者临床资料,包括患者的一般情况、临床表现、主要的实验室检查和治疗措施,并进行随访。以病理确诊之日起计算开始随访的时点,按月计算。随访截止原因:死亡、中途失访或随访截止(2012 年 12 月)。

1.2.2 组织病理学 对所有病例进行组织形态学复习,重点观察肿瘤的浸润模式、瘤细胞大小和形态、核大小和形态、核仁大小和数量、核分裂像、表皮病变和亲表皮现象、亲皮肤附件、血管病变、炎症细胞的种类和多少等。

1.2.3 免疫表型 所有标本经 10% 中性甲醛(体积分数)固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片,进行 T 细胞标记(CD3、CD45RO、CD4、CD5、CD8),活化 T 细胞标记 CD30,中性粒细胞及 RS 细胞标记 CD15, B 细胞标记 CD20,细胞毒性标记[T 细胞内抗原 1(TIA-1)、粒酶 B(GrB)、Perforin]及间变性淋巴瘤激酶 ALK-1,共 12 种抗体分别进行 LASB 法及 Elivision 法染色。染色方法、阳性对照、阴性对照、空白对照同本研究小组之前的工作^[4]。以反应性增生的淋巴组织作为 CD3、CD20、CD45RO 的阳性对照;以正常扁桃体作为 CD5 的阳性对照;以 CD4、CD8、TIA-1 和 GrB 阳性的 T 细胞淋巴瘤作为这些标记的阳性对照;以混合细胞型霍奇金淋巴瘤作为 CD30、CD15 的阳性对照;以 ALK-1 阳性淋巴瘤作为 ALK-1 的阳性对照;以皮肤的结外鼻型

NK/T 细胞淋巴瘤作为 Perforin 的阳性对照;以 PBS(0.01 mmol/L, pH7.2)代替一抗作为空白对照。阳性对照组的切片均来自我院病理科免疫组化室 2007 年的标准阳性对照片。

1.2.4 基因重排及 DNA 测序

1.2.4.1 激光捕获目的细胞及提取 DNA 目的细胞捕获:将 8 μm 切片裱于 Arcturus 显微切割专用覆膜切片上,改良苏木素染色,不封片置于 Pixcell 显微激光切割系统(Arcturus, USA)的倒置显微镜载物台,将乙烯乙酸乙烯酯薄膜(EVA)帽紧密覆盖在切片表面;于 200 倍镜下调节监视器下设置最佳的参数并分别切割表皮 MF 样细胞(图 1)及真皮 R-S 样细胞(图 2),利用红外线热效应将目标细胞黏附在与 0.5 mL 离心管相匹配的盖子上,并最终盖于预装有 40 μL ddH₂O 的 0.5 mL 离心管上。每管收集约 100~200 个细胞。DNA 提取:加入蛋白酶 K(工作浓度 0.2 mg/mL)于管盖中,倒置离心管,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温消化 3 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 灭活蛋白酶 K 后澄清液作为 DNA 提取产物,保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.4.2 TCR γ 基因克隆性重排检测 取上述澄清液 9 μL 作为模板 DNA,采用 TCR γ 基因的通用引物 $T_{\text{VG}}/T_{\text{JX}}$ 行降落式 PCR, $V_{2-5}/V_{8-12}/JGT1$ 、BIOMED-2 行常规 PCR 检测 TCR γ 基因克隆性重排。所有病例均以 β -球蛋白作为内对照,所用引物由上海英骏生物技术服务有限公司合成,引物序列及产物见文献^[5]。通用引物 $T_{\text{VG}}/T_{\text{JX}}$ 行降落式 PCR 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,每次下降 0.5 $^{\circ}\text{C}$,直到 53 $^{\circ}\text{C}$,共 14 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。引物 $V_{2-5}/V_{8-12}/JGT1$ 行 PCR 反应在 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,30 个循环,反应结束后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置。引物 BIOMED-2 行 PCR 反应在 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,35 个循环,反应结束后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置。阳性对照以 T 细胞淋巴瘤 Jurkat 细胞株 DNA 为模板,阴性对照采用正常皮肤真皮内淋巴细胞 DNA,空白对照以双蒸水代替模板进行扩增。反应结束取 5~7 μL 产物行 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳,溴乙锭染色,凝胶成像系统(Bio-Rad)扫描并观察。

1.2.4.3 DNA 测序及序列分析 对经 TCR γ 基因克隆性重排检测获得目的条带的 PCR 产物(表

皮、真皮均有阳性条带),随机选取 1 例送测序。将纯化的 DNA 送至 Invitrogen 公司,在 ABI 377 DNA 测序仪上进行双向序列分析,测序引物同 PCR 扩增所用引物。将测序结果两两间比对,在 NCBI (National center for Biotechnology Information)的 BLAST 基因数据库服务网搜寻重排基因的核酸同源性。

2 结果

2.1 基本临床资料

8 例患者中男 3 例,女 5 例,平均年龄 25 岁,中位年龄 18.5 (5~55)岁。诊断前病程 10 d 到 18

年,中位病程 4 年。所有患者皮损均为多发,其中累及四肢 7 例、躯干 5 例、面部 2 例、臀部及耳廓各 1 例。皮损大小 0.5 cm×0.5 cm 到 10 cm×15 cm 不等。表现为无症状的红色丘疹 7 例、结节 4 例、红斑 2 例、色素沉着斑及浅表萎缩性瘢痕 1 例。本组 8 例中 7 例获随访资料者均存活,情况良好,皮疹反复发作,至随访截止已生存 5~107 月。

2.2 组织学特点

见图 3。A 型 4 例:肿瘤在真皮内呈或略呈楔形浸润(图 3A),1 例伴小片状坏死,4 例均有皮下脂肪浸润,组织学特点为大量的炎细胞(包括组织细胞、中性粒细胞、嗜酸性白细胞、淋巴细胞及浆细胞

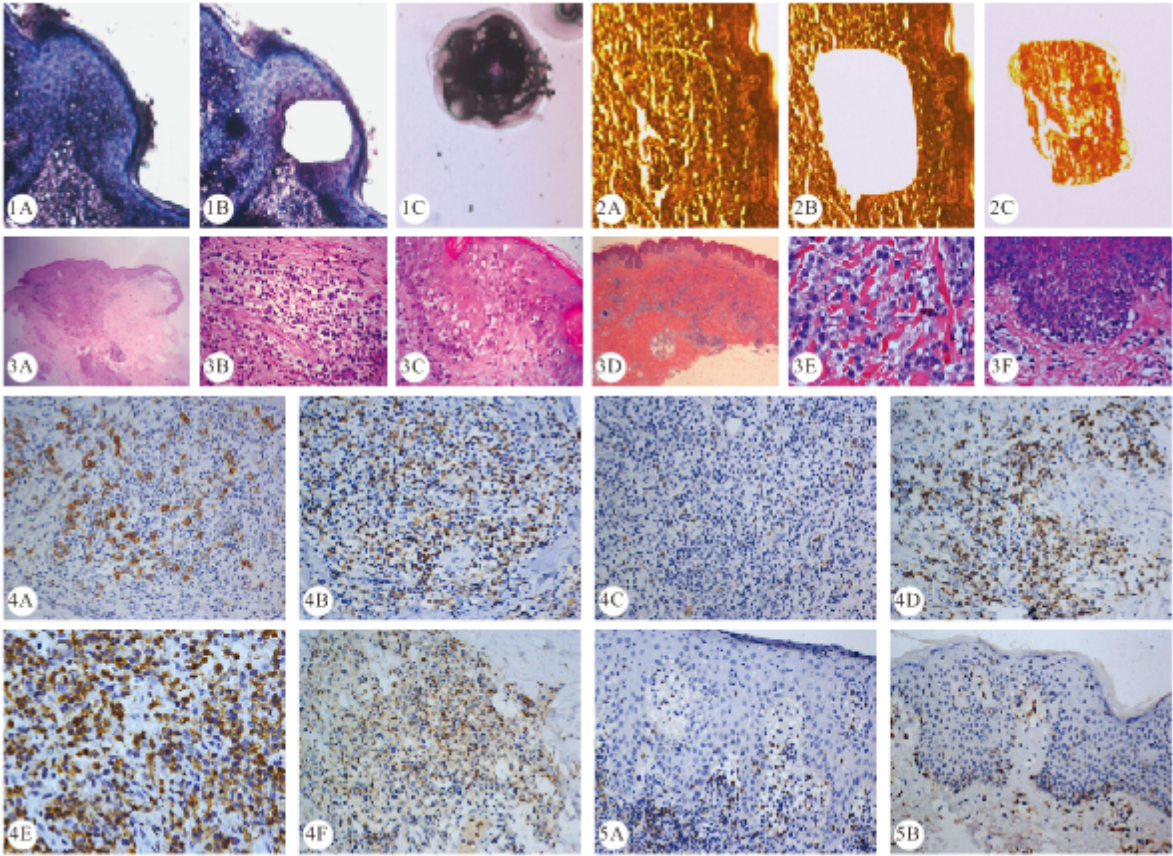


图 1 LyP 在显微切割下表皮内 MF 样瘤细胞被标记(A)、切割(B)及收集(C)。Gill 苏木素染色 图 2 LyP 在显微切割下真皮内 R-S 样瘤细胞被标记(A)、切割(B)及收集(C)。Gill 苏木素染色 图 3 LyP 组织病理学表现 图 4 真皮 R-S 样细胞 CD30 阳性(A),CD3 阳性(B),GrB 阳性(C),CD5 阳性(D),CD45RO 阳性(E),TIA-1 阳性(F) 图 5 LyP 表皮内 MF 样瘤细胞 CD3 阳性(A),CD4 阳性(B)

Fig 1 MF-like cells in the epidermis were signaled (A), cutted (B) and captured (C). Gill's hematoxylin stain Fig 2 RS-like cells in the dermis were signaled (A), cutted (B) and captured (C). Gill's hematoxylin stain Fig 3 Histopathological findings of LyP Fig 4 Immunohistochemistry results on the RS-like cells in the dermis showing positivity for CD30 (A), CD3 (B), GrB (C), CD5 (D), CD45RO (E) and T-cell intracellular antigen-1 (TIA-1) (F) Fig 5 Immunohistochemistry results on the MF-like cells in the epidermis showing positivity for CD3 (A) and CD4 (B)

1A, 1B, 2A, 2B, 2C: ×200; 1C: ×400; 3A: The type A tumor cells of LyP were infiltrated in the dermis in wedge-shaped (HE ×40); 3B: Anaplastic large cells were scattered in a background of numerous inflammatory cells (HE ×200); 3C: Epidermotropism of type A (HE ×400); 3D: The type C tumor cells of LyP were nodular and patchily infiltrated in the dermis, involving the subcutaneous fat layer (HE ×40); 3E: The type C tumor cells of LyP were large, round or oval with red cytoplasm, polymorphic nuclei and rare inflammatory cells (HE ×400); 3F: Epidermotropism of type C (HE ×400); 4A, 5B: Elivision ×200; 4B-4F, 5A: SP ×200

等)背景下散在大的间变细胞(图 3B)。4 例均有表皮增生及亲表皮现象,亲表皮之瘤细胞为扭曲、核深染的 MF 样细胞(图 3C)。C 型 4 例:大间变瘤细胞(图 3E)在真皮内呈楔形小片状浸润 2 例,片状浸润 1 例(图 3D),略呈楔形 1 例。3 例浸润至皮下脂肪层。炎细胞少。3 例有表皮增生。4 例均有 MF 样细胞的亲表皮现象(图 3F)。

2.3 免疫组化标记

8 例 R-S 样瘤细胞(图 4)均表达活化 T 细胞标记 CD30,T 细胞标记 CD5、CD45RO 及细胞毒标记 TIA-1,7 例表达 CD3,5 例表达 GrB、Perforin;8 例均不表达 B 细胞标记 CD20、ALK-1。

8 例 MF 样瘤细胞(图 5)均表达 CD3,7 例表达 CD45RO,4 例表达 CD4,仅 1 例表达 CD5,8 例均不表达 CD30、CD8、CD15、CD20、ALK-1。

2.4 TCR 基因重排的检测

综合 3 组 $TCR\gamma$ 引物的 PCR 检测结果:8 例 LyP 患者经 LCM 法提取 DNA 进行 PCR 检测,有 6 例(75%)检测到 $TCR\gamma$ 基因克隆性重排条带,其中 T_{VG}/T_{JX} 、 $V_{2-5}/V_{8-12}/JGT1$ 和 BIOMED-2 $TCR\gamma$ 3 对引物的阳性检出率分别为 75%(6/8)、0(0/8)和 0(0/8)。在 6 例阳性样本中,MF 样细胞及 R-S 样细胞均在 180 bp 处检测到单克隆性 $TCR\gamma$ 基因重排(图 6);而 2 例阴性样本中,MF 样细胞及 R-S 样细胞均未检测到 $TCR\gamma$ 基因克隆性重排条带。LyP

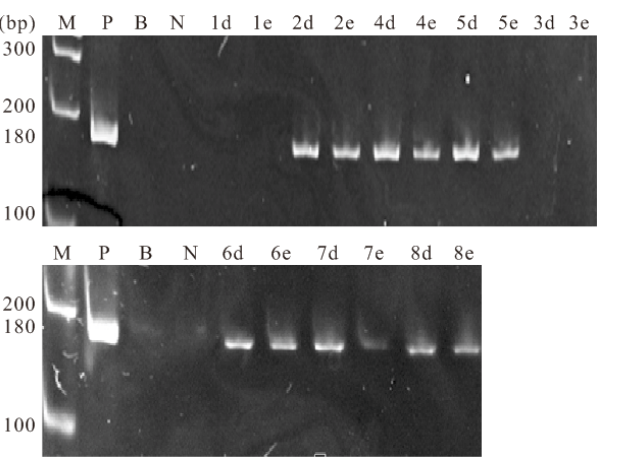


图 6 $TCR\gamma$ 基因重排(引物 T_{VG}/T_{JX})PCR 电泳图
Fig 6 Electrophoretogram of $TCR\gamma$ (T_{VG}/T_{JX}) gene rearrangements by PCR

M: Marker (DL 2 000); P: Positive control; B: Blank control; N: Negative control; 1-8 were case numbers (e: Epidermis-derived; d: Dermis-derived). There were electrophoretic bands of primers PC03/PC04 that amplifies β -Globingene sequence in 196 bp region. There were electrophoretic bands of T_{VG}/T_{JX} , primers of $TCR\gamma$, in 180 bp region

A 型及 C 型检出率分别为 50%(2/4)、100%(4/4)。LyP 表皮内 MF 样细胞及真皮内 R-S 样细胞基因重排检出率分别为 75%(6/8)、75%(6/8)。

2.5 DNA 测序

经 BLAST 基因数据库比对分析结果显示,表皮 MF 样细胞及真皮 R-S 样细胞之间同源性达 106/108(98%),见图 7。

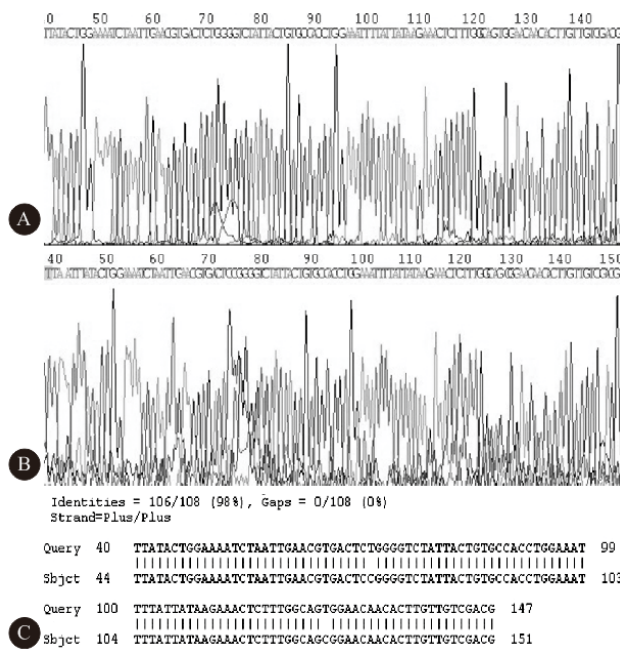


图 7 LyP 样本 8e (A)和 8d (B) $TCR\gamma$ 引物 T_{VG}/T_{JX} 的 PCR 扩增产物克隆后测序, BLAST 同源性分析比较结果(C)

Fig 7 LyP sample 8e (A) and 8d (B): the chart of sequencing the $TCR\gamma$ (T_{VG}/T_{JX}) product amplified by PCR, the result of pairwise comparison by homology analysis (C)

3 讨论

本研究 8 例 LyP 患者(其中 A 型及 C 型各 4 例)组织学上均存在与 LyP B 型相类似的亲表皮现象,亲表皮细胞类似 MF 的肿瘤细胞。文献^[3]及我们的前期研究^[4]均发现约半数 LyP A 型和 C 型病例存在亲表皮的 MF 样细胞,其性质及其与真皮 R-S 样细胞克隆相关性尚未见文献报道。本研究首次在石蜡包埋的组织切片中应用 LCM 技术分别获取到 LyP 皮损中表皮 CD30 阴性的 MF 样细胞及真皮 CD30 阳性的 R-S 样细胞,进行 PCR 扩增以检测二者 $TCR\gamma$ 基因克隆性重排,填补了对于 LyP 表皮内 MF 样细胞及真皮内 R-S 细胞克隆来源领域的空白,对于认识 LyP 的本质及其病理生理发展过程具有重要意义。

3.1 LyP 中亲表皮 MF 样细胞性质的研究

LyP 中亲表皮 MF 样细胞可能为良性反应性增生淋巴细胞,也可能为肿瘤细胞的恶性增殖,明确 MF 样细胞性质将促进对 LyP 本质的认识。在皮肤 T 细胞淋巴瘤(CTCL)中,检测 $TCR\gamma$ 的单克隆重排有利于鉴别组织中浸润淋巴样细胞的良恶性^[6]。根据不同引物的设计、应用引物的数量及 PCR 产物检测手段的不同, LyP 皮损中 $TCR\gamma$ 的单克隆重排检出率为 40%~100%^[7,8]。但是对于存在微量肿瘤细胞或者较多异质成分的 CTCL,常规检测 $TCR\gamma$ 基因重排的方法往往不能得出满意结果^[9]。近年来研究证实联合 LCM 技术能提高 PCR 检测 CTCL 中 TCR 克隆的敏感性^[10]。本研究小组^[5]曾将 LCM 技术应用于组织学上未确诊的早期 MF 皮损中的 $TCR\gamma$ 基因克隆性重排检测,显示阳性检出率达 87.5%,而常规酚-氯仿提取 DNA 检测 $TCR\gamma$ 基因克隆性重排阳性率仅为 12.5%。本研究应用 LCM 技术分别获取 8 例 LyP 表皮内的 MF 样细胞及真皮的 R-S 样细胞,利用引物 T_{VG}/T_{JX} 、 $V_{2-5}/V_{8-12}/JGT1$ 、 $BIOMED-2$ 进行 PCR 以检测 $TCR\gamma$ 基因克隆性重排,8 例共 16 个样本中,有 6 例共 12 个样本(75%)检测到单克隆性 $TCR\gamma$ 基因重排,阳性检出率相较文献报道为高^[11]。本研究中 LyP A 型及 C 型病例检出率分别为 50%(2/4)、100%(4/4),基因重排阳性检出率相较文献为高^[12],可能由于本研究采用了 LCM 技术获取均一同质肿瘤细胞,从而使得检出率较高。4 例 LyP A 型病例 $TCR\gamma$ 基因重排的检出率为 50%(2/4),考虑为该型肿瘤细胞在显微切割过程中,掺杂有背景反应性炎细胞,进而影响到 PCR 扩增阳性检出率。6 例(A 型 2 例,C 型 4 例)通过 LCM 分别获取 MF 样细胞及真皮 R-S 样细胞共 12 个样本均检测到同一目标大小的阳性条带,提示表皮内 MF 样细胞与真皮内 R-S 样细胞很可能来自同一克隆淋巴细胞的恶性增殖。

3.2 表皮 MF 样细胞及真皮内 R-S 样细胞克隆相关性的研究

以往研究多就 LyP 真皮内浸润的不同形态及免疫表型的细胞进行研究,目前就表皮 MF 样细胞及真皮内 R-S 样细胞克隆相关性未见研究报道。但即使采用了显微切割或是单细胞分析等高敏感性方法对 LyP 中 CD30 阳性瘤细胞的克隆性进行研究,其结果依然存在争议。Steinhoff 等^[13]通过单细胞分析发现在 LyP 皮损中真皮内 CD30 阳性的 R-S 样细胞属于同一 T 细胞克隆来源,而真皮内 CD30

阴性的 T 细胞则为多克隆来源。与之相悖, Gellrich 等^[14]的研究结果显示真皮内 CD30 阳性 R-S 样细胞为多克隆性,而 CD3 阳性的较小的 T 淋巴细胞则呈单克隆性增生。本研究 6 例 LyP 皮损内 MF 样细胞及 R-S 样细胞均检测到相同的克隆性基因重排条带,序列比对结果显示两个克隆的序列同源性达 98%,提示二者很可能为同一克隆来源。因而我们推测 LyP 皮损内 MF 样细胞和 R-S 样细胞的形态和免疫表型上的差异可能是肿瘤异质性的表现。由于两种细胞的基因变异,如基因拷贝数的变异或基因突变,加之 DNA 的表观遗传学特征(如 DNA 甲基化等)改变以及在表皮和真皮的不同微环境条件下,发生了形态和免疫表型的差异,形成了两个不同的细胞亚群,即这两种细胞在基因水平的异质性导致了它们在形态、免疫表型上的差异。然而究其本质,表皮 MF 样细胞及真皮内 R-S 样细胞很可能来自于同一克隆。

因病例数偏少,且仅进行了 DNA 水平的初步研究,本研究结果有待于通过增加样本量并在转录水平以及蛋白质水平进行进一步的验证;其次,对于表皮 MF 样细胞及真皮内 R-S 样细胞形态、表型差异的产生机制尚需进行更深入系统的研究。

参 考 文 献

- 1 Willemze R, Jaffe ES, Burg G, *et al.* WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*,2005;105(10):3768-3785.
- 2 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon:IARC Press,2008;233-268.
- 3 El Shabrawi-Caelen L, Kerl H, Cerroni L. Lymphomatoid papulosis: reappraisal of clinicopathologic presentation and classification into subtypes A, B, and C. *Arch Dermatol*,2004;140(4):441-447.
- 4 王婷婷,王琳,张文燕等.淋巴瘤样丘疹临床病理分析. *中华病理学杂志*,2009;38(10):668-672.
- 5 Yang H, Xu C, Tang Y, *et al.* The significance of multiplex PCR/heteroduplex analysis-based $TCR\gamma$ gene rearrangement combined with laser-capture microdissection in the diagnosis of early mycosis fungoides. *J Cutan Pathol*,2012;39(3):337-346.
- 6 McCarthy KP, Sloane JP, kabarowski JH, *et al.* The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol*,1991;138(4):821-828.
- 7 Weiss LM, Wood GS, Trela M, *et al.* Clonal T-cell populations in lymphomatoid papulosis. Evidence of a lymphoproliferative origin for a clinically benign disease. *N Engl J Med*,1986;315(8):475-479.
- 8 Goeldel AL, Cornillet-Lefebvre P, Durlach A, *et al.* T-cell

- receptor gamma gene rearrangement in cutaneous T-cell lymphoma: comparative study of polymerase chain reaction with denaturing gradient gel electrophoresis and GeneScan analysis. *Br J Dermatol*,2010;162(4):822-829.
- 9 Alessi E, Coggi A, Venegoni L, *et al.* The usefulness of clonality for the detection of cases clinically and/or histopathologically not recognized as cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol*,2005;153(2):368-371.
 - 10 Yazdi AS, Medeiros LJ, Puchta U, *et al.* Improved detection of clonality in cutaneous T-cell lymphomas using laser capture microdissection. *J Cutan Pathol*,2003;30(8):486-490.
 - 11 Gallardo F, Costa C, Bellosillo B, *et al.* Lymphomatoid papulosis associated with mycosis fungoides: clinicopathological and molecular studies of 12 cases. *Acta Derm Venereol*,2004;84(6):463-468.
 - 12 Greisser J, Palmedo G, Sander C, *et al.* Detection of clonal rearrangement of T-cell receptor genes in the diagnosis of primary cutaneous CD30 lymphoproliferative disorders. *J Cutan Pathol*,2006;33(11):711-715.
 - 13 Steinhoff M, Hummel M, Anagnostopoulos I, *et al.* Single-cell analysis of CD30⁺ cells in lymphomatoid papulosis demonstrates a common clonal T-cell origin. *Blood*,2002;100(2):578-584.
 - 14 Gellrich S, Wernicke M, Wilks A, *et al.* The cell infiltrate in lymphomatoid papulosis comprises a mixture of polyclonal large atypical cells (CD30-positive) and smaller monoclonal T cells (CD30-negative). *J Invest Dermatol*,2004;122(3):859-861.

(2014-07-15 收稿,2014-11-24 修回)

编辑 吕 熙

(上接第 184 页)

- 21 Wang GB, Su JJ, Li LJ, *et al.* Edaravone alleviates hypoxia-acidosis/ reoxygenation- induced neuronal injury by activating ERK1/2. *Neurosci Lett*,2013;543:72-77. doi: 10.1016/j.neulet.2013.02.067. Epub 2013 Apr.
- 22 Watanabe K, Ma M, Wen J, *et al.* Effects of edaravone in heart of aged rats after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Biol Pharm Bull*,2007;30(3):460-464.
- 23 Imai S, Inokuchi Y, Nakamura S, *et al.* Systemic administration of a free radical scavenger, edaravone, protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *Eur J Pharmacol*,2010;642(1-3):77-85.
- 24 Inokuchi Y, Imai S, Nakajima Y, *et al.* Edaravone, a free radical scavenger, protects against retinal damage *in vitro* and *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*,2009;329(2):687-698.
- 25 Kobayashi Y, Akamatsu Y, Iwane T, *et al.* Signaling pathway on the effect of oxygenated warm perfusion prior to cold preservation of the liver grafts from non-heart-beating donors, and the additive effect of edaravone. *Transplant Proc*,2009;41(1):49-51.
- 26 Lee IT, Shih RH, Lin CC, *et al.* Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells. *Cell Commun Signal*,2012;10(1):33-48.
- 27 Arumugam S, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, *et al.* Involvement of AMPK and MAPK signaling during the progression of experimental autoimmune myocarditis in rats and its blockade using a novel antioxidant. *Exp Mol Pathol*,2012;93(2):183-189.
- 28 Tsunekawa K, Kondo F, Okada T, *et al.* Enhanced expression of WD repeat-containing protein 35 (WDR35) stimulated by domoic acid in rat hippocampus: involvement of reactive oxygen species generation and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *BMC Neurosci*,2013;14:4. doi: 10.1186/1471-2202-14-4.
- 29 Cao M, Liu F, Ji F, *et al.* Effect of c-Jun N-terminal kinase (JNK)/p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in morphine-induced tau protein hyperphosphorylation. *Behav Brain Res*,2013;237(15):249-255.
- 30 白雪,王菁,王松林等.β-淀粉样蛋白₂₅₋₃₅杏仁核注射对大鼠海马 Caspase-3 及 P38MAPK mRNA 表达的影响. *上海医学*,2010;33(12):1117-1119.
- 31 Kimura J, Nemoto K, Yokosuka A, *et al.* 6-Demethoxynobiletin, a nobiletin-analog citrus flavonoid, enhances extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in PC12D cells. *Biol Pharm Bull*,2013;36(10):1646-1649.
- 32 Kawasaki T, Kitao T, Nakagawa K, *et al.* Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes: protection by edaravone, a radical scavenger. *Glia*,2007;55(13):1325-1333.
- 33 Butterfield DA, Galvan V, Lange MB, *et al.* *In vivo* oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: requirement for methionine 35 in amyloid β-peptide of APP. *Free Radic Biol Med*,2010;48(1):136-144.
- 34 Lu TH, Hsieh SY, Yen CC, *et al.* Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 activation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury. *Toxicol Lett*,2011;204(1):71-80.

(2014-07-27 收稿,2014-10-12 修回)

编辑 沈 进