论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0780-04

正常人脾脏树突状细胞的分布及形态学观察

刘 茜[1,2],陆江阳[2],王晓虹[2],杨 毅[2],李 玲[2] ([1]军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850;[2]解放军总医院第一附属医院病理科,北京 100037)

摘 要:目的 认识不同表面分子标记物所标记的脾脏树突状细胞(dendritic cell,DC)分布、成熟程度与超微结构特点。**方法** 运用光镜、电镜观察与免疫组化标记(CD11c、CD205、CD209、S-100、CD1a、HLA-DR、CD80及CD86)方法观察35例正常人脾脏组织中的树突状细胞的形态分布及超微结构特点。**结果** 正常人脾脏树突状细胞主要分布在白髓边缘区和T细胞区,CD11c、CD205和CD209是目前较特异的树突状细胞标志物,标记阳性率分别为4.19%、3.96%和3.02%,其中$CD209^+$ DC分布更靠近红髓。树突状细胞表达共刺激分子CD80与CD86的阳性率分别为2.68%和2.02%,主要分布在T细胞区。树突状细胞超微结构特点为细胞体积较大,呈细长状或不规则形,表面可见数个突起向周围细胞间隙延伸;胞核形状不规则,表面有凹陷,可见核仁;胞浆致密或呈低电子密度,细胞器欠发达。**结论** 正常人脾脏中不同表面分子阳性树突状细胞的比率和分布有所不同,其中大部分为不成熟的树突状细胞,具有活性的成熟树突状细胞数目较少。

关键词: 树突状细胞;脾脏;共刺激分子;人

中图法分类号: R322.21; R329.2 **文献标识码:** A

Distribution and morphology of human splenic dendritic cells

LIU Qian[1,2], LU Jiang-yang[2], WANG Xiao-hong[2], YANG Yi[2], LI Ling[2] ([1]Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850; [2]Department of Pathology, First Hospital Affiliated to the General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To observe the distribution of human splenic dendritic cells (DCs) with several DC markers and ultramicrostructural features of these DCs. **Methods** Spleen sample tissues of 35 individuals, including 30 patients after acute traumatic splenic rupture and 5 corpses after sudden death due to cardiac or cerebrovascular diseases were collected. The splenic dendritic cells in these sample sections were observed and analyzed by light microscopy, electron microscopy, and immunohistochemical staining with DCs markers including CD11c, CD205, CD209, S-100, CD1a, HLA-DR, CD80 and CD86. **Results** DCs were mainly distributed in 3 distinct regions, the T-cell zones, the B-cell zones, and the marginal zone in the spleen. In the marginal zone, DCs formed a ring surrounding the white pulps. $CD209^+$ DCs were nearer to the red pulp than $CD11c^+$ DCs and $CD205^+$ DCs. The $CD11c^+$ DCs, $CD205^+$ DCs and $CD209^+$ DCs accounted for about 4.19%, 3.96% and 3.02% of all spleen mononuclear cells respectively. In normal human spleen, most DCs were immature and only a small amount were mature DCs, which were CD80 or CD86 positive and mainly distributed in the T-cells zones. Under an electron microscope, splenic DCs were large, slender or irregular in cell body, with several protrudes extending into the intercellular space. The nuclei were irregular in shape and depressed in surface with clear nucleoli. The cytoplasm was compacted or in low electron density and some organelles were seen. **Conclusion** Splenic DCs with different DC markers locate in different regions of the spleen. Most of them are immature, and only a small amount is mature.

Key words: dendritic cells; spleen; co-stimulatory molecules; human

研究免疫细胞在脾脏内的分布及功能状态,可为深入研究脾脏局部微环境的免疫应答作用奠定基础。以往对脾脏免疫细胞的研究多集中在淋巴细胞上,对树突状细胞的研究较少。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是机体功能最强大的抗原提呈细胞,也是唯一能激活初始型T淋巴细胞的抗原提呈细胞,通过激活T细胞产生Th1型或者Th2型免疫应答,对机体细胞免

基金项目: 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MB307)
Supported by the General Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06MB307)

作者简介: 刘 茜,女,山东省济南市人,博士研究生,主治医师,主要从事创伤免疫病理学方面的研究,发表论文6篇。电话:(010)66867438,E-mail:liliudongqian@yahoo.com.cn

通信作者: 陆江阳,电话:(010)66867432,E-mail:lujy@263.net

收稿日期: 2008-10-27;**修回日期:** 2008-12-18

疫应答起至关重要的作用,并能激活 B 细胞增生,产生抗体。本研究在以往对小鼠胸腺和脾脏树突状细胞研究的基础上[1-4],运用光镜、电镜和免疫组化方法,观察正常人体脾脏树突状细胞的形态分布及超微结构特点,为研究病理状态下的 DC 在脾脏内的分布及功能变化提供实验基础。

1　材料与方法

1.1　标本来源

人脾脏标本共 35 例,来自本院 2002 -2008 年手术切除和尸检标本。其中 30 例为急性外伤脾破裂行脾切除术的临床外检标本,伤前身体健康。5 例为突发心、脑血管疾病猝死病例的尸检脾标本。

1.2　光镜观察

10% 中性福尔马林固定,活检切除脾脏标本固定 2 ~ 5 h,尸检脾标本 2 ~ 14 h,常规石蜡制片,HE 染色。

1.3　电镜观察

共收集 12 例脾脏标本,取材时间在离体或死后 30 min 至 2 h。将脾组织切割成 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织块,置于 3% 戊二醛中固定 24 h,OsO_4后固定,梯度乙醇及丙酮脱水,EPON812 包埋,LKB-V 型超薄切片机切片,经醋酸铀和枸橼酸铅双重染色后,在 JEM-1200EX 型透射电镜下观察。

1.4　免疫组织化学标记

1.4.1　主要试剂　　树突状细胞标记抗体详见表 1。二抗为 Super Picture™ Poly HRP conjugate(Invitrogen,工作液),免疫组化双标试剂盒购自中杉生物技术公司。

表 1　免疫组化抗体

抗体名称	稀释度	抗原处理	阳性部位	来源
CD11c 鼠抗人单抗	1∶50	高压热修复	细胞膜	Dako
CD86 鼠抗人单抗	1∶200	高压热修复	细胞膜/质	Dako
CD1a 鼠抗人单抗	1∶50	高压热修复	细胞质	Dako
HLA-DR 兔抗人多抗	1∶50	高压热修复	细胞膜/质	Dako
S-100 兔抗人多抗	1∶50	高压热修复	细胞质	Dako
CD205 鼠抗人单抗	1∶25	高压热修复	细胞膜/质	Serotec
CD209 兔抗人多抗	1∶100	高压热修复	细胞膜/质	Serotec
CD80 兔抗人多抗	1∶200	高压热修复	细胞膜	博士德

1.4.2　染色方法　　免疫组化标记应用 EnVision 二步法标记,DAB 显色。免疫组化双标记:石蜡切片脱蜡至水后,高温抗原修复(枸橼酸缓冲液,pH 6.2,2 min)双氧水封闭,加一抗,常温孵育 1 h,PBS 冲洗,加二抗(Bio-goat anti M/R IgG)40 min,PBS 冲洗后,加 Streptavidin-AP,常温孵育 30 min,NBT/BCIP 显色(深蓝),加增色剂(阳性物质由深蓝变为呈黑色);PBS 冲洗后加第 2 种一抗,常温 1 h,PBS 冲洗后,加二抗(Bio-goat anti M/R IgG)40 min,PBS 冲洗后,加 Streptavidin-HRP,AEC 显色液显色(棕红色),苏木精衬染核,水溶性封片剂(GVA)封片。阴性对照:以抗体稀释液代替第一抗体进行免疫染色,其余步骤同上。

1.5　计数分析

计算树突状细胞标记阳性细胞数占脾脏单个核细胞总数的百分比,同时计数 DC 标记阳性细胞数占白髓细胞数量的百分比。计算方法:随机选取 50 个高倍视野,计数 DC 标记阳性细胞数/该视野内所有单个核细胞数 × 100%,即为树突状细胞的百分比,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　光镜观察

脾脏组织结构清晰,红、白髓界限分明,白髓成熟淋巴细胞丰富,内含较多淋巴小结,部分可见生发中心。脾索和脾窦排列整齐,可见脾窦扩张或充血。白髓动脉周围淋巴鞘、白髓边缘区及脾索内散在分布着一些较大的多角形细胞,体积较淋巴细胞大,形状不规则,表面有树枝状突起,细胞质丰富,淡染。胞核形状不规则。其中还见一些单个核细胞或巨噬细胞(图 1)。

2.2　电镜观察

在白髓、边缘区及脾索中可见少量散在分布的树突状细胞:细胞体积较大,细长状或不规则形,表面可见数个突起向周围细胞间隙延伸,胞核形状不规则,表面多见凹陷,染色质较淡而疏松,异染色质沿核膜分布,可见核仁(图 2A);胞质电子密度致密或稀疏,细胞器欠发达,可见游离核糖体和线粒体(图 2B)。树突状细胞周围多有成熟小淋巴细胞围绕,其细胞膜及突起与淋巴细胞紧密接触,偶见凋亡的淋巴细胞。

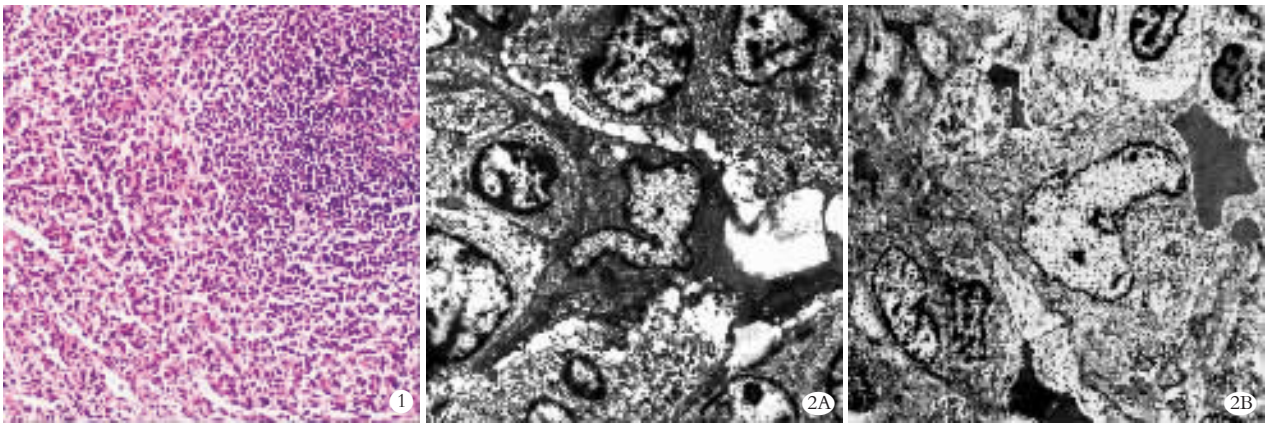


图 1　人正常脾脏边缘区 DC 的光镜观察　(HE × 200)

图 2　人正常脾脏 DC 的电镜观察　(EM × 4 000)　　A:边缘区 DC;B:脾索 DC

2.3 免疫组化观察

2.3.1 CD11c CD11c 阳性细胞为细胞膜阳性,呈棕色细颗粒状。$CD11c^+$ DC 主要分布在白髓区,包括中央动脉周围散在分布,其中以白髓与红髓交界的边缘区为最多。在白髓 B 细胞区滤泡生发中心和红髓中也可见少量 $CD11c^+$ 细胞(图 3A)。$CD11c^+$ DC 占脾脏所有单个核细胞总数的(4.19 ±0.33)%,其中占白髓区单个核细胞的(4.72 ±0.42)%。

2.3.2 CD205 $CD205^+$ DC 为细胞膜/质阳性,分布范围与 $CD11c^+$ DC 相似,但含量较 $CD11c^+$ 细胞少(图 3B)。$CD205^+$ DC 占脾脏单个核细胞总数的(3.96 ±0.27)%,其中占脾脏白髓区单个核细胞的(4.39 ±0.36)%。

2.3.3 CD209 $CD209^+$ DC 为细胞膜/质阳性,主要分布在白髓边缘区,靠近红髓处。白髓 T 细胞区和 B 细胞区中未见 CD209 阳性细胞(图 3C)。$CD209^+$ DC 数约占脾脏单个核细胞总数的(2.32 ±0.14)%,其中占脾脏白髓区单个核细胞的(3.02 ±0.18)%。

2.3.4 S-100 S-100 阳性细胞为细胞质阳性,在白髓 T 细胞区、B 细胞区及邻近的红髓内均可见少量散在分布,其中以边缘区含量为多(图 3D)。S-100 阳性细胞数约占脾脏单个核细胞总数的(1.81 ±0.13)%。

2.3.5 CD1a $CD1a^+$ DC 为细胞质阳性,在正常脾脏组织内含量较少,在白髓、边缘区及红髓内均可见零星分布(未计数),其中以边缘区阳性细胞数略多(图 3E)。

2.3.6 HLA-DR HLA-DR 阳性细胞为细胞质和/或细胞膜阳性,弥漫分布于脾脏白髓 T 细胞区和 B 细胞区(图 3F),以白髓边缘区和淋巴滤泡中含量为多,邻近红髓中也有弥散分布。HLA-DR 阳性细胞数占脾脏单个核细胞总数的(8.21 ±0.97)%。

2.3.7 CD80 CD80 阳性细胞为细胞质阳性,主要分布在白髓 T 细胞区,以近边缘区含量为多。红髓区也可见少量 CD80 阳性细胞散在分布(图 3G)。CD80 阳性细胞数约占脾脏单个核细胞总数的(2.68 ±0.27)%。

2.3.8 CD86 CD86 阳性细胞为细胞质阳性,分布范围与 CD80 阳性细胞相似(图 3H)。阳性细胞数占脾脏单个核细胞总数的(2.02 ±0.34)%。

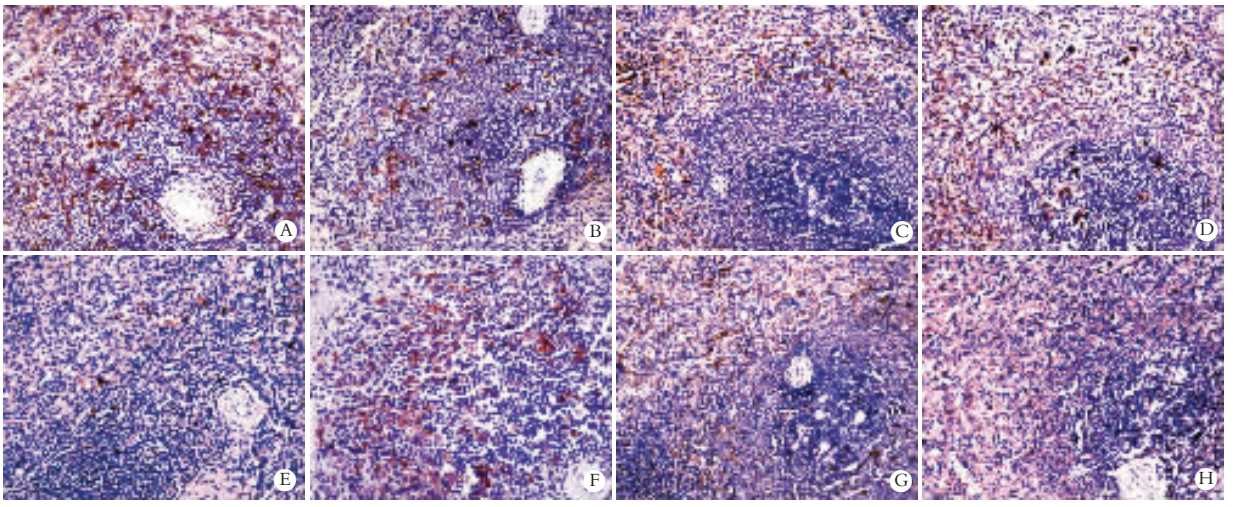
2.4 免疫组化双重染色

2.4.1 CD11c/CD209 与 S-100/CD205 CD11c 阳性细胞细胞膜呈红色细颗粒状,CD209 阳性细胞细胞膜/细胞质呈黑色颗粒状。$CD209^+$ DC 主要分布在边缘区,呈稀松的环状分布,分布较 $CD11c^+$ DC 更接近于红髓区。$CD11c^+/CD209^+$ DC 数量很少(图 4A)。

S-100 阳性细胞细胞质呈黑色颗粒状,CD205 阳性细胞细胞膜/细胞质呈红色细颗粒状。$S\text{-}100^+/CD205^+$ DC 数量少,主要分布在脾脏边缘区(图 4B)。

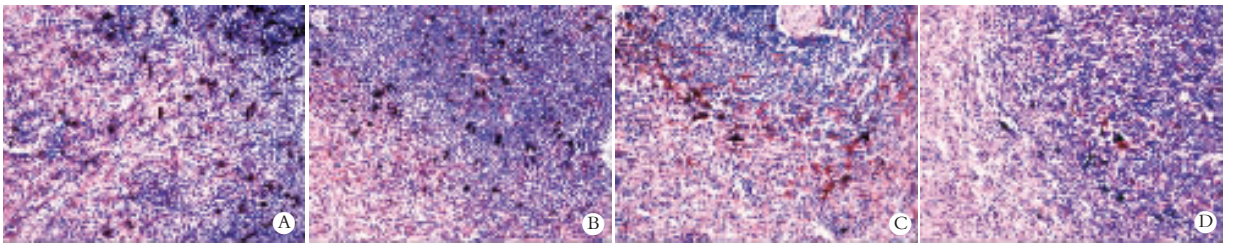
2.4.2 CD80/CD11c 与 CD86/S-100 $CD80^+/CD11c^+$ DC 分布于脾脏白髓 T 区及边缘区。CD80 与 CD11c 阳性细胞细胞膜、细胞膜分别呈现红色和黑色颗粒(图 4C)。$CD80^+/CD11c^+$ 阳性细胞数占 $CD11c^+$ 阳性细胞总数的 9% ~17%,平均为 11%。

$CD86^+/S\text{-}100^+$ DC 分布于白髓 T 细胞区及边缘区。CD86 与 S-100 阳性细胞细胞膜、细胞质分别呈现红色和黑色颗粒(图 4D)。$CD86^+/S\text{-}100^+$ 阳性细胞数占 $S\text{-}100^+$ 阳性细胞总数的 11% ~21%,平均为 15%。



A – H:分别为 CD11c、CD205、CD209、S-100、CD1a(标记少许细胞阳性)、HLA-DR、CD80、CD86 标记阳性

图 3 脾脏 DC 的免疫组化观察 (EnVision ×200)



A、CD11c/CD209 标记;B:S-100/CD205 标记 边缘区部分 DC 同时表达 S-100 和 CD205;C:CD80/CD11c 标记;D:CD86/S-100 标记

图 4 脾脏 DC 免疫组化双标记观察 (EnVision ×200)

3　讨论

以往对脾脏 DC 的研究主要是小鼠脾脏 DC[5,6],而人脾脏 DC 研究甚少。人脾脏 DC 主要分布在 T 细胞区、B 细胞区和边缘区 3 个区域,且主要为不成熟 DC[7]。CD11c 是最常用的 DC 标记物,而 CD209、CD205 等其他标记物阳性 DC 在人脾脏组织的分布研究很少[8],本研究应用 CD11c、CD205、CD209、S-100、CD1a 等抗体分别标记 DC,观察不同标记物阳性细胞的分布特点并计数阳性细胞率;应用免疫组织化学双标技术,检测脾脏 DC 的成熟状态并计数成熟 DC 的比例。研究结果显示,人正常脾脏组织内 $CD205^+$ DC 与 $CD11c^+$ DC 分布相似,主要分布在白髓区,其中以边缘区为最多,边缘区 DC 互相连接,形成环形围绕在白髓周围;在 T 细胞区 DC 呈散在分布,中央动脉周围也可见较多 CD11c 及 CD205 阳性细胞;B 细胞区也可见少量 CD11c 及 CD205 阳性 DC。与 $CD11c^+$ DC、$CD205^+$ DC 分布不同,CD209 阳性细胞分布在边缘区靠近红髓区,呈不连续的环形围绕白髓区,而在 T 细胞区、B 细胞区及边缘区近白髓区未见明显表达。CD11c/CD209 双标记显示,同时表达 CD11c 和 CD209 的树突状细胞数量很少,这说明 CD11c 和 CD209 可能标记不同的 DC 亚型。比较不同的标记物所标记的阳性细胞率显示,CD11c 阳性细胞的比例最高,占脾脏单个核细胞的 4.19%,而 $CD205^+$ DC 和 $CD209^+$ DC 的比例分别为 3.96% 和 3.02%。S-100 及 CD1a 为人脾脏 DC 的非特异性标记物,在巨噬细胞及部分淋巴细胞有表达。$S\text{-}100^+$ 细胞除了在白髓内分布外,红髓内也可见表达,阳性细胞体积较小,突起不明显。S-100/CD205 免疫组化双标记显示:白髓区少部分 $S\text{-}100^+$ 阳性细胞表达 CD205,而红髓区 $S\text{-}100^+$ 阳性细胞不表达 CD205,这些细胞可能为巨噬细胞;CD1a 在皮肤郎格罕细胞及胸腺树突状细胞呈较高阳性表达,而脾脏树突状细胞很少表达 CD1a,因此未能计数,这与以往的研究结果相同[9]。

脾脏抗原提呈细胞(antigen-presenting cells,APCs)如树突状细胞、巨噬细胞、B 细胞等表达 HLA-DR,免疫组化标记显示 HLA-DR 阳性细胞分布在白髓区和邻近的红髓区,说明 HLA-DR 可以显示 APCs 的分布区域;DC 表达 HLA-DR 随细胞的成熟程度不同而不同,不成熟 DC 显示细胞质阳性,而成熟 DC 显示细胞膜阳性;不成熟 DC 受到抗原刺激后,能很快在细胞膜表面表达 HLA-DR。本研究结果显示 HLA-DR 主要在胞浆表达,提示这些细胞处于不成熟状态,具有抗原提呈能力。

我们用免疫组化方法标记 CD80、CD86,显示 DC 的成熟状态,结果显示正常人脾脏树突状细胞中少部分为 CD80 与 CD86 阳性的成熟 DC,主要分布在 T 细胞区,阳性细胞占脾脏树突状细胞的 9% ~17% 和 11% ~21%。这说明脾脏内 DC 大部分为不成熟 DC,T 细胞区少量 DC 为成熟 DC,这些 DC 可能受机体自身抗原或外来抗原刺激后,发挥免疫监视作用。此结果与 Mcllroy 等[9]的研究结果相近,该研究发现器官供体者的脾脏 $CD86^+$ 成熟 DC 占脾脏 DC 的 12%。红髓区也可见较多表达 CD80 的细胞,在红髓区呈弥漫分布,但这些细胞大部分不表达 CD11c,而且部分细胞体积较小,类同淋巴细胞。

电镜观察示树突状细胞细胞器欠发达,未见各级溶酶体结构,这也是 DC 与巨噬细胞的重要鉴别点之一。观察边缘区和脾索区 DC 发现,二者在超微结构上不具有明显的差别,超微结构可能不能提示 DC 的功能状态[10]。

本研究利用不同的标记物标记人正常脾脏 DC 的分布特征,结果表明脾脏 DC 主要分布在白髓,尤其是边缘区的分布具有明显的特点,呈环状分布,这与其抗原提呈作用密切相关,显示了结构和功能的密切相关性。脾脏 DC 是一群异质性细胞,表达不同表面分子的树突状细胞的含量和分布有所不同。大部分脾脏 DC 为不成熟的树突状细胞,具有活性的成熟树突状细胞含量较少。本研究为人脾脏树突状细胞研究提供了定量组织形态学依据。

参考文献:

[1] 刘　茜, 陆江阳, 王晓虹, 等. 小鼠脾脏树突状细胞的分布与形态学观察[J]. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(4): 346 - 348.

[2] 孙　宇, 陆江阳, 王晓虹, 等. 小鼠胸腺树突状细胞的分布与形态学观察[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(9): 813 - 815.

[3] 陆江阳, 李志宏, 王晓虹, 等. 脾脏树突状细胞在多器官功能障碍综合征中的变化及意义[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(1): 24 - 27.

[4] 陆江阳, 王晓虹, 刘　茜, 等. 多器官功能障碍综合征 52 例尸检脾及脾树突状细胞的病理学观察[J]. 诊断病理学杂志, 2007, 14(3):172 - 175.

[5] Shortman K. Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions[J]. Immunol Cell Biol, 2000, 78(2): 161 - 165.

[6] Heath W R, Belz G T, Behrens G M, *et al*. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens [J]. Immunol Rev, 2004, 199: 9 - 26.

[7] Tan J K, O'Neill H C. Concise review: Dendritic cell development in the context of the spleen microenvironment[J]. Stem Cells, 2007, 25(9): 2139 - 2145.

[8] Pack M, Trumpfheller C, Thomas D, *et al*. DEC-205/$CD205^+$ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp[J]. Immunology, 2008, 123(3): 438 - 446.

[9] Mcllroy D, Troadec C, Grassi F, *et al*. Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of *in vivo* activation in a subset of organ donors[J]. Blood, 2001, 97(11): 3470 - 3477.

[10] Steinman R M, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs[J]. Immunol Rev, 1997,156:25 - 37.

(编辑　吴培红)