DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.019
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
884 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)10-0884-03

自体移植脾组织中神经纤维的再生

左艳芳,张 坤,郭光金,张天飞,张集健 (第三军医大学基础医学部外科应用解剖与手术学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 采用免疫组化的方法探讨自体移植脾组织中神经纤维的再生过程。方法 健康Wistar大鼠63只,体质量100~120 g,分为实验组及假手术组,术后7、14、30、60、90、120、180 d取两组脾组织,行免疫组化ABC法抗NPY抗体染色、图像分析定量测定。结果 术后30 d内,自体移植脾组织无NPY^+神经纤维;术后60 d,NPY^+神经纤维出现于移植脾组织周边区域并随时间推移向移植脾组织中央实质区伸展;术后180 d移植脾组织内NPY^+神经纤维分布及免疫组化阳性染色区域密度接近正常。结论 应用免疫组化方法对自体脾组织移植后神经纤维再生过程进行研究,可清晰显示神经纤维再生规律,为后续研究提供理论基础与技术方法。

关键词:脾脏;移植;神经再生;免疫组化
中图法分类号:R364.33;R617;R657.602 文献标识码:A

The regeneration of nerve fiber in autotransplanted spleen tissue

ZUO Yan-fang, ZHANG Kun, GUO Guang-jin, ZHANG Tian-fei, ZHANG Ji-jian (Department of Surgical Applied Anatomy and Operative Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the regeneration of nerve fiber in autotransplanted spleen tissue by using immunohistochemical technology. Methods A total of 63 healthy Wistar rats were randomly divided into splenectomy and splenic autotransplantation group and sham-operation group. Regeneration process and density changes of the regenerated nerve fibers in splenic autotgrafts of the two groups were studied by immunohistochemical methods and computer image analysis on day 7, 14, 30, 60, 90, 120 and 180 postoperatively. Results The regenerated nerve fibers had no regeneration on day 30 postoperatively, but on day 60 nerve fibers appeared in the peri-region of the autotransplanted spleen and extended into the inner-part of splenic autotransplants gradually. Density of the nerve fibers gradually became greater and almost normal 180 days after operation. Conclusion The regenerated nerve fibers could be revealed clearly by using immunohistochemical technology in autotransplanted spleen. This technology will be the important support for the research work of splenic autotransplantation.

Key words: spleen; autotransplantation; neural regeneration; immunohistochemistry

脾脏是全身最大的淋巴器官,对维持机体免疫功能具有重要作用。脾切除后机体免疫力降低,易发生凶险性感染及AIDS[1],机体抗肿瘤免疫也受到严重削弱[2]。切除的脾组织自体移植后可以部分恢复其结构及功能[3],因此,脾切除后的自体脾组织移植术已广泛应用于临床。研究证明,自体移植脾组织内神经纤维的再生对移植脾组织结构及功能的恢复有着重要的意义。本实验在对自体移植脾组织的神经纤维再生过程研究中应用免疫组化方法对再生神经纤维进行显示,可确切的了解神经纤维的再生、分布及密度变化规律,能够较好的反应其再生的动态变化过程及与脾组织结构功能恢复间的关系,为脾脏外科临床及实验研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组及动物模型制作

1.1.1 动物分组 健康Wistar大鼠63只,雌雄不限,体质量100~120 g,分组:①脾切除自体脾组织移植组(实验组),42只;②假手术组(对照组),21只。

1.1.2 动物模型制作 大鼠以0.4%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(1 ml/100 g),无菌条件下手术:将实验组大鼠脾脏切除,取切下脾脏中部(占全脾50%),切成1 mm×1 mm×1mm均匀颗

作者简介:左艳芳(1963-),女,四川省眉山市人,实验师,主要从事动物手术方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752251

收稿日期:2002-11-25;修回日期:2003-03-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

粒; 展平大网膜并用 3-0 丝线沿其周边预做荷包缝合后将脾组织颗粒完全包入大网膜内, 收紧缝线, 建立自体脾组织移植动物模型; 假手术组大鼠开腹后仅牵动脾脏后回复原位, 不行其他手术处理。

1.2　应用免疫组化方法对 NPY^+ 神经纤维进行检测

1.2.1　主要试剂　　兔抗大鼠神经肽 Y(NPY)抗体(武汉博士德公司), 即用型SABC 试剂盒(武汉博士德公司), 多聚赖氨酸(Ply)(美国 Sigma 公司), DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司)等。

1.2.2　标本取材及切片制备　　在手术后 7、14、30、60、90、120、180 d, 7 个时相点分别取假手术组(大鼠各 3 只)及实验组(大鼠各 6 只)大鼠脾组织, 连续冷冻切片(－27 ℃), 片厚 5 μm, 置纯丙酮室温下固定 30 min, 蒸馏水漂洗 10 min× 2 次, 干燥后 4 ℃收集待测。

1.2.3　再生神经纤维的检测　　每个脾组织标本取冷冻切片 5 张, 免疫组化 ABC 法抗 NPY 抗体染色, 显示脾组织中 NPY^+ 神经纤维, HE 轻度复染, 充分吹干切片后, 透明树胶封片, 光镜观察。

1.3　图像分析、数据分析及统计学处理

采用医学图像分析系统, 对免疫组化 NPY^+ 神经纤维染色区域进行图像分析定量。每个时相点取切片 5 张, 光镜下放大 200 倍, 每张切片测试 5 个视野, 测得面积密度后取平均值, 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS 统计软件对所得数据进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　NPY^+ 神经纤维再生

手术后早期(14 d 内), 移植脾组织中未呈现神经纤维的 NPY 阳性染色, 但在包绕移植脾组织的大网膜内可见 NPY 阳性染色区域。手术后 30 d, NPY 阳性染色神经纤维仅在包绕移植脾组织的大网膜内可以见到, 环绕于小血管的周围; 手术后 90 d, 再生神经纤维的 NPY 阳性染色区域不仅出现在移植脾组织周边血管壁周围, 而且呈条索状分布于脾实质内, 见图 1。术后 120 d, 移植脾组织内神经纤维 NPY 阳性染色区域分布比较广泛, 环行包绕于血管周围, 尤其以脾小体动脉、PALS 中央动脉周围多见, 亦可呈条索状分布于脾实质, 见图 2, 在手术后 180 d 神经纤维阳性染色的分布及密度接近于正常脾组织。假手术组脾脏结构正常, NPY 阳性染色神经纤维呈长短不等的条索状分布于脾脏被膜与小梁, 呈环行包绕于血管壁周围, 见图 3。

2.2　图像分析

自体移植脾组织 NPY 阳性染色神经纤维密度在术后不同时相点变化显著: 脾移植术后 30 d 内, 组织因广泛坏死, 原有神经纤维被切断而变性, 无神经纤维的阳性染色区域出现; 脾移植 30 d 后, 组织内出现 NPY^+ 神经纤维, 并随时间延长其在组织内的密度逐渐增大, 至脾移植后 180 d 趋于稳定, 但密度较假手术组仍低; 假手术组脾组织神经纤维的阳性染色密度在术后不同时期无明显变化, 见表 1。



图 1　自体脾组织移植术后 **90 d, NPY^+** 神经纤维包绕移植脾组织周边血管壁, 亦呈条索状分布于脾实质　(SABC× 400)

Fig 1　NPY^+ nerve fibers surround the wall of the blood vessel of implant, also distribute into the parenchyma in strip-shape on the 90th day after splenic tissue auto-transplantation　(SABC× 400)



图 2　脾组织移植术后 **120 d, NPY^+** 神经纤维环行包绕于血管周围, 亦可呈条索状分布于脾实质　(SABC× 400)

Fig 2　NPY^+ nerve fibers surround the wall of the blood vessel of implant, also distribute into the parenchyma of implant in strip-shape on the 120th day after splenic tissue auto-transplantation　(SABC× 400)



图 3　假手术组脾脏结构正常, **NPY^+** 神经纤维环行包绕于血管壁周围　(SABC× 200)

Fig 3　In Sham group, the splenic tissue structure is normal. NYP^+ nerve fibers surround the wall of the blood vessel of implant　(SABC× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表1 术后不同时相点脾组织 NPY^+ 神经纤维面积密度($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Density of NPY^+ nerve fibers in spleen at different time after operation ($\bar{x}\pm s$)

Group	Time points after operation						
	7 d	14 d	30 d	60 d	90 d	120 d	180 d
autotransplantation	0	0	0	1.35±0.04 *	4.61±0.03 *	6.37±0.05 *	7.22±0.04 *
sham-operation	9.26±0.08	9.11±0.07	9.12±0.07	9.14±0.07	9.12±0.07	9.13±0.08	9.09±0.05

*: $P<0.01$, *: $P<0.01$ *vs* sham-operation

3 讨论

脾脏神经随脾动脉入脾后,其神经纤维末梢通过递质储存与释放调节脾脏的免疫功能[4]。Felten[5]、Schimdtova 等[6]学者研究发现,正常脾脏神经纤维末梢广泛分布于脾脏被膜、小梁、边缘区;神经纤维末梢可与 PALS 及边缘区淋巴细胞直接接触,形成间隙小于经典突触的特殊结构,直接调节淋巴细胞功能[7]。

目前对移植组织神经纤维再生的研究较少,其相关报道主要集中于角膜移植、皮瓣移植后的神经再生方面,移植术后 30 d 在移植的角膜、皮瓣周边均可见长入的新生神经纤维[8,9]。但对自体脾组织移植术后移植脾组织内神经纤维的再生状况,国内外尚无报道。本实验采用免疫组化技术,应用抗 NPY(Neupeptide Y)抗体对再生神经纤维进行染色,应用图像分析测得再生 NPY^+ 神经纤维的密度,观测移植脾组织神经纤维的再生规律。可见移植手术后 30 ~60 d,移植脾组织内 NPY^+ 神经纤维开始出现;至术后 180 d,再生脾组织内 NPY^+ 神经纤维广泛环绕于血管周围且可呈条索状分布于脾实质,其分布及密度接近正常脾脏。Westerman 等[10]认为自体脾组织移植后如无神经再生,则移植脾组织结构功能恢复差。我们推测自体移植脾组织的神经纤维再生,可能对移植脾组织结构与功能恢复有重要作用。再生神经纤维可能有对脾组织内细胞进行调控和促进脾组织细胞增生、血管再生及功能恢复的作用。本实验利用免疫组化方法可以实现对自体移植脾组织再生过程中的神经纤维再生进行动态观察,了解其生长变化规律,为自体脾脏移植后功能恢复的进一步研究提供技术方法及理论基础。

参考文献:

[1] Greub G, Erard P, Overbeck V J. HIV infection and splenectomy: 3 cases and literature review[J]. Chweiz Med Wochenschr, 1996, 126(36): 1524—1529.

[2] 邱培才,陈积圣. 脾切除对诱发性肝癌大鼠免疫功能的影响[J]. 普外基础与临床杂志, 2000, 7(4): 224—225.

[3] Gomez L, Egido R, Guarino G, *et al*. Histologic study of experimental spleen transplant in rats[J]. Minerva Chir, 2000, 55(11): 741—744.

[4] Quatacker J, Partoens P, Potter W. Postganglionic, direct axo-axonal contacts on the splenic nerve[J]. Brain Res, 2001, 891(1-2): 213—217.

[5] Bellinger D L, Felten S Y, Lorton D, *et al*. Origin of noradrenergic innervation of the spleen in rats[J]. Brain Behav Immun, 1989, 3(4): 291—231.

[6] Schmidtova K, Kluchova D, Rybarova S, *et al*. Coexistence of nitrergic and acetylcholinesterase(ACHE)-positive nerve structures of the phaesant spleen[J]. Gen Physiol Biophys, 1999, 18(S1): 72—74.

[7] David L F, Suzanne Y F, Denise L B, *et al*. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function[J]. Immunological Review, 1987, 100(1): 225—259.

[8] 王智崇,徐锦堂,陈家祺. 显微板层角膜移植术后神经再生的观察[J]. 中国实用眼科杂志, 2000, 18(9): 527—529.

[9] 杨 帆,陈绍宗,李跃军. 免感觉神经植入失神经皮瓣后再生末梢支配面积的动态变化研究[J]. 第四军医大学学报, 1999, 20(8): 707—709.

[10] Westermann J, Michel S, Kostka S L, *et al*. Regeneration of implanted splenic tissue in the rat: re-innervation is host age-dependent and necessary for tissue development[J]. J Neuroimmunol, 1998, 88(1-2): 67—76.

(编辑 冷怀明)

(上接 883 页)

文献报道,一般认为其阳性率 60% ~90%[2]。本研究测定 104 例肺结核血液 PPD 特异抗体浓度,阳性率为 78.9%,同时测定的指血 PPD 特异抗体浓度 1∶50 与血清抗体浓度 1∶100 经相关分析有显著的相关性。我们采用指血浓度 1∶50,是因为红细胞在血液中容积比,男性 42.8% ~50.6%,女性 36.7% ~47.5%,抗体大部分存在血清中,血球仅存在极少的抗体。所以,指血与浓度比约 2∶1,而在测定中指血抗体阳性高于抗体值,是因为血球在血液的比积平均为 40% ~50%。说明指血 PPD 中特异抗体测定比静脉血中稍高。两者完全可以互相替代。

肺结核病的诊断,用结核分枝菌抗体胶体金法 TB-DOT 诊断试剂盒测血清结核抗体虽然简单、快速,但敏感性偏低,对急性感染、溶血、高血脂患者血清标本在滴定时,会影响判断结果。同时病人免疫力低下,体内的 AB-Ab 未达到一定水平时,也出现假阴性[3],特异性尚在探讨之中。用指血测定的结核抗体其对肺结核的诊断准确性为 84.6%,指血与静脉血清结核抗体有明显相关性,两者符合率达 85.6%。说明指血可取代静脉血进行结核抗体测定,是一种简单、易行及可靠的方法。

关键词:指血;静脉血清;酶联免疫吸附试验;结核抗体
中图法分类号:R446.62 文献标识码:B

参考文献:

[1] 裴 斌,姚芳娟,杨珏琴. ELISA 测定血清可溶性 HLA-I 类抗原[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(4): 213—214.

[2] 王国兵,叶德普,彭义利,等. 5 种放方法联合检测对菌阴肺结核诊断价值的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(1): 47—49.

[3] 沈 阳,余传萍,杨小红. TB-DOT 试剂对结核病的评估[J]. 上海医学检验杂志, 1999, 14(6): 346.

(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net