DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.023
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

文章编号:1000-5404(2000)08-0769-04

论著

树突状细胞对胃粘膜免疫的调节作用研究

罗治彬,鲁 荣,罗元辉,晋华源,张朋彬,徐采朴 (第三军医大学附属西南医院消化内科,重庆 400038)

提 要:目的 通过研究胃粘膜中S-100$^+$,HLA-DR$^+$,CD4$^+$和CD8$^+$产物的表达情况,以了解树突状细胞(DC)在胃粘膜免疫中的作用。方法 胃癌(176例)、慢性萎缩性胃炎(41例)、不典型增生(15例)、肠上皮化生(27例)和正常对照组(10例)共269例,采用HE染色、S-P免疫酶标抗体组化染色法与图像分析技术相结合,观察胃粘膜中S-100$^+$,HLA-DR$^+$,CD4$^+$和CD8$^+$细胞数量、平均面积和平均吸光度的变化。结果 胃癌患者胃粘膜中S-100$^+$,HLA-DR$^+$细胞数量明显多于正常胃粘膜($P<0.05$);CD4$^+$细胞及其平均吸光度显著减少($P<0.01$);CD8$^+$细胞数量、面积及其平均吸光度略有减少,但与正常组比较差异不显著($P>0.05$);CD4$^+$/CD8$^+$比值为0.65,显著低于正常胃粘膜($P<0.01$)。慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生和不典型增生胃粘膜中S-100$^+$、HLA-DR$^+$细胞数量显著增加($P<0.01$);CD8$^+$细胞数量均明显高于正常胃粘膜($P<0.05$);CD4$^+$/CD8$^+$比值分别为0.81,0.59,0.56,均显著低于正常胃粘膜($P<0.05$)。结论 癌前状态胃粘膜中DC数量显著增多,功能增强;而胃癌患者胃粘膜中DC数量随分化程度的降低而减少。胃粘膜中DC细胞功能的抑制是导致胃粘膜免疫功能低下和癌前状态发生癌变的重要原因之一。

关键词:DC细胞;胃粘膜免疫;胃癌;癌前状态
中图法分类号:R322.44;R338.12;R392.11 文献标识码:A

Effects of dendritic cells on gastric mucosal immunity in human beings

LUO Zhi-bin, LU Rong, LUO Yuan-hui, JIN Hua-yuan, ZHANG Peng-bin, XU Cai-pu (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of dendritic cell (DC) on gastric mucosal immunity from expressions of S-100, HLA-DR, CD4 and CD8 in human gastric mucosa. Methods A total of 269 patients suffering from gastric cancer (GC, $n=176$), chronic atrophic gastritis (CAG, $n=41$), dysplasia (Dys, $n=15$) and intestinal metaplasia (IM, $n=27$), and 10 normal subjects were studied. The diagnosis of all the cases was verified with endoscopy and/or histopatholgical examination. The number, mean area and absorbance of S-100$^+$, HLA-DR$^+$, CD4$^+$ and CD8$^+$ cells were detected with HE and immunohistochemical (S-P method) staining and image analysis. Results The number of S-100$^+$ and HLA-DR$^+$ cells in gastric mucosa was significantly higher in patients with GC, CAG, Dys and IM than in normal control (0.6 ± 0.2/μm^2 and 0.9 ± 0.2/μm^2, 1.8 ± 0.3/μm^2 and 2.4 ± 0.6/μm^2, 2.2 ± 0.5/μm^2 and 2.8 ± 0.6/μm^2, 2.2 ± 0.6/μm^2 and 3.0 ± 0.8/μm^2, 0.2 ± 0.1/μm^2 and 0.5 ± 0.1/μm^2, respectively, $P<0.05$). The number of CD4$^+$ cells and the mean absorbance were markedly lower in GC (0.7 ± 0.2/μm^2) than in normal control (2.3 ± 0.4/μm^2) ($P<0.01$). The number of CD8$^+$ cells and their mean area and absorbance showed no obvious difference between GC and normal ($P>0.05$), but the number of CD8$^+$ cells was higher in CAG, Dys and IM than in normal, (1.8 ± 0.2/μm^2, 1.8 ± 0.2/μm^2, 1.9 ± 0.2/μm^2 and 1.2 ± 0.1/μm^2 respectively, $P<0.05$). The ratio of CD4/CD8 was lower in GC (0.65), CAG (0.81), IM (0.59), Dys (0.56) than in normal (1.94) ($P<0.05$). Conclusion The number of DC in gastric mucosa of precancerous lesions is increased and its function is enhanced, but they are positively correlated to the degree of differentiation in gastric cancer. Inhibited function of DC in gastric mucosa is one of important factors that lead to the decrease of gastric mucosa and the precancerous lesions to change into cancer.

Key words: dendritic cell; gastric mucosal immunity; gastric cancer; precancerous condition

作者简介:罗治彬(1968-),男,重庆市人,博士研究生,医师,主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究,发表论文17篇。电话:(023)68754124
收稿日期:1999-11-21;修回日期:2000-05-09
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

树突状细胞(Dendritic cells, DCs)是启动机体免疫应答的一组形态和功能特异的抗原提呈细胞(Antigen presenting cell, APC)。近来国外学者开始研究DC和肿瘤发生发展的关系,但对在胃粘膜尤其是在癌前状态(Precancerous conditions)中的DC研究甚少。本研究采用HE染色、S-P免疫酶标抗体组化染色法与图像分析技术相结合,观察胃癌、胃癌前状态和正常胃粘膜的免疫状况,探讨胃癌发生过程中胃粘膜免疫功能的变化及DC在其中所起的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1998年本科经胃镜和病理诊断明确病变者共269例,包括胃癌组(Gastric cancer, GC)176例(中高分化腺癌107例,低分化腺癌32例,未分化癌37例),慢性萎缩性胃炎组(Chronic atrophy gastritis, CAG)41例(中度萎缩性胃炎29例,重度萎缩性胃炎12例),不典型增生组(Dysplasia, Dys)15例,肠上皮化生组(Intestinal metaplasia, IM)27例和正常对照组(Normal, Nor)10例。

1.2 方法

HE染色:全部切片重新评价,确认原诊断无误。4 μm连续切片,分别作HE染色。

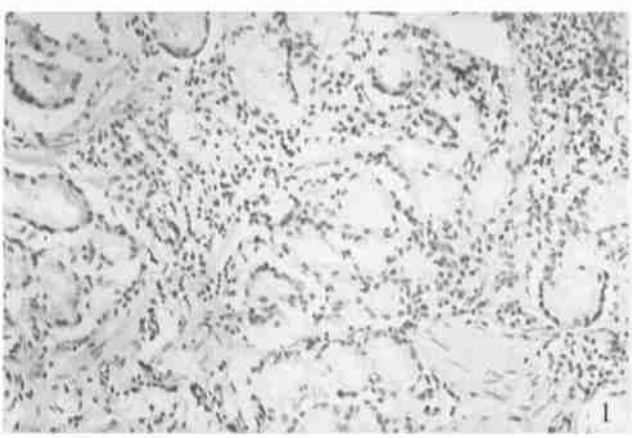
免疫组化染色法:用S-P法,抗人S-100、HLA-DR、CD4、CD8 mAb和S-P试剂盒为DAKO公司产品,用PBS替代一抗作空白对照。

结果判定:S-100$^+$染色位于细胞浆内,HLA-DR$^+$、CD4$^+$、CD8$^+$染色位于细胞膜上,阳性结果为棕黄色。染色结果用MD-20型图像分析仪(德国徕卡)测定粘膜层中阳性细胞数量(/μm^2)、平均光密度和平均面积(μm^2)。

统计学分析:采用第三军医大学数学教研室编制的数理统计程序包作方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

DC胞浆呈S-100$^+$反应,正常胃粘膜中仅见少量散在分布于间质中。CAG、IM、Dys胃粘膜中DC均成簇状分布,见图1。阳性细胞数量显著多于正常胃粘膜($P<0.01$),其平均面积明显大于正常组($P<0.05$),见表1。胃癌组织内有较多DC散在分布,见图2。数量明显多于正常组($P<0.05$),但随着分化程度的降低而有逐渐减少的趋势。各组S-100$^+$细胞计数、平均面积和平均光密度见表1。HLA-DR$^+$细胞分布、图像分析及统计结果与S-100$^+$细胞类似,见表2。



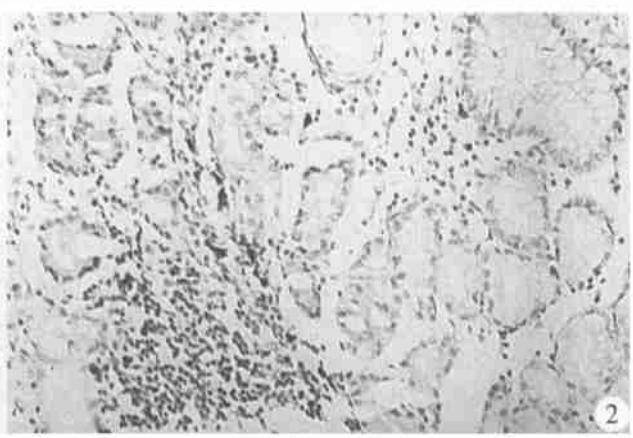


图1 胃粘膜腺体明显萎缩,数量减少,粘膜下层可见有较多淋巴细胞浸润。粘膜层及粘膜下间质中可见许多S-100蛋白阳性的DC细胞,簇状分布,胞浆呈棕黄色 (S-P× 200)

Fig 1 Submucosal glands atrophied and number decreased obviously, a lot of lymphocytes infiltrated in submucous layer and many S-100$^+$ positive dendritic cells with yellowish stained cytoplasm were found in mucous and submucosal stroma (S-P× 200)

图2 粘膜组织结构破坏,细胞核浆比例失调,淋巴细胞浸润较少,粘膜下腺体萎缩或消失。粘膜层及粘膜下层中可见极少数的S-100$^+$蛋白阳性的DC细胞,其胞浆呈棕黄色、部分呈印戒状 (S-P× 200)

Fig 2 The structure of mucosal tissues destroyed, the nuclear/cytoplasm proportion of the cells was imbalance and submucosal glands atrophied or disappeared. A few lymphocytes and S-100$^+$ positive dendritic cells with yellowish stained cytoplasm (partly singet-ring form) was found in the mucosal and submucosal layer (S-P× 200)

CD4$^+$细胞散在分布于胃粘膜固有层中,阳性产物主要呈现在细胞膜上。CAG、IM、Dys各组细胞数量均明显低于正常组($P<0.05$);而胃癌组细胞计数与平均光密度显著低于正常组($P<0.01$)。各组CD4$^+$细胞数量、平均面积及平均光密度见表3。

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

$CD8^+$ 细胞与 $CD4^+$ 细胞分布基本相同, CAG、IM、Dys 组 $CD8^+$ 细胞数均明显高于正常组($P<0.05$); 胃癌组稍低于正常组, 但差异不显著($P>0.05$)。各组 $CD4^+/CD8^+$ 比值分别为 Nor 1.94, CAG 0.81, IM 0.59, Dys 0.56, GC 0.65。$CD8^+$ 细胞计数、平均面积和平均光密度值见表 4。

表 1　各组胃粘膜 $S\text{-}100^+$ 细胞计数、平均面积和平均光密度变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of number, area and optical density of $S\text{-}100^+$ cell in different groups($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Number($/\mu m^2$)	Area(μm^2)	Optical density △
Nor	10	0.22±0.08	45.57± 8.96	1.20±0.15
CAG	41	1.79±0.32 **	67.59±11.38 *	1.87±0.17 *
IM	27	2.24±0.63 **	68.5 ±10.5 *	1.66±0.21 *
Dys	15	2.16±0.51 **	67. 48±15.20 *	1.63±0.19 *
GC	176	0.58±0.16 *	48.20±9.61	0.86±0.13 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Nor; △: Optical density (OD): IOD divided by area(OD= IOD÷ area)

表 2　各组胃粘膜 $HLA\text{-}DR^+$ 细胞计数、平均面积和平均光密度变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of number, area and optical density of $HLA\text{-}DR^+$ cell in different groups($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Number($/\mu m^2$)	Area(μm^2)	Optical density
Nor	10	0.46±0.13	45.74±15.80	1.22±0.10
CAG	41	2.37±0.62 **	66.42±10.56 *	1.48±0.09
IM	27	2.99±0.84 **	67.9±12.9 *	1.65±0.14 *
Dys	15	2.83±0.58 **	64.75±15.03 *	1.36±0.17
GC	176	0.92±0.16 *	40.11±17.35	0.97±0.12 *

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Nor

表 3　各组胃粘膜 $CD4^+$ 细胞计数、平均面积和平均光密度变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Change of number, area and optical density of $CD4^+$ cell in different group($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Number($/\mu m^2$)	Area(μm^2)	Optical density
Nor	10	2.27±0.38	66.41±14.43	1.14±0.08
CAG	41	1.44±0.21 *	39.80± 8.42	0.85±0.14
IM	27	1.12±0.16 *	42.51±12.77	0.88±0.10
Dys	15	1.03±0.12 *	40.26±11.45	0.96±0.18
GC	176	0.69±0.15 **	35.75±8.83 *	0.62±0.06 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Nor

表 4　各组胃粘膜 $CD8^+$ 细胞计数、平均面积和平均光密度变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Changes of number, area and optical density of $CD8^+$ cell in different group($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Number($/\mu m^2$)	Area(μm^2)	Optical density
Nor	10	1.17±0.12	68.65±16.24	1.25±0.13
CAG	41	1.78±0.19 *	65.72±13.55	1.54±0.20
IM	27	1.91±0.17 *	65.48±10.96	1.39±0.17
Dys	15	1.84±0.24 *	60.36± 8.62	1.30±0.12
GC	176	1.06±0.33	62.39±12.56	1.02±0.07

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Nor

3　讨论

DC 细胞主要源于骨髓, 表达 S-100、HLA-DR 等特异性标记。作为机体功能最强的 APC, 它不仅能提呈可溶性抗原, 还可处理和提呈颗粒性抗原, 并与 $CD4^+$ 细胞发生抗原依赖性聚集, 引发 T、B 细胞的增殖分化和一系列免疫反应。研究 DC 细胞数量和功能状态可一定程度反映机体免疫机能。

本研究发现胃癌组织中 $S\text{-}100^+$、$HLA\text{-}DR^+$ 细胞(即 DC 细胞)明显多于正常胃粘膜($P<0.05$); 慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生和不典型增生的胃粘膜中 $S\text{-}100^+$、$HLA\text{-}DR^+$ 细胞数量也显著多于正常胃粘膜($P<0.01$), 并且其平均面积也明显大于正常组($P<0.05$)。在慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生和不典型增生中 DC 显著增多, 这表明胃粘膜有活动性炎症反应, 是由于细胞免疫功能过盛所导致的粘膜免疫损伤。胃癌组织中 DC 数量虽多, 但由于缺乏 Th 的辅佐, 在肿瘤组织微环境中其功能难以发挥[1]; 随胃癌分化程度的降低, DC 数量有逐渐减少的趋势, 表明 DC 的数量和功能与肿瘤患者的预后可能有一定关系[2]。$S\text{-}100^+$、$HLA\text{-}DR^+$ 染色分析结果完全一致, 因此 HLA-DR 也和 S-100 一样, 可作为评价 DC 功能和判断肿瘤患者的预后的一个重要指标。

DC 的存活、成熟、分化及其功能的发挥都是由不同的信号途径来调控的[3]。正常情况下, DC 细胞功能正常, 当抗原入侵时成熟 Th 细胞在 DC 分泌的 IL-1[4] 作用下活化成为效应 Th 细胞, 然后 $CD4^+$ TD 细胞(迟发型 T 细胞)和 $CD8^+$ CTL 细胞在活化 Th 细胞分泌的 IL-2 作用下增殖分化, TD 细胞产生一系列淋巴因子、CTL 识别并杀伤自身或同基因靶细胞, 发挥细胞免疫功能; 同样 B 细胞也在活化 Th 细胞产生的 B 细胞生长因子(BCGF)和 B 细胞分化因子(BCDF)刺激下

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

成熟、增殖分化为浆细胞，靠产生抗体发挥体液免疫功能。因此 DC 细胞的数量及功能是影响 Th 细胞活化的关键，而 Th 的功能状态又直接关系到 CTL 和 B 细胞免疫应答的质量。我们的结果显示慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、不典型增生和胃癌胃粘膜中 $CD4^+$ 细胞绝对计数明显少于正常组（$P<0.05$），除胃癌组外其余各组 $CD8^+$ 细胞绝对计数则明显多于正常组（$P<0.05$），$CD4^+/CD8^+$ 比值显著低于正常组（$P<0.01$），且比值均发生倒置。在低分化胃癌中 DC、$CD4^+$ 细胞数量和平均面积减少、平均光密度降低，这表明由于 DC 细胞功能缺陷，$CD4^+$ Th 细胞功能不足，Th/Ts 比例失调，$CD4^+$ TD 细胞产生淋巴因子和 $CD8^+$ CTL 细胞的增殖活化受阻，导致细胞免疫功能严重低下，机体抗癌能力削弱[5]。因此胃粘膜中 DC 细胞功能的抑制是导致胃粘膜免疫功能低下的关键因素，也可能是癌前状态发生癌变的重要原因之一。

参考文献：

[1] Rissoan M C, Soumelis V, Kadowaki N, *et al*. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation[J]. Science, 1999, 283(5 405): 1 183—1 186.

[2] Ishigami S, Aikou T, Natsugoe S, *et al*. Prognostic value of HLA-DR expression and dendritic cell infiltration in gastric cancer [J]. Oncology, 1998, 55(1): 65—69.

[3] Rescigno M, Martino M, Sutherland C L, *et al*. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways[J]. J Exp Med, 1998, 188(11): 2 175—2 180.

[4] Caux C, Lin Y T, Bancherean J. Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells[J]. Immunol Today, 1995, 16(1): 2—7.

[5] Saito H, Tsujitani S, Kondo A, *et al*. Combined analysis of tumour neoangiogenesis and local immune response in advanced gastric carcinoma[J]. Oncol Rep, 1999, 6(2): 459—463.

（编辑　汪勤俭）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)08-0772-01

应用冷沉淀治疗褥疮的临床观察

Clinical observation on treating bedsore with cryoprecipitate

段慧玲，滕本秀，秦水春　（第三军医大学附属新桥医院输血科，重庆 400037）

近年来国内外十分重视冷沉淀的应用研究，但有关其促进褥疮愈合的实验研究却未见报道。我们应用冷沉淀治疗褥疮创面，取得了较好的效果，现报告如下。

1　对象与方法

1.1　冷沉淀的制备

采用改良融解法生产冷沉淀。于采血后 2 h 内经离心分浆（每 200 ml 血浆为 1 个制备单位），然后置—30 ℃以下速冻冰箱中冰冻保存，制备时取出放入 20～25 ℃水浴中融化，待尚存小冰块时，置 4 ℃以下 3 000 r/min 离心 15 min 后，移去上清血浆，最后剩余 20～30 ml 血浆与冷沉淀一起留于袋中。再分装成 5～10 ml/支的玻璃安瓿，立即冷冻保存(—40 ℃)，每单位含纤维结合蛋白(FN)50 mg，纤维蛋白原(Fig)225 mg。

1.2　治疗对象

并发褥疮患者 20 例，年龄 31～57 岁，按褥疮严重程度分期[1]，其中三期褥疮 16 例，四期褥疮 4 例，病程最短的 3 d，最长达 3 个月以上。三期患者均有浅表溃疡，表皮变黑，水泡形成，溃疡面有黄色渗出液，部份病例有感染，创面苍白并有脓液覆盖。四期患者坏死组织均侵入真皮下层到肌肉层，大量脓液，有臭味，坏死组织边缘呈黑色，其中两例深部组织坏死，骨膜暴露。20 例褥疮患者中有 16 例每日用庆大霉素或利福平进行局部换药，持续 3～15 d 疗效均不佳。

1.3　治疗方法

取出冷沉淀于 37 ℃水浴箱内融化，2 h 内应用。方法：用无菌生理盐水清洗创面，再用无菌干棉球沾干创面，然后将冷沉淀和庆大霉素的混合液均匀地喷洒于创面上，剩余的喷湿一层无菌纱布，将纱布敷于创面上，外层再敷干燥纱布，每日 1 次或 2 d 1 次，7 次为 1 疗程。

1.4　疗效判定标准

显效：感染明显被控制，分泌物、脓液明显减少，病灶明显缩小，每疗程溃疡愈合面积≥60%。有效：感染明显被控制，分泌物、脓液明显减少，病灶明显缩小，每疗程溃疡愈合面积≥20%。无效：上述症状无好转或加重。

作者简介：段慧玲(1964—)，女，云南省昆明市人，主管技师，主要从事输血质量控制方面的研究，发表论文 6 篇。电话：(023)68755114—74684

收稿日期：1999-10-20；修回日期：2000-04-11

（下转 775 页）

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