DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.021

文章编号:1000-5404(1999)10-0746-04

ITP患者自体脾移植再生脾免疫结构变化的临床研究

高德山* 马宏敏 蔡志民 (第三军医大学附属西南医院普通外科)重庆,400038

提 要 **目的**:探讨原发性血小板减少性紫癜(ITP)患者自体脾移植后再生脾的免疫结构变化及其对原发病的影响。**方法**:对12例ITP患者行脾切除自体脾移植术,术后6月活检再生脾组织,应用ABC免疫组化和图像分析,结合透射电镜对脾组织的形态结构、巨噬细胞和树突状细胞等主要免疫细胞成份进行观察。**结果**:再生脾具有与正常脾相似的形态结构,但滤泡面积及数目、生发中心数目、巨噬细胞和树突状细胞均显著少于移植前脾及正常脾;超微结构见再生脾浆细胞数及巨噬细胞吞噬现象均较移植前减少。**结论**:ITP患者自体移植再生脾具有部分免疫吞噬功能;再生脾免疫结构发生了重建,不会因脾再生而致原发病复发。

关键词 ITP;自体脾移植;再生脾;免疫结构

中图法分类号 R657.6+3;R392.4 **文献标识码**:A

为了减少血液病患者切脾后凶险性感染(Overwhelming postsplenectomy infection,OPSI)的发生率,已有人将自体脾移植术用于原发性血小板减少性紫癜(Idiopathic thrombocytopenic purpura,ITP)的临床治疗,并取得了满意疗效[1,2]。目前对血液病能否保脾仍有较大争议。再生脾有无免疫功能以及再生脾能否导致原发病复发是争议的焦点。本研究旨在应用免疫组化和图像分析,结合透射电镜,观察ITP患者自体脾移植前后脾组织形态结构、巨噬细胞、树突状细胞等主要免疫细胞成份的变化,初步探讨ITP自体移植再生脾免疫功能及其对原发病的影响。

1 材料和方法

1.1 临床资料

1.1.1 病例选择 ITP患者12例,男3例,女9例,年龄16~45岁,平均31岁。病程1~8年,平均6年。诊断及疗效标准依据张之南主编的《血液病诊断与疗效标准》。本组患者均经血液内科正规治疗3~6个月,疗效不佳或复发。另取12例正常外伤脾作对照。

1.1.2 手术过程 ITP患者均为择期手术,行常规脾切除术后,立即取新鲜脾组织约40 g,浸入冷生理盐水中,洗净血迹,切成1 cm×1 cm×0.5 cm大小脾组织共50余块备用。将大网膜分成左大右小2片并展平,左侧网膜内置脾块共50块,间距0.2 cm,双层包埋后置脾窝固定。右侧网膜内置脾组织3块,包埋后从切口拖出置皮下,便于术后活检,逐层关腹。术后6个月对移植脾组织行活检术,均获成功。

1.2 检测指标

1.2.1 脾组织免疫组化染色

1.2.1.1 试剂来源 试剂盒购自Vector Lab Inc(PK-4001,PK-4002),鼠抗人CD_{68}单克隆抗体及兔抗牛S-100蛋白抗体、DAB显色剂均为DAKO公司产品。

1.2.1.2 巨噬细胞测定 于术中及术后6月取脾组织液氮速冻保存,恒冷切片机在-20℃~-30℃下连续切片,厚5 μm,风干固定后按药盒说明书操作,常规ABC免疫组化染色。苏木素复染。系列酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.1.3 树突状细胞测定 将新鲜脾组织固定于Bouin's液,常规石蜡切片、脱蜡、水合及胰酶消化后,以兔抗牛S-100蛋白抗体(1∶50)为一抗,按ABC免疫组化染色法依次完成加样。

1.2.1.4 结果观察 光镜下细胞浆呈棕黄色者为阳性细胞,用PBS液代替一抗作阴性对照,细胞不着色。

1.2.2 图像分析 应用CMIAS 007真彩色医学图像系统(空军总医院生物医学工程研究所研制),测量脾组化标本内阳性细胞的数密度(目标总个数/统计场总面积)和面密度(目标总面积/统计场总面积)。

1.2.3 电镜观察 常规电镜制样,日立H-300型透射电镜观察。

1.3 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,经方差齐性检验后用单因素方差分析,Student's t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 临床疗效

所有病例术后均随访3~3.5年,除2例疗效稍差外,其余病例临床症状和骨髓象改善明显,有效率为83.3%。术前血小板计数为$(48.45\pm27.74)\times10^9$/L,术后3年为$(98.45\pm40.73)\times10^9$/L,相差显著($P<0.05$)。

2.2 组织形态特点

ITP患者脾脏(以下称ITP脾)与外伤脾相比,滤泡面积和生发中心数目均增加,但单位面积内滤泡数目未见增多。术后6月经核素扫描移植脾均显影良好,大体活检见再生脾块6月时比移植前略小,周围有纤维组织包绕形成假被膜,色暗红,脾块中央偶见致密结缔组织。光镜下见ITP再生脾白髓、红髓、边缘带可辨,与正常脾结构相似,但滤泡数目和面积均少于移植前脾和正常脾,生发中心少见,见图1。

2.3 巨噬细胞图像分析

ITP脾巨噬细胞数密度和面密度均显著高于正常脾($P<0.01$);再生脾巨噬细胞数密度和面密度显著低于ITP脾($P<0.01$),数密度也明显低于正常脾($P<0.05$),结果见表1。

* 高德山,男,33岁,副主任医师,硕士

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

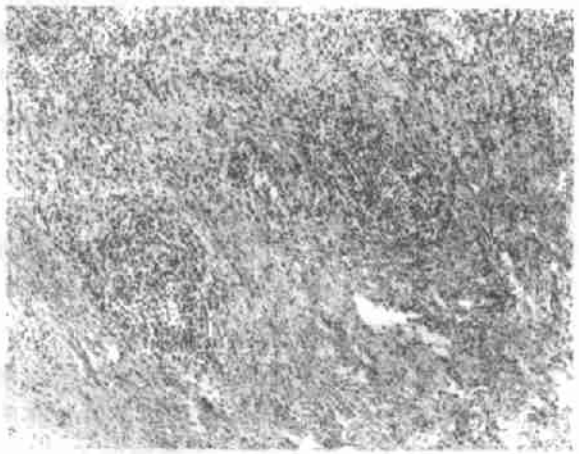


图 1　ITP 再生脾，滤泡面积和数目均较少，生发中心少见　(HE×100)

Fig 1　The area and the number of follicles markedly reduced, and only a few germinal centers (GC) could be found in the regenerated splenic tissue of ITP　(HE×100)

表 1　脾组织巨噬细胞图像分析($n=12$)

Tab 1　Image analysis of macrophages in splenic tissue

	Numeral density ($\times10^3/mm^2$)	Facial density(%)
Normal spleen	0.88±0.07	6.95±1.76
ITP spleen	1.83±0.08**	10.41±1.13**
ITP regenerated spleen	0.77±0.10*△△	5.45　±0.99△△

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* normal spleen；

△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* ITP spleen

2.4　树突状细胞的变化

正常外伤脾光镜下可见滤泡生发中心内有丰富的滤泡树突状细胞(Follicular dendritic cells，FDC)，突起细长、丰富，见图 2，周围有较大的淋巴细胞与之紧邻，动脉周围淋巴鞘(Periarterial lymphatic sheath，PALS)有散在的突起较短的交错突细胞(Interdigitating cells，IDC)；ITP 脾脏滤泡生发中心内 FDC 数目较正常脾明显减少，突起尚丰富，PALS 内 IDC 数目及突起均显著减少，见图 3。ITP 再生脾多数滤泡内缺乏 FDC，生发中心发育较好者可见少数 FDC，显著少于移植前和正常脾，突起明显变短、减少，见图 4，PALS 内未发现阳性细胞。

2.5　超微结构改变

ITP 脾脏的生发中心、边缘带和红髓索内有较多浆细胞，粗面内质网发达，分泌颗粒多见。巨噬细胞增多，表面突起丰富，胞浆内有大量次级溶酶体和其它细胞器，巨噬细胞吞噬现象及胞浆内髓鞘样结构易见，见图 5。ITP 再生脾 6 月时各种结构存在，各区域浆细胞明显减少，巨噬细胞胞体及突起较小，偶可见到吞噬现象。

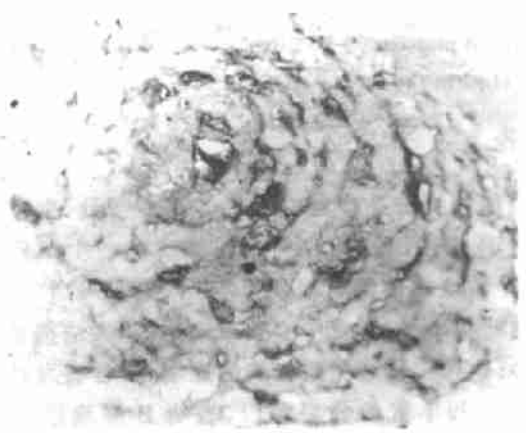
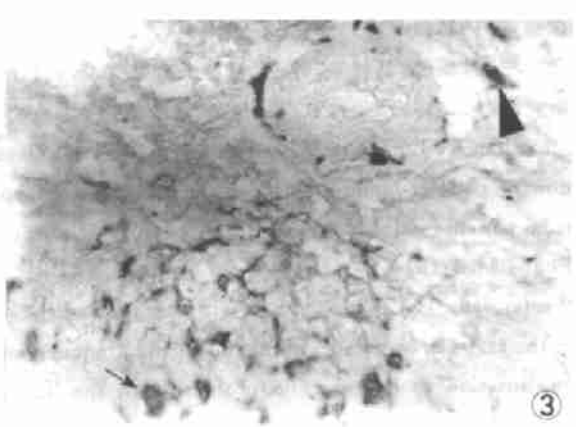
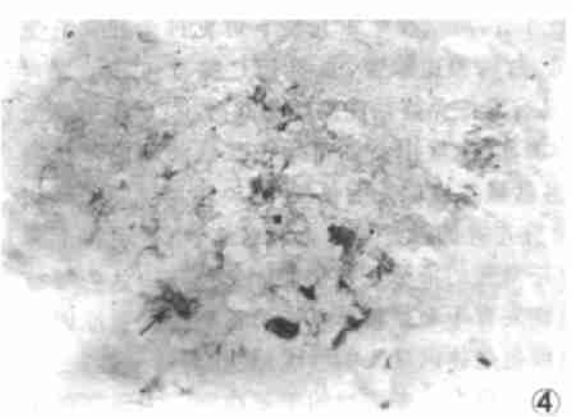


图 2　正常外伤脾 FDC 丰富，突起细长，连接成网　(ABC×400)

Fig 2　The follicular dendritic cells (FDC) were abundant and the projections slender in normal splenic tissue　(ABC×400)



③



④

图 3　ITP 脾 FDC(↑)明显减少，但突起尚丰富，IDC(▲)数目及突起均明显减少　(ABC×400)

Fig 3　FDC(↑) and IDC(▲) were all remarkably decreased but the projections of FDC were abundant in the splenic tissue of ITP　(ABC×400)

图 4　ITP 再生脾，FDC(↑)明显少于正常脾及 ITP 脾，突起较少　(ABC×400)

Fig 4　The number and projections of FDC (↑) were all less than ITP or normal splenic tissue obviously in the regenerated splenic tissue of ITP　(ABC×400)

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

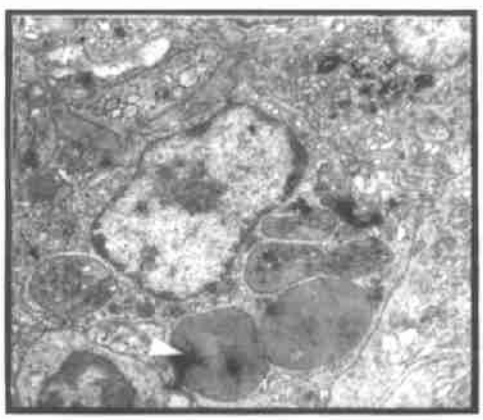


图5 ITP脾巨噬细胞胞浆内有吞噬的血小板(↑)和红细胞(△)以及大量次级溶酶体(Ly) (TEM×7 000)

Fig 5 The cytoplasm of macrophage contained some phagocytized platelets(↑), RBC(△) and secondary lysosomes (Ly) in the splenic tissue of ITP (TEM×7 000)

3 讨论

白髓是脾脏参与免疫反应的主要部分,生发中心是脾内B记忆细胞发育和浆细胞前体产生的重要场所,其产生抗体的能力很强。本研究发现ITP脾脏淋巴滤泡面积增大、生发中心数目增加,超微结构显示生发中心、边缘带和红髓浆细胞明显增多,含有发达的粗面内质网和丰富的分泌颗粒,表明B细胞区功能亢进,浆细胞合成和分泌免疫球蛋白,尤其是自身血小板抗体的功能亢进,证明了脾脏是产生抗自身血小板抗体的主要场所,与文献[3]报道一致。

动物实验表明,脾组织自体移植完全再生后具有与正常脾相似的结构[4]。本组ITP行脾切除自体脾移植术6个月后,活检脾组织光镜下可见再生脾具有完整的红髓、白髓和边缘带,表明ITP脾自体移植后再生良好,具有发挥免疫功能的结构基础。ITP再生脾滤泡数目及面积、生发中心数目均较移植前和正常脾明显减少,各区域浆细胞也明显减少,说明再生脾能够纠正ITP脾脏亢进的自身抗体合成状态,也表明再生脾只能恢复正常脾的部分免疫功能。Felle等[5]认为移植脾组织白髓发育不全是机体抵抗力低下的主要原因。

巨噬细胞是体内最大的吞噬细胞,清除变性、受损或衰老细胞是脾内巨噬细胞的重要功能。本研究测定ITP脾巨噬细胞数密度和面密度均显著高于正常脾,超微结构显示巨噬细胞吞噬功能活跃,胞浆内易见髓鞘样结构、次级溶酶体丰富,说明脾脏是被自身抗体致敏的血小板破坏的主要场所。研究表明,巨噬细胞抗原提呈及Ⅱ类抗原表达的偏差,在一定条件下可引起自身免疫性疾病。ITP脾内巨噬细胞增多,提呈错误抗原的机会增加,这可能是ITP脾脏产生自身血小板抗体的原因之一。动物实验表明,再生脾组织红髓吞噬能力较正常脾明显不足[6],ITP再生脾巨噬细胞数密度和面密度显著小于移植前,说明再生脾吞噬能力较移植前减弱;减少了血小板在脾脏破坏的机会。核素扫描及超微结构观察均证实再生脾有吞噬功能,但ITP再生脾巨噬细胞数比正常脾明显减少,说明再生脾虽有一定吞噬能力,但没有完全恢复到正常水平。

树突状细胞作为强有力的抗原提呈细胞以辅助T、B淋巴细胞的免疫功能,已被越来越多的研究所证实[7]。FDC主要辅助B细胞,IDC主要辅助T细胞。用免疫酶ABC法染色,证明S-100蛋白是人脾树突状细胞的可靠标志[8]。树突状细胞数量的增减或表面标记的改变,与肿瘤、变态反应及自身免疫性疾病的发生、发展有重要联系。ITP脾内FDC和IDC的明显减少,可能是ITP脾脏免疫功能紊乱的原因。再生脾FDC的明显减少和IDC的消失,说明其免疫功能仍未恢复正常状态。FDC是生发中心形成的重要微环境,再生脾6个月时FDC的减少可能是再生脾滤泡生发中心发育不良的原因。随着时间的延长,再生脾免疫结构能否发育更加完善,有待进一步研究。

综上所述,ITP自体移植再生脾的免疫结构发生了重建,不会因脾再生而导致原发病的复发;再生脾具有部分免疫吞噬功能,有助于提高机体抗感染能力。

参考文献

1 大呗秀树,若林芳久,広瀬俊,等.特发性血小板减少性紫斑病に对する脾摘后脾自体移植术に关する临床的检讨.临床血液,1989,30(11):1943

2 黄 宁,迟翠芳,葛林阜,等.自身脾片移植治疗ITP的临床研究.临床,1997,4(2):87

3 McMillan R, Longmire R L, Yelenosky R, *et al*. Quantitation of platelet-binding IgG produced *in vitro* by spleens from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med,1974,291(15):812

4 Westermann J, Pabst R. Autotransplantation of the spleen in the rat: Donor leukocytes of the splenic fragment survive implantation to migrate and proliferate in the host. Cell Tissue Res,1997,287(2):357

5 Felle P, Harding B. Differences between the histology of normal spleen and that of regenerated ectopically implanted splenic tissue. Eur Surg Res,1988,20(3):220

6 Clayer M T, Drew P A, Leong A S, *et al*. IgG-Mediated phagocytosis in regenerated splenic tissue. Clin Exp Im-

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

munol，1994，97(2)：242
7 De Smedt T，Pajak B，Muraille E，*et al*. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. J Exp Med，1996，184(4)：1413
8 Carbone A，Poletti A，Manconi R，*et al*. Demonstration of S-100 protein distribution in human lymphoid tissues by Avidin-Biotin Complex immunostaining method. Hum Pathol，1985，16(12)：1157

（收稿：1998-12-12；修回：1999-09-26）
（编辑　汪勤俭）

Clinical study of immunoarchitecture of regenerated tissue from autosplenic graft in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura

Gao Deshan，Ma Hongmin，Cai Zhimin（Department of General Surgery，Southwest Hospital，Third Military Medical University，Chongqing，400038）

Abstract　**Objective**：To study the immunoarchitecture of the regenerated tissue from the autosplenic graft in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and its effects on the original disorder. **Methods**：Splenic autograft was transplanted into the omental sac in 12 cases of ITP. In the 6th month after transplantation，biopsy specimen of the regenerated splenic tissue was collected. Macrophages and dendritic cells (DCs) of the splenic tissue were studied with avidin-biotin complex immunostaining and image analysis and its histomorphology examined with transmission electron microscopy (TEM). **Results**：In the spleen of ITP patients，an increase of the area of the follicles and the number of germinal centers (GCs) and macrophages and a decrease of DCs were found as compared with those of a normal spleen. In the regenerated splenic tissue，there was a morphological structure similar to that of a normal spleen but the area of follicles and the number of GCs，macrophages and DCs were significantly decreased as compared with those of the spleen before transplantation or a normal spleen. Ultrastructurally，the number of plasma cells and the frequency of phagocytosis of macrophages were markedly decreased as compared with those before transplantation. **Conclusion**：The regenerated splenic tissue from the autografts in cases of ITP possesses only a part of the immnue function of phagocytosis. The immunoarchitecture of the regenerated splenic tissue is reconstructed and cannot result in the relapse of ITP.

Key words　ITP；splenic autotransplantation；regenerated spleen；immunoarchitecture

（上接 745 页）

电镜观察：瘤细胞弥漫排列，有形成腺腔结构倾向。核不规则，胞浆宽，线粒体、游离核糖体丰富，高尔基器小，其它细胞器少。胞浆内可见到平滑肌样微丝束。瘤细胞突出的特征是细胞表面丰富密集的微绒毛，绒毛细长，弯曲，相互交错如蓬发状，绒毛基质均匀低电子密度，无丝心（中央无微丝束）。瘤细胞间偶见中间连接样连接。

3　讨论

一般局限性间皮瘤多呈乳头状或单个结节状生长于腹膜面，弥漫性间皮瘤多呈腹膜弥漫性增厚肿块。光镜下前者有乳头样、腺瘤样、纤维样等多种类型。后者有上皮样、纤维样或混合型以及一些特殊类型，往往与腺瘤、腺癌、平滑肌或神经源性肿瘤等难以鉴别。本例与上述间皮瘤不同，大体呈一堆结节在胃壁内生长，光镜下瘤细胞排列成一致小巢状，酷似合体细胞型脑膜瘤结构。组织学和免疫组化难以确诊。

虽然光镜下间皮瘤具多种组织学形态，但在电镜下都具有共同特征，如本例所见：瘤细胞表面丰富密集的微绒毛具有特征性诊断意义[1]。腺瘤的微绒毛短粗，有丝心，不弯曲，且排列疏密不一，另外细胞间桥粒和连接复合体可资鉴别。平滑肌肿瘤细胞表面有少量突起，无微绒毛，无细胞间连接，胞浆内有典型平滑肌微丝（密体和密斑）等特点可资鉴别。电镜是间皮瘤确诊的重要、甚至必要的手段。

本瘤大体有坏死，肝有转移结节，瘤细胞浸润性生长，核有异型性和分裂像，具有恶性特征。对恶性间皮瘤治疗，外科、放疗、化疗等手段均未取得良好疗效。近年，分子生物学研究发现人间皮瘤并不具有肿瘤性突变基因，如 P-53[2]，而在该瘤基因中具有 SV-40(Simian Virus-40)病毒 DNA 序列，为基因诊断、基因治疗和免疫治疗提供了有力依据。目前已用于临床实践，并取得良好效果。

关键词　胃肿瘤；恶性间皮瘤
中图法分类号　R735.2　　**文献标识码**：B

参考文献

1 Oury T D，Hamar S P，Roggli V L. Ultrastructural features of diffuse malignant mesotheliomas. Human Pathol，1998，29(12)：1382
2 Mor O，Yaron P，Huszar M，*et al*. Absence of P53 mutations in malignant mesotheliomas. Am J Respir Cell Mol Biol，1997，16(1)：9
3 Procopio A，Strizzi L，Giuffrida A，*et al*. Human malignant mesothelioma of the pleura：New perspectives for diagnosis and therapy. Monaldi Arch Chest Dis，1998，53(2)：241

（收稿：1999-05-10；修回：1999-07-15）
（编辑　汪勤俭）

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