DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.01.006

斑秃免疫病理初步观察

张景政 刘荣卿 唐书谦 钟白玉 (西南医院 皮肤科)

提 要 本文用McAb-ABC法和直接免疫荧光法观察了42例斑秃患者头皮中的郎格罕氏细胞、T细胞亚群及直接免疫荧光改变。斑秃各期表皮中的$OKT6^+$细胞和Ia 细胞无明显差别。多数病人毛球中可见LC,其中活动期最多见。斑秃毛囊中的LC变化主要是$T6^+$ Ia 的LC增多,Tb^+ Ia的LC增多不显著。毛囊周围的浸润细胞主要是$T(OKT_3^+)$细胞。活动期T_4 细胞及T4/T8比值均高于静止期及恢复期。DIF检查见患者中88%有C_3、IgG及IgM沉积 。本文结果提示,斑秃可能是由细胞免疫和体液免疫共同参与的免疫性疾病。

关键词 斑秃;Langerhans细胞;T淋巴细胞;荧光抗体技术

斑秃是一种常见的、病因不明的皮肤病,遗传、内分泌紊乱、自身免疫、感染、精神紧张、营养障碍等因素先后被认为与本病的发生有关[1],目前多倾向免疫机能的异常在本病的发病机制中起重要作用。近年来人们在这方面做了不少工作,但斑秃的免疫病理研究报告较少,结果也不一致。为了进一步探讨斑秃与免疫的关系,本文做了斑秃皮损中的郎格罕氏细胞(LC)、T淋巴细胞亚群及直接免疫荧光(DIF)观察,现将结果报告如下。

一、材料和方法

一、观察对象分组及标本采取

1. 斑秃患者共42例,年龄14～52岁,平均33.5岁,男37例,女5例。根据病情分为3组:(1)、活动期16例;(2)、静止期13例;(3)、恢复期13例。所有病例均有典型的斑秃临床表现,并做组织病理检查证实诊断。

2. 分期标准:(1)、活动期:仍有新脱发区出现,脱发区边缘毛发可轻轻拔掉。(2)、静止期:无新脱发区出现1个月以上,脱发区边缘毛发不易拔掉,尚无明显毳毛生长。(3)、恢复期:静止期基础上已有明显毳毛或新发生长。

3. 正常对照组14例,头部良性病变(皮内痣、皮脂腺痣、疣状痣等)活检时得到的正常头皮。男8例,女6例,平均年龄32.3岁。

4. 标本采取:局麻下刀切法取材,标本分为两部分:(1)Bouin氏液固定,用于常规组织病理检查。(2)、保存于液氮中,用于免疫病理检查。

二、主要试剂

1. 单克隆抗体(McAb)

种 类	识 别	提供单位
HLA-Dr	B细胞活化T、单核细胞、LC等	军事医学科学院基础所
类OKT6	LC	中国医学科学院血液病所
类OKT3	全部T细胞	武汉生物制品研究所
类OKT4	辅助/诱导T细胞	同 上
类OKT8	抑制/杀伤T细胞	同 上
类OKB7	B细胞	同 上

2. ABC试剂盒:美国Vector产品。

3. 荧光抗体:FITC标记的羊抗人IgG、IgM、C_3(工作浓度1:4～1:10),上海长征医院免疫室产品。

三、方法和步骤

1. 表皮辅片:(1)、皮肤标本置EDTA缓冲液中孵育(37℃)2.5h,将表皮与真皮分离;(2)、表皮片置冷丙酮中固定15 min;(3)、PBS(0.01mol,pH7.4)浸洗1h;(4)、分别置于McAb类OKT6和HLA-Dr(工作浓度均为1:40)中,4℃冰箱孵育过夜;(5)、PBS浸洗10 min×3次,(6)加入生物素化马抗鼠抗体(1:240),37℃孵育1h;(7)、PBS洗10min×3次;(8)、加入ABC复合物(1:120),37℃1h;(9)、PBS洗10min×3次;(10)、DAB显色;(11)、脱水、透明、封片。

2. 皮肤切片:(1)皮肤标本切成厚度为5μ的连续冰冻切片,室温风干;(2)、冷丙酮固定10min;(3)、PBS洗10min×2;(4)、分别加HLA-Dr、类OKT6(1:80)、类OKT3、类OKT4、类OKT8、类OKB_7(均

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为1:200),4℃冰箱过夜;(5)、此后同辅片[5]~[10]步骤;(6)、苏木素复染;(7)、脱水、透明、封片。

3. DIF染色:(1)、冰冻切片制备同上;(2)、风干后PBS浸洗10min;(3)、分别加前述4种荧光抗体,湿盒内37℃孵育30min;(4)、PBS 5min×3,蒸馏水冲洗;(5)、风干,缓冲甘油封片,荧光显微镜观察。

三、观察

1.LC: 1)、必须有细胞体;(2)、至少有一条树突。辅片以方格式目镜测微器计数,计算出每平方毫米染色阳性LC的平均密度。切片计数一较完整毛囊的表皮细胞的阳性细胞数,以百分率表示。

2.T淋巴细胞:细胞膜上有棕黄色颗粒状沉淀物呈环状者为阳性细胞。计数毛囊周围的淋巴细胞400个,阳性细胞以百分率表示。

3. DIF:观察毛囊内及毛囊周围有无颗粒状及团块状荧光物质沉积。

二、结　果

一、表皮(辅片)及毛囊(切片)中的LC分别以类OKT6和HLA-Dr识别,结果见表1。

表1　$\bar{x}\pm SD$

	例数	表皮(辅片)/mm²		毛囊(切片%)	
		OKT6	HLA-Dr	OKT6	HLA-Dr
活动期	16	703.8±141.7	686.9±153.6	4.8±1.9	3.3±1.3
P		>0.05	>0.05	<0.01	>0.05
静止期	13	724.2±124.4	710±111.6	4.2±2.3	3.3±2
P		>0.05	>0.05	<0.01	>0.05
恢复期	13	626.9±89	652.3±92.2	2.8±0.9	2.1±0.7
P		>0.05	>0.05	>0.05	>0
患　者	42	685.4±123.9	682.7±113.4	4.0±1.9	2.6±0.9
P		>0.05	>0.05	<0.001	>0.05
对照组	14	683.1±78.3	672.3±73.3	2.7±0.9	2.5±1.1

P值均为该观察组与正常对照组比所得的值

毛球部可见LC者,活动期为13/16,静止期为7/13,恢复期为4/13,对照组为1/14,类OKT6和HLA-Dr检测结果基本一致(图1)。

二、毛囊周围的浸润细胞分别以T3、T4、T8、HLA-Dr及类OKB7识别,结果见表2。浸润细胞中仅见个别B细胞。

表2　$\bar{x}\pm SD$

	OKT3	OKT4	OKT8	T4/T8	HLA-Dr
活动期	69.7±7.2	49.4±8.2	26.1±7	2.1±0.8	69.1±11.4
静止期	67±7	40.9±6.2	29.3±5.6	1.5±0.5	60.5±18.4
恢复期	62.6±6.6	40.8±5.8	31.9±6.9	1.3±0.2	61.2±11.2

毛囊内也可见淋巴细胞浸入,其中以$OKT3^+$和$OKT8^+$细胞较多见,OKT4细胞较少,检出率分别为27/42、21/42、5/42、。经统计学检验,前二者差异不显著,后二者有明显差异,$P<0.001$(图2)。

三、DIF检查可见37例斑秃患者毛囊周围及毛囊内有荧光物质存在,多位于毛囊下部(图3、4)。14例对照者仅1例阳性。沉积物主要为C_3(36/42),其次为IgG(20/42),IgM(4/42),IgA均为阳性。

三、讨　论

一、LC是表皮中的一种树突细胞,具有提呈抗原,参与免疫性反应的功能,被视为表皮内的巨噬细胞。免疫性或与免疫有关的皮肤病常有LC的改变[4]。有人认为LC也同巨噬细胞一样,有Ia^+(相当于HLA—Dr抗原)及Ia 的不同亚群[13]。本文用类OKT6和HLA—Dr两种McAb识别LC,在表皮中(铺片),各组与对照组以及患病组与对照组之间,两种抗体所识别的LC均无明显差异,而且与文献报告的正常头皮的LC密度(693 ± 69.56)[2]基本一致。这表明,正常头皮内的LC可同时被OKT6和HLA—Dr两种McAb识别,在斑秃时,表皮内的LC数量和Ia抗原性没有明显改变。

正常毛囊中的LC通常集中于毛囊上部,主要在漏斗部,皮脂腺开口以下的毛囊中,LC稀少,毛球部则通常无LC。我们在14例正常人的毛囊中,仅一例在一个毛球部见有LC,而在斑秃患者中大部分可见毛球部有LC(24/42),两种McAb的检查结果基本一致。其中活动期最多见(13/16),静止期次之(7/13),恢复期最少(4/13)。统计学处理,活动期与静止期均比对照组显著增多,恢复期与对照组无显著差异。这提示毛球内LC存在与病情的活动程度有一定关系,随着病情的稳定、恢复,毛球内的LC逐渐减少乃至消失。

文献报告[5],斑秃毛囊中的$OKT6^+$细胞在活动期比正常对照组增多,而稳定期与正常对照组无显著差异。但也有报告斑秃的IC无变化。我们的结果与前者相似,斑秃患者毛

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

囊中的 $OKT6^+$ 细胞显著高于对照组。我们将斑秃患者分为活动、静止、恢复 3 期，由于疾病的发展是逐渐演变的，这种分期只是粗略的、相对的。与对照组相比，活动期及静止期的 $T6^-$ 细胞均增多，恢复期与对照组无显著差异。从检查结果看，3 期的 LC 是逐渐减少的，这与病情逐渐变化的过程是一致的。以 HLA－Dr 识别毛囊中的 LC，患病组与对照组无显著差异。这表明，斑秃毛囊中 LC 的变化主要是 $T6^+Ia^-$ 的 LC 增多，而 $T6^+Ia$ 的 LC 增多不显著，此点尚未见有类似文献报告。这或许可以提示 LC 有 $T6^+Ia^-$ 及 $T6^+Ia^+$ 两个亚群，与斑秃发病有关的主要是 $T6^+Ia^-$ 的 LC。关于这两种 LC 的性质及相互关系，尚有待进一步探讨。

二、斑秃毛囊周围常有以淋巴细胞为主的炎细胞浸润，尤以活动期为著。这说明细胞免疫可能与本病的发病机制有一定关系。浸润细胞多位于毛囊下部，主要是 T 淋巴细胞（$T3^+$ 细胞），其中又以辅助 T 细胞（$T4^+$）为主。活动期的 $T4^+$ 细胞及 T4/T8 比值均显著高于静止期及恢复期（对照组因浸润细胞很少，未计数）。侵入毛囊的细胞主要是 $OKT3^+$ 和 $OKT8^+$ 细胞，此结果与以前的报告相似[5]。大多数浸润细胞 HLA－Dr 阳性，提示浸润的 T 细胞多处于激活状态。

三、斑秃的直接免疫荧光观察，以往报告是矛盾的，有报告阳性率为 92%（11/12）[6]，也有报告为阴性[7,8,9]。本组斑秃患者中阳性率为 88%（37/42），与前者报告的结果相近。斑秃的毛囊周围及毛囊内有 C_3 和免疫球蛋白沉积，提示有免疫复合物存在，而且持续时间较长，不随病情的静止及恢复而很快消失。

本文结果表明，斑秃的发病，既有细胞免疫（LC、T 淋巴细胞），也有体液免疫（C_3、Ig）的参与。斑秃可能是由某些因素诱发的、有细胞免疫和体液免疫共同参与的免疫性疾病。

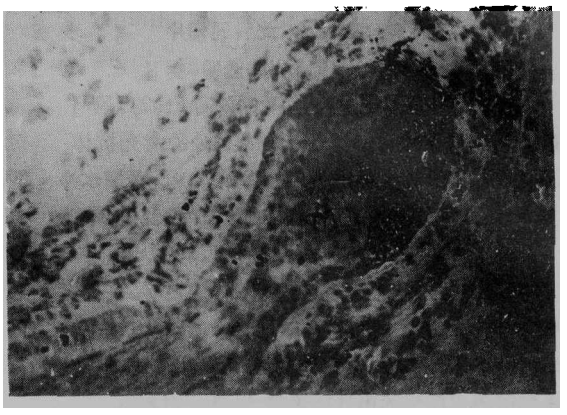


图 1 毛球 Lc（OKT6⁺）



图 2 毛囊周围及毛囊内 T 细胞（OKT3⁺）



图 3 毛囊下方团块状荧光沉积（IgG）

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

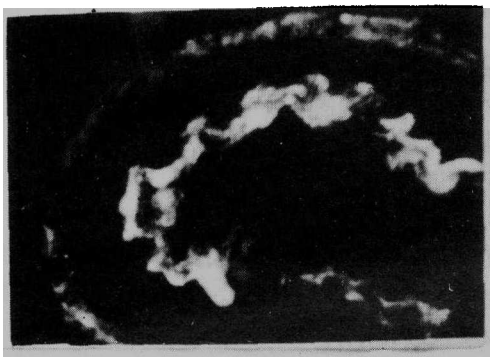


图 4 毛囊内根鞘荧光物质沉积(C_3)

参 考 文 献

1. 丁明伟, 等译。免疫皮肤病学。 中华医学会安徽皮肤科学会, 1985: 249
2. 陈洪铎, 等。 中华皮肤科杂志 1985; 18(4): 213
3. Ranki A, et al. J Invest Dermatol 1984; 83: 7 ~ 11
4. Wolff K, et al. J Invest Dermatol 1983; 80: 17s ~ 21s
5. Kohchiyama A, et al. Dermatologica 1985; 171: 327 ~ 331
6. Bystryn JC, et al. J Invest Dermatol 1979; 3: 31 ~ 320
7. Muller HK, et al Br J Dermatol 1980; 102: 609
8. Cochran REI, et al. Br J Dermatol 1976; 95: 61
9. Betterle C, et al. Arch Dermatol 1975; 111: 927
10. Friedmann PS. Br J Dermatol 1981; 105: 153 ~ 157
11. Galbraith GMP, et al. Br J Dermatol 1984; 110: 163 ~ 170
12. Zauli D, et al. Dermatologica 1985; 171: 12 ~ 15
13. Harnst TJ, et al. J Invest Dermatol 1983; 80: 100

(收稿: 1988. 3. 4; 修回: 1988.11. 20)

Preliminary immunopathological study in alopecia areata

Zhang Jing zhen, et al

(*The Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical College*)

Studies of the scalps from 42 patients with alopecia areata are given, using direct immunofluorescence (DIF). Langerhans cells (LC) and T-lymphocyte subsets are observed. There is no significant difference between the number of $OKT6^+$ cells and Ia^+ cells in the epidermis of all groups and the control. LC is seen in hair-bulb in many patients and most frequently in active stage. The main change of LC in hair follicle is increasing of $T6^+Ia^-$ cells, not significant of $T6^+Ia^+$ cells. Most of the infiltrates around the hair follicles are T($OKT3^+$) cells. $T4^+$ cells number and T4/T8 ratio in active are larger than in resting and recovering stages. DIF shows 88% of the patients having deposits of C_3, IgG, and IgM. This suggests that alopecia areata may be the disorder of immnue associated with cellular and humoral immunity.

Key words Alopecia areata/IM; Langerhans cells/UL; T-lymphocytes; Fluorescent antibody technic

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net