

• 论著 •

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

陆江阳 李志宏 王晓虹 杨毅 李玲

【摘要】 目的 探讨脾脏树突状细胞(DCs)在多器官功能障碍综合征(MODS)外周免疫器官损伤中的病理过程和作用机制。方法 复制小鼠 MODS 动物模型,采用光镜、电镜、免疫组化(CD205、CD86)与末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶缺刻标记技术(TUNEL)等方法观察脾脏病理学及其 DCs 在 MODS 病程中的动态变化。结果 实验早期(3 h),DCs 显著增生且功能活跃,伴大量淋巴细胞凋亡,外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值下降;晚期(10~12 d)大量 DCs 失活,脾脏各种免疫细胞退变、凋亡,外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值显著下降。结论 脾脏 DCs 数量和活性的变化在 MODS 小鼠建立外周免疫应答和维持机体免疫平衡过程中具有重要作用。

【关键词】 多器官功能障碍综合征; 树突状细胞; 脾脏; 免疫组化方法; 病理学观察

Changes in spleen dendritic cells in multiple organ dysfunction syndrome in mice LU Jiang - yang, LI Zhi - hong, WANG Xiao - hong, YANG Yi, LI Ling. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA (Formerly 304 th Hospital), Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To explore the pathological features of the splenic dendritic cells (DCs) and their role in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Methods** The MODS model of mice was reproduced. The changes in DCs in the spleen in mice with MODS were studied using light microscope, electronic microscope, immunohistochemistry (CD205, CD86) and transferase mediated dUTP - biotin nick end labeling (TUNEL). **Results** In the early stage (3 hours), there was hyperplasia with increased activity of DCs in the spleen, accompanied by apoptosis of a large number of lymphocytes. CD4⁺/CD8⁺ ratio declined in the peripheral blood. In the MODS stage (10 - 12 days), the number of DCs increased but with declined function. CD4⁺/CD8⁺ ratio declined markedly in peripheral blood. **Conclusion** During the course of MODS, changes in the number and activity of DCs in spleen are very important in the establishment of immune response and maintenance of immune function.

【Key words】 multiple organ dysfunction syndrome; dendritic cell; spleen; immunohistochemical method; pathological observation

多器官功能障碍综合征(MODS)是创伤感染后最严重的并发症,其发病率高,预后差。一般认为 MODS 的发病机制是原发致病因素过度激活效应细胞,引起全身性炎症反应失控而导致多个脏器系统的严重损伤^[1,2]。而炎症反应的发生、发展与转归又受到免疫系统的调节和制约。所以,有关 MODS 免疫学机制的研究已引起了国内外研究者的极大关注^[3-7]。树突状细胞(DCs)是近年来被认识到的一种极其重要的免疫辅助细胞,其在启动免疫应答反应与调控细胞免疫功能方面具有不容替代的作用^[8-10]。我们以往的研究表明,DCs 参与了 MODS 免疫系统损伤的启动机制,是引发免疫功能紊乱和免疫抑制的重要始动因素^[11,12]。在此基础上,拟进一步研究脾脏中 DCs 的病变特点与意义,探讨 DCs

在 MODS 外周免疫器官损伤中的病理过程和作用机制,为 MODS 免疫功能障碍的基础研究和临床防治提供新的病理学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组: 雄性 C57BL/6 小鼠 180 只,6~8 周,体重 20~25 g,购自军事医学科学院实验动物中心,按随机数字表法分为正常对照组和实验组。正常对照组 20 只,常规喂养。实验组按不同时间又分为伤后 3 h、12~48 h、5~7 d 与 10~12 d 组,每组有效检测与活杀取材的小鼠均为 20 只。

1.2 动物模型制备: 参考文献[13,14]方法。酵母多糖粉剂(Sigma 公司)1 g,医用液体石蜡油 40 ml,高频磁力搅拌器 1.5 h 混匀,制成 25 g/L 的酵母多糖悬浊液,100 °C 水浴中消毒 80 min,冷却至室温待用,使用前新鲜制备,并加热至 40 °C。实验组小鼠腹部皮肤局部常规消毒后,腹腔注射 1 mg/g 酵母多糖悬浊液,于相应时间点活杀取材;正常对照组于实验后 3 h 取材。

基金项目:全军“十五”医学科研项目基金资助(01MA210)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)病理科

作者简介:陆江阳(1957-),男(汉族),江苏人,博士研究生导师,主任医师(E-mail:lujiy@263.net)。

1.3 检测项目及方法

1.3.1 组织病理学观察:取脾脏组织用体积分数为 4% 的甲醛固定,常规石蜡制片,苏木素-伊红(HE)染色,普通光镜下观察病理变化。取脾脏组织,切成直径约 1 mm 的块状,用体积分数为 3.1% 的戊二醛溶液固定,常规超薄制片,醋酸铀-枸橼酸铅双重染色, JEM-1200EX 型透射电镜观察。

1.3.2 免疫组化标记:取各组脾脏组织, OCT 包被,液氮冻冻,恒冷切片机制片,片厚 3~4 μm ,冰丙酮固定。大鼠抗小鼠 CD205 多克隆抗体(多抗, Serotec 公司)标记用间接酶标法, 1:10, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗为辣根酶标记山羊抗大鼠免疫球蛋白 IgG; 兔抗小鼠 CD86 多抗(Santa Cruz 公司)标记用 Power Vision 二步法, 1:100, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。两种标记方法均用 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染。阴性对照组用抗体稀释液代替一抗,其余步骤相同。在每张切片的脾脏白髓边缘区随机选取 10 个高倍视野,计数阳性细胞数与细胞总数,两者相除得阳性细胞率(%)。

1.3.3 细胞凋亡的原位检测:采用末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶缺刻标记技术(TUNEL),用末端脱氧核糖核酸转移酶标记凋亡细胞 DNA 链断端 3'末端核苷酸,行凋亡细胞原位检测。取各组脾脏组织,恒冷切片机制片。按原位细胞凋亡检测试剂盒(Boehringer Mannheim 公司)提供方法进行杂交检测。阳性细胞计数方法同上。

1.3.4 外周血 T 细胞亚群检测:每组小鼠摘眼球采外周血 100 μl ,标记抗体为大鼠抗小鼠异硫氰酸荧光素(FITC)-CD4 和藻红蛋白(PE)-CD8(BD 公司)。在流式细胞仪上用射门法观察和计数 CD4 与 CD8 标记阳性 T 细胞数,计算 CD4/CD8 阳性细胞比值($\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$)。

1.4 统计学分析:数据处理用 Stata7.0 版统计分析软件,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 普通光镜观察

2.1.1 正常对照组:小鼠脾脏组织结构清晰,小梁清楚;白髓内含大量淋巴小结;动脉周围淋巴鞘中淋巴细胞丰富;白髓与红髓交界的边缘区淋巴细胞分布略稀疏,其中可见一些散在分布的大多角形 DCs,细胞体积较大,呈不规则形,表面有树枝状突起,胞浆丰富、淡染,胞核形状略长,表面凹陷(彩色插页图 1A)。这类大多角形 DCs 在白髓与红髓脾索中亦见

少量分布,在淋巴滤泡生发中心则聚集成巢。

2.1.2 实验组 3 h:白髓面积增大,淋巴细胞密集、丰富,脾小体增生,滤泡生发中心扩大;边缘带增宽,淋巴细胞数目增多;白髓边缘区、淋巴滤泡和脾索内大多角形 DCs 数目明显增加,且体积增大(彩色插页图 1B);脾窦扩张、充血。

2.1.3 实验组 12~48 h:白髓面积缩小,淋巴细胞稀少,边缘区缩窄,脾小体数目减少;某些动脉周围淋巴鞘内淋巴细胞消散,红、白髓界限不清;白髓、动脉周围淋巴鞘和脾索内出现大片凋亡细胞,表现为体积减小,核浓集、固缩;动脉周围淋巴鞘和脾索内 DCs 增生仍明显;红髓内中性粒细胞浸润增多。

2.1.4 实验组 5~7 d:白髓萎缩,淋巴细胞稀疏,脾小体数目减少;白髓边缘区和脾索内的 DCs 数目较 12~48 h 明显减少,仍可见凋亡的淋巴细胞。

2.1.5 实验组 10~12 d:白髓明显萎缩或伴动脉周围淋巴鞘的淋巴细胞消散,脾小体稀少且滤泡生发中心不明显;白髓与红髓的分界不清,可见到大量弥散分布的大多角形 DCs(彩色插页图 1C),其数量较 5~7 d 明显增多,易见小灶淋巴细胞凋亡现象,多伴有中性粒细胞浸润,少数可见出血灶。

2.2 透射电镜观察

2.2.1 正常对照组:在动脉周围淋巴鞘、边缘区、淋巴滤泡生发中心及脾索可见 DCs,其细胞体积大,形状不规则,多呈细长形,表面形成数个突起并向周围淋巴细胞间隙延伸,胞质电子密度较低,细胞器不发达,可见游离核糖体和线粒体,胞核外形不规则,表面可见凹陷,染色质淡而疏松,异染色质沿核膜分布,可见核仁(彩色插页图 2A)。DCs 周围多见淋巴细胞围绕,其中可见细胞凋亡现象。

2.2.2 实验组 3 h:DCs 明显增多,细胞体积增大,形状更加不规则,细胞表面的指状突起较长且增多,胞核异染色质增粗,胞浆细胞器增多(彩色插页图 2B);部分 DCs 细胞线粒体明显增生,伴空泡变性;DCs 周围凋亡淋巴细胞增多,细胞体积变小,表面微绒毛消失,细胞核核膜完整,核仁崩解,染色质边集;少数淋巴细胞核崩解、破碎,核碎片和胞浆成分形成凋亡小体;巨噬细胞体积增大,吞噬功能活跃。

2.2.3 实验组 12~48 h:DCs 仍处于增生状态,数目较多,功能较活跃;部分 DCs 呈空泡变性及溶解改变,一些 DCs 呈凋亡和早期凋亡改变;增生 DCs 体积增大,呈多角形,胞体和胞突与周围淋巴细胞密切接触,淋巴细胞大片凋亡及凋亡小体形成(彩色插页图 2C),多见巨噬细胞吞噬凋亡淋巴细胞及凋亡

小体;部分淋巴细胞线粒体肿胀肥大,局部空泡化,嵴排列紊乱,内质网扩张;红髓及脾索内巨噬细胞吞噬凋亡淋巴细胞,尚见较多中性粒细胞浸润。

2.2.4 实验组 5~7 d:DCs 明显减少,胞体较小,功能相对静止,凋亡淋巴细胞和凋亡小体减少。

2.2.5 实验组 10~12 d:DCs 再次增生(彩色插页图 2D),但与 3 h 相比,胞体相对较小,胞浆窄,细胞突起也少且变短,胞质内细胞器含量减少;较多的 DCs 呈现核质凝集呈均质浓染的凋亡变性及破碎溶解现象(彩色插页图 2E),DCs 周围见大量凋亡淋巴细胞和凋亡小体,多见巨噬细胞吞噬凋亡细胞及凋亡小体。

2.3 细胞凋亡的原位检测:正常对照组小鼠脾脏白髓和红髓中可见少量单个散在分布的 TUNEL 阳性细胞,细胞核与凋亡小体呈深棕色(彩色插页图 3A)。实验组 3 h 白髓和红髓中有散在分布小片状 TUNEL 阳性细胞;12~48 h 白髓和红髓中的凋亡细胞数目明显增加,呈大片、灶状或巢状分布(彩色插页图 3B);5~7 d 凋亡细胞较 12~48 h 减少,略多于正常对照组;10~12 d 凋亡细胞再次增加,白髓和红髓中见大量 TUNEL 标记阳性的凋亡细胞(彩色插页图 3C)。各组凋亡细胞数比较见图 4。

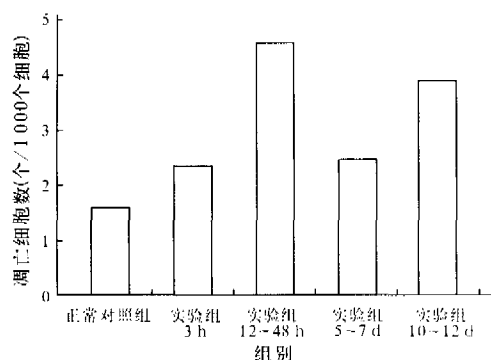


图 4 各组脾脏细胞凋亡的变化
Figure 4 Changes of cell apoptosis in mice spleen of each group

2.4 免疫组化标记脾脏 DCs 含量见表 1。

表 1 免疫组化标记脾脏 DCs 含量变化($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 1 Changes of content of immunohistochemical labeling DCs ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	CD205 标记 DCs(%)	CD86 标记 DCs(%)
正常对照组	1.78 ± 0.32	1.28 ± 0.35
实验组 3 h	4.61 ± 0.59**	4.26 ± 1.05**
12~48 h	2.72 ± 0.28*	2.09 ± 0.41
5~7 d	2.35 ± 0.22	1.75 ± 0.33
10~12 d	3.59 ± 0.46*△	2.12 ± 0.42

注:与正常对照组比较;* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与实验组 5~7 d 比较;△ $P < 0.05$

2.4.1 CD205 标记:正常对照组小鼠脾脏白髓、边缘区及脾索内可见少量散在分布的 CD205 阳性 DCs,细胞形状不规则,胞膜及部分胞浆呈深棕色阳性染色(彩色插页图 5A),边缘区含量较多。实验组 3 h CD205 阳性细胞显著增加,尤以边缘区显著,呈片状分布(彩色插页图 5B),与正常对照组比较差异有显著性($P < 0.01$);12~48 h CD205 阳性细胞较 3 h 组略减少,分布较稀疏(彩色插页图 5C),但仍明显多于正常对照组($P < 0.05$);5~7 d CD205 阳性细胞数接近正常对照组;10~12 d CD205 阳性细胞含量再次明显增加,呈片状弥漫分布(彩色插页图 5D),与正常对照组和实验组 5~7 d 比较差异有显著性($P < 0.05$)。

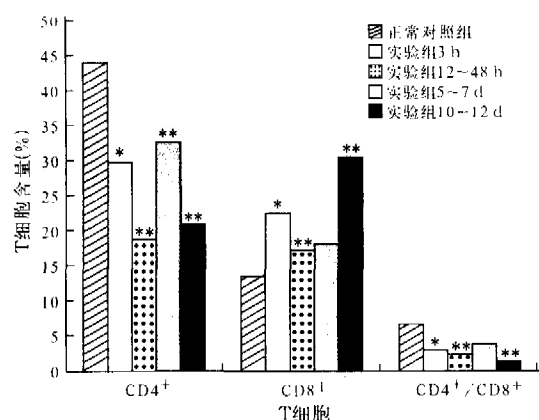
2.4.2 CD86 标记:正常对照组小鼠脾脏白髓、边缘区及脾索内可见少量散在分布的 CD86 阳性细胞,胞膜呈深棕色阳性染色(彩色插页图 6A)。实验组 3 h CD86 阳性细胞含量显著增加,以边缘区最丰富,弥漫分布,可见 DCs 棕黄色阳性染色的胞膜呈树枝状向周围延伸(彩色插页图 6B),与正常对照组比较差异有显著性($P < 0.01$);12~48 h 和 5~7 d CD86 阳性细胞含量呈下降趋势(彩色插页图 6C),仍高于正常对照组水平,但差异无显著性;10~12 d CD86 胞膜和部分胞浆呈深棕色,未见树枝状胞膜突起,阳性细胞含量较 5~7 d 组略增加(彩色插页图 6D),但远不如 3 h 增生明显,CD86 阳性细胞数与正常对照组和实验组 5~7 d 比较差异均无显著性。

2.5 外周血 T 细胞亚群的标记(图 7):实验组 3 h $CD4^+$ T 细胞含量明显下降,而 $CD8^+$ T 细胞含量明显增加, $CD4^+/CD8^+$ 比值降低,与正常对照组比较差异均有显著性(P 均 < 0.05);12~48 h $CD4^+$ T 细胞继续下降至最低点, $CD8^+$ T 细胞含量也减少, $CD4^+/CD8^+$ 比值降低,与正常对照组比较差异均有显著性(P 均 < 0.01);5~7 d $CD4^+$ T 细胞增加, $CD4^+/CD8^+$ 比值回升,但仍低于正常对照组;10~12 d $CD4^+$ T 细胞再度明显减少,而 $CD8^+$ T 细胞数目明显增高, $CD4^+/CD8^+$ 比值倒置,与正常对照组比较差异均有显著性(P 均 < 0.01)。

3 讨论

DCs 是机体内功能最强大的专职抗原提呈的细胞,也是惟一能激活初始型 T 细胞的抗原提呈细胞。DCs 在启动细胞免疫和建立免疫应答反应中起关键作用,还具有调节和控制机体细胞免疫平衡的功能。中枢免疫器官胸腺中的 DCs 通过递呈各种抗原促使胸腺中幼稚淋巴细胞活化、增殖和迁移,还调

控淋巴细胞的阴性选择以及诱导自身免疫耐受,对 T 细胞免疫反应的建立和调节细胞免疫起重要作用^[8-10]。脾脏作为最大的外周免疫器官,是 T 细胞、B 细胞等免疫细胞居住的场所,也是它们识别外来抗原、发挥免疫应答效应的地点。脾脏中 DCs 等免疫活性细胞在中枢免疫器官的控制和作用下,具体参与了机体免疫应答反应的过程与细胞学机制。酵母多糖腹腔注射是制作 MODS 动物模型的常用方法^[14,15]。本研究中所用酵母多糖致伤小鼠 MODS 模型,能较好地模拟临床 MODS 所谓“双相打击”病程^[13,14]。



注:与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 7 外周血 T 细胞亚群的动力变化

Figure 7 Changes on T lymphocyte subgroup in mice peripheral circulation

标记抗体 CD205 是小鼠 DCs 特异性标志物; CD86 作为共刺激因子,只表达具有活性的 DCs,可以反映 DCs 的功能。本研究中实验组 3 h DCs 对 CD205 和 CD86 表达均明显增加,提示在创伤感染初期,DCs 功能亢进,DCs 的数量、尤其是活性也明显增加;脾脏也呈现高反应状态。结果表明在该模型病程的“第 1 次打击”中,机体的细胞免疫遭受严重打击。实验中期(5~7 d)是 MODS 病程的缓解期,结果表明在 MODS 病程的“第 2 次打击”(终末打击)中,机体细胞免疫水平严重下降,进入免疫抑制状态。可以认为,在发病早期,DCs 大量增生且功能活跃,可迅速激活静止期 T 细胞,启动细胞免疫反应;同时过度增生的 DCs 又诱导大量淋巴细胞凋亡,抑制细胞免疫过高反应。在 MODS 期,大量 DCs 失活及各种免疫细胞凋亡、退变,导致机体免疫抑制和 MODS 的发生。

DCs 不仅具有强大的抗原递呈功能,还具备免疫调节功能。调控淋巴细胞凋亡就是 DCs 调节机体过度免疫反应的一种重要自我平衡机制。在 MODS

的整个病程中,细胞凋亡可以说是一把“双刃剑”,早期发生的细胞凋亡对防止过度的炎症反应发挥了积极作用,而晚期大量或过度的细胞凋亡则使机体免疫系统受到严重损害和打击^[8-10]。本模型 MODS 期淋巴细胞凋亡现象并未因 DCs 失活而减少,表明在失去抗原递呈活性的 DCs 中,可能还存在着传递凋亡信号能力,使得脾脏淋巴细胞在大量消耗的情况下,不仅得不到有效激活,反而被诱发凋亡。这个问题还有待于进一步探讨。

总之,在 MODS 病程中,脾脏 DCs 数量和活性的变化在建立外周免疫应答反应和维持机体免疫平衡方面起到重要的作用,DCs 直接或间接影响免疫器官的功能状态以及全身细胞免疫水平。如果在 MODS 期能够采取措施有效地提高 DCs 活性,可能会缓解免疫失衡和免疫抑制。

参考文献:

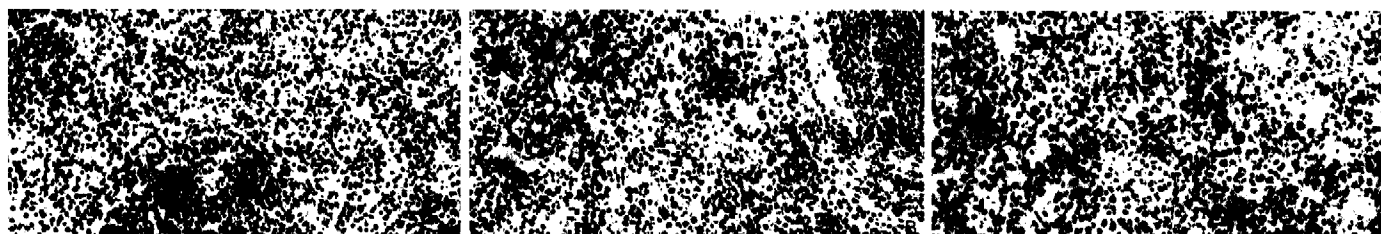
- 胡森,高飞. 中医药防治多器官功能障碍综合征回顾与展望[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8: 323-325.
- 任成山,毛宝龄. SIRS 和 MODS 的研究现状与展望[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11: 498-501.
- Seely J E, Christou N V. Multiple organ dysfunction syndrome: exploring the paradigm of complex nonlinear systems [J]. Crit Care Med, 2000, 28: 2193-2200.
- 盛志勇,胡森. 多器官功能障碍综合征[M]. 北京:科学出版社, 1999: 1-63.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis [J]. Nature, 2002, 420: 885-891.
- 陆江阳,梁延杰,芦善芬,等. 大鼠免疫防御系统病理变化及其在多器官衰竭发病机制中的作用[J]. 中华外科杂志, 1991, 29: 695-697.
- 姚咏明,盛志勇. MODS 抗炎治疗研究的反思[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11: 456-458.
- Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation [J]. Mt Sinai J Med, 2001, 68: 106-116.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells [J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20: 621-667.
- Beyer M, Bartz H, Horner K, et al. Sustained increases in numbers of pulmonary dendritic cells after respiratory syncytial virus infection [J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 113: 127-133.
- 陆江阳,王晓虹,孙宇,等. MODS 大鼠胸腺树突状细胞病理改变及作用的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 675-677.
- 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: 818-819.
- Jansen M J, Hendriks T, Verhofstad A A, et al. Gradual development of organ damage in the murine zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome [J]. Shock, 1997, 8: 261-267.
- 孙宇,陆江阳,王晓虹,等. 小鼠迟发型多器官功能障碍综合征模型复制及病理学观察[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 15-18.
- 胡森,盛志勇,黎君友,等. 小剂量酵母多糖诱发肠缺血-再灌注后全身炎症反应和多器官功能障碍综合征[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 11-14.

(收稿日期: 2005-09-13 修回日期: 2005-11-20)

(本文编辑: 郭方)

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

(正文见24页)



A: 正常对照组; B: 实验组3 h; C: 实验组10~12 d

图1 小鼠脾脏病理学变化(HE, ×200)

Figure 1 Pathological changes of spleen tissue in mice (HE, ×200)



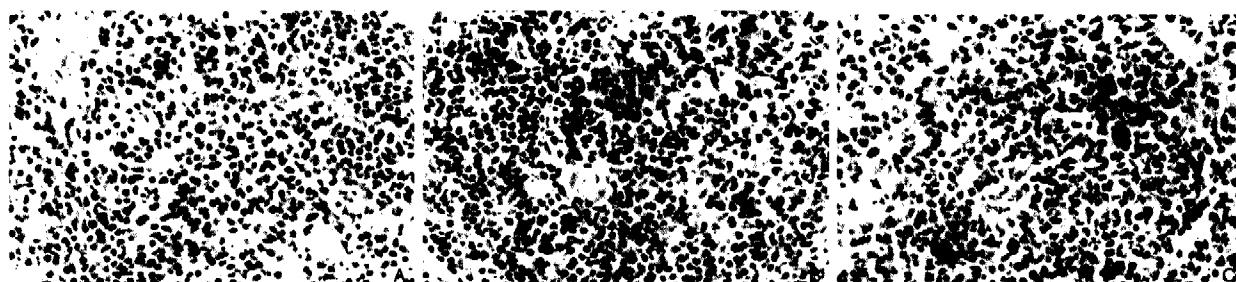
A: 正常对照组(×3 000); B: 实验组3 h, 脾脏边缘区DCs周围有两个与其胞膜紧密接触的凋亡淋巴细胞(×4 000);

C: 实验组12~48 h, DCs周围见凋亡及退变溶解的淋巴细胞(×4 000);

D: 实验组10~12 d, 白髓边缘区见一胞膜溶解破碎的退变DCs, 周围有多个凋亡淋巴细胞、凋亡小体及退变的中性粒细胞(×3 000); E: 实验组10~12 d(×4 000)

图2 小鼠脾脏及DCs的超微病理学变化(醋酸铀-枸橼酸铅)

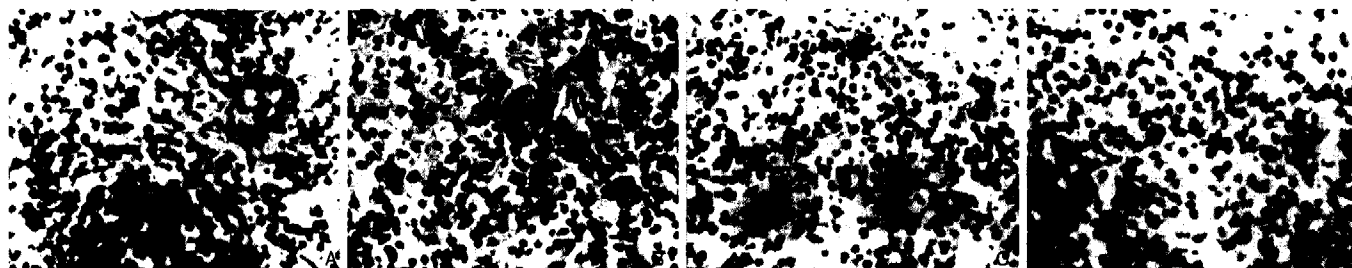
Figure 2 Ultrastructure of spleen tissues and DCs in mice (uranyl acetate and lead citrate double staining)



A: 正常对照组; B: 实验组12~48 h; C: 实验组10~12 d

图3 脾脏细胞凋亡结果(TUNEL, ×400)

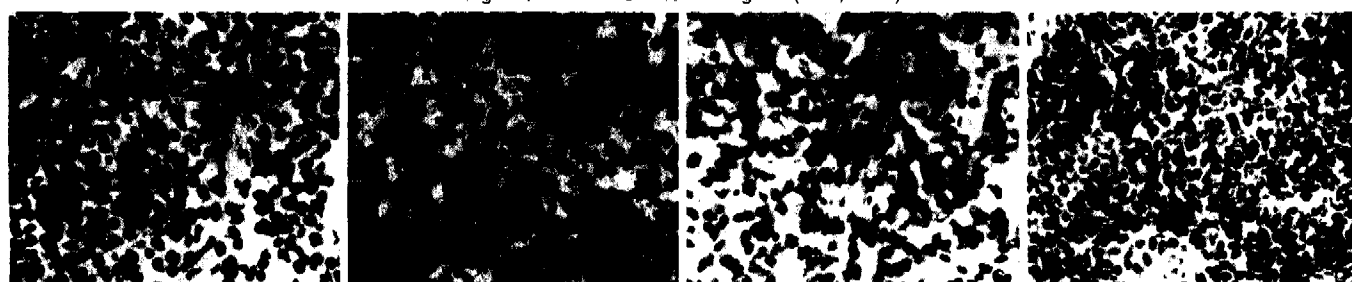
Figure 3 Results of apoptosis in spleen(TUNEL, ×400)



A: 正常对照组; B: 实验组3 h; C: 实验组12~48 h; D: 实验组10~12 d

图4 脾脏CD205标记DCs结果(DAB, ×400)

Figure 4 Result of CD205 labeling DCs(DAB, ×400)



A: 正常对照组; B: 实验组3 h; C: 实验组12~48 h; D: 实验组10~12 d

图5 脾脏CD86标记DCs结果(DAB, ×400)

Figure 5 Result of CD86 labeling DCs(DAB, ×400)