

SARS 病变组织细胞凋亡检测及其意义

张庆玲 丁彦青 董莉 董蔚 董张进华 董慧君 董蔡俊杰 董帆 董陆药丹 董元龙 第一军医大学病理学教研室 广东 广州 510515

摘要 目的 检测 SARS 病变组织标本中的细胞凋亡情况和凋亡细胞类型 探讨细胞凋亡在 SARS 发病过程中的作用及可能机制 方法 DNA 片段原位末端检测和免疫组化碱性磷酸酶法单染和双染检测正常组织和 SARS 病变组织中的细胞凋亡以及白细胞分化相关抗原 CD3、CD4、CD8、CD45RA、CD20、CD68 的表达情况 结果 与正常组织相比 SARS 病人的脾脏、肺组织和淋巴结细胞凋亡明显增多 凋亡细胞包括肺泡上皮细胞、淋巴细胞和单核/巨噬细胞等 各病变组织内均有大量 CD68⁺ 单核/巨噬细胞 病变肺组织基本没有 CD45RA⁺/CD20⁺ B 细胞和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞浸润 淋巴结和脾脏的 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞、CD45RA⁺/CD20⁺ B 细胞也明显减少 表现存的具有上述抗原特性的 T 细胞和 B 细胞较少 凋亡 结论 细胞凋亡现象在 SARS 病变组织中普遍存在 提示细胞凋亡在 SARS 发病过程中起一定作用 病变组织内浸润的炎细胞主要为单核细胞 说明单核细胞可能在 SARS 发病中起重要作用 淋巴结和脾脏的细胞凋亡现象和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞及 CD45RA⁺/CD20⁺ B 细胞减少提示 SARS 病毒可能对免疫细胞有一定的杀伤效应

关键词 急性重症呼吸综合征 免疫细胞 白细胞分化抗原 凋亡

中图分类号 R373.1 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2003)08-0770-04

Detection of cell apoptosis in the pathological tissues of patients with SARS and its significance
ZHANG Qing-ling, DING Yan-qing, HE Li, WANG Wei, ZHANG Jin-hua, WANG Hui-jun, CAI Jun-jie, GENG Jian, LU Yao-dan, LUO Yuan-Long

Department of Pathology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the role and mechanism of apoptosis in severe acute respiratory syndrome (SARS). Methods Klenow-FragEL TMDNA Fragmentation Detection Kit and immunohistochemical alkaline phosphatase detection reagent kit were used to detect cell apoptosis and expressions of CD68, CD20, CD4, CD8 and CD45RA in the pathological tissues of SARS patients. Results Apoptotic cells increased significantly in the spleen, lung and lymph nodes of SARS patients as compared with normal tissues. The apoptotic cells included pneumocytes, lymphocytes and monocytes, and CD68⁺ monocytes were observed in abundance in the lung, spleen and lymph nodes of SARS patients. In the lung tissue of the patients, few CD20⁺/CD45RA⁺ B cells and CD4⁺/CD8⁺ T cells were spotted, and CD20⁺/CD45RA⁺ B cells along with CD4⁺/CD8⁺ T cells were also significantly decreased in the spleen and lymph nodes, where few conserved B and T cells underwent apoptosis. Conclusions Apoptosis is a general phenomenon in SARS, and the invasive cells in the pathological tissues are primarily monocytes, suggesting that apoptosis and invasion of monocyte play important roles in the progression of SARS. The cell apoptosis and decreased number of T cell and B cells in the lungs and CD4⁺/CD8⁺ T cells and CD20⁺/CD45RA⁺ B cells in the spleen and lymph nodes indicate that the SARS virus may exercise immune cell-killing effect to some extent during its pathogenesis.

Key words: severe acute respiratory syndrome; immune cells; cluster of differentiation; apoptosis

急性重症呼吸综合征 severe acute respiratory

syndrome, SARS 自 2002 年 11 月出现后引起世界广泛关注 探讨 SARS 发病机制及病原体在人体内主要攻击靶点 寻找 SARS 致病的关键环节 是目前 SARS 研究中亟待解决的问题之一 本研究运用 DNA 片段原位末端标记技术及免疫组化碱性磷酸酶法检测 SARS 病变组织中细胞凋亡情况和凋亡细胞类型 探讨 SARS 发病过程中的细胞凋亡状态及免疫细胞的作用

收稿日期 2003-07-20

基金项目 国家自然科学基金 SARS 紧急启动项目 0340015 军队医药卫生 SARS 专项 (03F016-2) 广东省 SARS 专项 02D2003-80

This study was an Emergency SARS Research project supported by National Natural Science Foundation of China 0340015 and also received financial support from the Dedicated Fund for SARS Control of Medical Science Research Project of the Army 03F016-2 and of Guangdong Province of China 02D2003-80

作者简介 张庆玲 1970 年 12 月 河南潢川人 1999 年毕业于第三军医大学 现为第一军医大学在读博士研究生 袁讲师 电话 20-61641888-

89099 电-mail: zqllc8@fimmu.com

通讯作者 丁彦青 电-mail: dyq@fimmu.com

1 材料与方法

1.1 材料

4 例 SARS 患者肺组织 淋巴结和脾脏取自第一

军医大学病理学教研室的尸检标本患者生前均有 SARS 病人接触史和明确的 SARS 相关症状表其中 1 例进行过激素治疗其余 3 例没有接受过激素治疗以其他疾病切除的相对正常肺组织和淋巴结以及脾破裂切除的脾脏为正常对照遥 DNA 片段原位末端检测试剂盒 (IncoGene, Germany) 免疫组化碱性磷酸酶法检测试剂盒及抗 CD3、CD4、CD8、CD1448、CD45RA、CD45RB、CD20、CD26、CD68、P1 单抗 (AKO, Germany)。

1.2 DNA 片段原位末端检测技术检测正常和病变组织细胞凋亡

常规脱蜡至水蛋白酶 K 室温消化 20min, 5% H₂O₂ 甲醇室温 20min 灭活内源性过氧化物酶, 平衡缓冲液室温 30min, 10% 乙醇室温 2h 进行 DNA 末端标记扩增反应停止液室温 5min, 阻断缓冲液室温孵育 10min, 结合物 (IncoGene) 室温孵育 30min, 除去平衡缓冲液和阻断缓冲液外, 以上各步骤后均用 TBS 漂洗, DAB 显色, 苏木素复染, 甘油明胶封片。

1.3 细胞凋亡和免疫组化 AP 法双染色

同样方法 DAB 为底物检测凋亡细胞, 漂洗后进行免疫组化 AP 法染色显示 1 个白细胞抗原 (0.1 mmol/L Tris, 0.1 mmol/L EDTA, pH 9.0) 高压煮沸进行抗原修复, 室温冷却, 阻断内源性过氧化物酶, 抗 37 益孵育 60min, 抗室温孵育 45min, 每一步骤后均 TBS 漂洗, 快红显色, 苏木素复染, 甘油-磷酸盐封片。

1.4 结果判断

每张玻片于高倍镜下计数 5 个视野的细胞, 其中没有阳性着色的为阴性, 阳性细胞数 <25% 为 -, 阳性细胞数在 25%~50% 为 +, 包括 25% 的为 +, 阳性细胞数在 50%~75% 之间为 ++, 包括 50% 的为 ++, 阳性细胞数逸 75% 为 +++。

2 结果

2.1 染色结果的定位

细胞凋亡检测结果为棕黄色, 定位于细胞核, 有些凋亡细胞的细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状凋亡小体。白细胞分化抗原特异性免疫分子的免疫组化检测结果为红色, 其中 T 细胞相关免疫分子 CD3、CD4、CD8 和 B 细胞相关免疫分子 CD45RA、CD20 均定位于细胞膜, 单核/巨噬细胞特异性免疫分子 CD68 则定位于细胞浆。

2.2 正常组织细胞凋亡和免疫组化单染和双染结果

正常肺组织、淋巴结和脾脏中均存在少量细胞凋亡现象。正常组织凋亡细胞包括肺泡上皮细胞和支气管

粘膜、脾脏的凋亡细胞主要位于红髓, 骨髓凋亡细胞极少。淋巴结内的凋亡细胞呈散在分布。免疫组化显示正常肺组织中基本没有 CD3⁺CD4⁺ 或 CD8⁺ T 细胞和 CD20⁺ 或 CD45RA⁺ B 细胞。脾脏和淋巴结中上述 CD 分子均有强的表达, 并且符合 T 细胞和 B 细胞分布规律。在肺组织、脾脏和淋巴结内均存在 CD68⁺ 单核/巨噬细胞。

2.3 病变组织细胞凋亡和免疫组化双染结果

病变组织细胞凋亡单染 (图 1~3) 以及细胞凋亡和免疫组化双染 (图 4~6) 结果均显示, 与正常组织相比, SARS 病变的脾脏、肺组织和淋巴结的细胞凋亡明显增多。淋巴结内的凋亡细胞较同一个体的脾脏和肺组织稍少。凋亡细胞包括形态异常细胞和没有明显形态异常的细胞。病变组织内的凋亡细胞着色明显强于相应正常组织, 呈现棕黑色。病变肺组织的凋亡细胞主要为肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞、巨噬细胞、脱落细胞和纤维细胞等。脾脏的大量凋亡细胞主要位于红髓。病变组织包括肺组织、淋巴结和脾脏, 均有大量 CD68⁺ 单核/巨噬细胞浸润。浸润的单核/巨噬增生活跃, 胞浆丰富。部分单核巨噬细胞存在凋亡或部分凋亡现象。正常肺和 SARS 病变肺组织中 CD3⁺CD4⁺ 或 CD8⁺ T 细胞和 CD20⁺ 或 CD45RA⁺ B 细胞均很少表达或不表达, 而脾脏和淋巴结内的 T 细胞和 B 细胞分布区 CD20⁺CD45RA⁺CD3⁺CD4⁺CD8 表达均明显降低 (表 1)。

3 讨论

SARS 传染性强, 死亡率较高, 引起了世界各国的高度重视。2003 年 4 月 12 日, 加拿大科学家首次公布了 SARS 病毒 Tor2 的基因组序列。4 月 16 日, WHO 正式确认 SARS 病毒是 SARS 的病原体。目前世界各国正努力进行 SARS 病毒的生物学特征和作用机制等方面研究。冠状病毒是一种有外壳的正义单链 RNA 病毒, 复制不经过 DNA 中间体。已知病毒感染常常可导致多种基因表达和蛋白酶激活, 而引起细胞凋亡。病毒调节靶细胞凋亡的途径主要有免疫系统介导和病毒本身具有凋亡调节基因两种途径实现。近年发现许多免疫分子与诱导细胞凋亡有关。基于以上原因, 本研究从淋巴细胞亚群相关免疫分子表达和细胞凋亡入手, 研究了 SARS 病变的肺组织、淋巴结和脾脏中的白细胞分化抗原分子表达和细胞凋亡变化。

细胞凋亡是选择性的细胞自然死亡过程, 是一种不同于细胞坏死的死亡方式, 由一系列酶的参与, 它被认为是维持机体内环境稳定, 清除衰老和无能细胞的重要机制。正常细胞、炎症细胞和肿瘤细胞均有凋

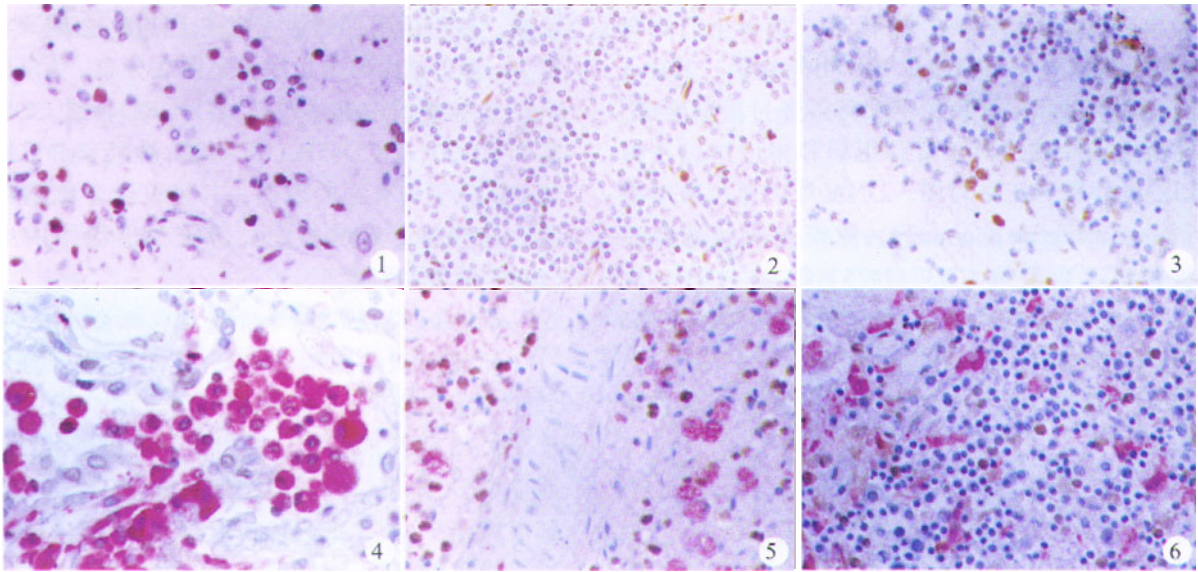


图 1 SARS 病变肺上皮细胞凋亡染色阳性 (原放大倍数 400)

Fig.1 Apoptosis of pneumocyte of SARS patients (Original magnification: 400)

图 2 SARS 病变脾脏细胞凋亡染色阳性 (原放大倍数 400)

Fig.2 Cell apoptosis in the spleen of SARS patients (Original magnification: 400)

图 3 SARS 病变淋巴结细胞凋亡染色阳性 (原放大倍数 400)

Fig.3 Cell apoptosis in the lymph nodes of SARS patients (Original magnification: 400)

图 4 SARS 病变肺组织细胞凋亡和单核巨噬细胞 CD68 双染色 (原放大倍数 400)

Fig.4 Double-staining of apoptosis and CD68 in the lung tissue of SARS patients (Original magnification: 400)

图 5 SARS 病变脾脏细胞凋亡和单核巨噬细胞 CD68 双染色 (原放大倍数 400)

Fig.5 Double-staining of apoptosis and CD68 in the spleen of SARS patients (Original magnification: 400)

图 6 SARS 病变淋巴结细胞凋亡和单核巨噬细胞 CD68 双染色 (原放大倍数 400)

Fig.6 Double-staining of apoptosis and CD68 in the lymph nodes of SARS patients (Original magnification: 400)

表 1 正常和 SARS 组织的细胞凋亡和白细胞分化抗原表达检测结果

Tab.1 Cell apoptosis and expression of CD in the pathological tissues of SARS and normal tissue

Specimen	Apoptosis	CD3	CD4	CD8	CD45RA	CD20	CD68
Lung							
Normal	+	-	+*	-	-	+*	+
Case1	+++	-	-	-	+*	+*	++
Case2	++	-	-	-	-	-	+++
Case3	++++	-	-	-	-	-	+++
Case4	++	-	-	-	-	-	+
Spleen							
Normal	+	++	++	++	+++	+++	+
Case1	+++	-	-	-	+	+	+
Case2	+++	-	-	-	+	-	+++
Case3	++	-	-	-	+	-	+++
Case4	+	-	-	-	++	+	+++
Lymphnode							
Normal	+	+*	+	++	+++	+++	++
Case1	++	-	-	+ [#]	+	+++	+++
Case2	++	-	-	-	+	-	+++
Case3	++	-	-	-	+	-	+++
Case4	++	-	-	-	+	+	+++

*Few positive expression; [#]Cell plasm positive

亡研究证实细胞凋亡紊乱与许多疾病的发生和发展有关。凋亡细胞最具特征性的改变是核酸内切酶的激活导致染色质 DNA 在核小体之间断裂，形成以 180~200bp 为最小单位的单体或寡聚体片段。长期以来，细胞凋亡研究多利用琼脂糖电泳观察细胞凋亡产生的 DNA 寡核苷酸片段形成的梯状带。该方法具有需要提取 DNA 和不能对凋亡细胞进行定位等缺点。本研究根据凋亡细胞的 DNA 断裂成多个片段的原理，利用 DNA 片段原位末端检测技术，将生物素标记和未标记的脱氧核糖核酸结合于 DNA 片段的游离 3'-OH 末端，通过 DAB 显色进行观察。该方法具有可在分子水平上进行检测、灵敏度高、可在原位检测细胞凋亡、易于区分凋亡细胞类型、并能够检测早期形态学改变不明显的凋亡细胞等优点。本研究的细胞凋亡检测显示，与正常组织相比，SARS 病变的脾脏、肺组织和淋巴结细胞凋亡明显增多。凋亡染色信号增强提示细胞凋亡增多与 SARS 发病有关。SARS 病毒感染可能有促进细胞凋亡作用，使细胞凋亡加强。SARS 病毒对脾脏、肺组织和淋巴结的攻击作用明显，淋巴结内的凋亡细胞较脾脏和肺组织少可

能提示淋巴结在 SARS 发病过程中的作用与脾脏和肺不同

CD(cluster of differentiation)是白细胞分化抗原分子的总称,与免疫细胞的活化、信号传递等功能有关。目前以确定的 CD 分子约 150 种,分别存在于各类白细胞表面,分为 T 细胞、B 细胞、髓样和单核细胞、血小板、NK 和非谱系细胞。活化抗原、血管内皮细胞黏附分子和细胞因子受体 9 大类。CD 分子的细胞特异性分布决定了其细胞表面标志物的特性。因此本研究分别选取 T 细胞、CD3、CD4、CD8、B 细胞、CD20、CD45RA 和单核 / 巨噬细胞、CD68 相关的特异性分化抗原分子为标记物检测 SARS 病变组织的细胞抗原表型是可行的。本研究还根据细胞凋亡主要表现在细胞核,主要定位在细胞膜或细胞浆的特点设计应用双染法对同一组织的细胞凋亡和细胞特异性 CD 表达状况进行观察。结果发现 SARS 病变组织内凋亡细胞和大量 CD68⁺ 单核 / 巨噬细胞普遍共存,而且共存的单核 / 巨噬细胞核大胞浆丰富,极少凋亡。提示单核 / 巨噬细胞在 SARS 发病过程中起重要作用,且可能与诱导细胞凋亡有关。所有病变组织中 B 细胞相关分化抗原 CD20 和 CD45RA、T 细胞相关 CD3、CD4 和 CD8 等均明显减少或不表达,尤其是 T 细胞相关分化抗原,并且具有以上抗原表型的细胞较少发生凋亡。提示 SARS 相关的冠状病毒可能通过攻击 T 和 B 淋巴细胞,使 T 淋巴细胞减少或失去相应抗原特性和免疫功能,进而破坏人体免疫系统,而且对 T 细胞系统破坏可能更强。B 淋巴细胞可能在抑制 SARS 发病过程中的细胞凋亡方面起作用。本研究还发现进行过激素治

疗的 SARS 患者,其细胞凋亡现象弱于没有进行过激素治疗组。结合该例标本中单核巨噬细胞浸润和 T 淋巴细胞减少现象,提示激素治疗有抑制机体细胞凋亡作用,但不能增强免疫系统功能,因此可能有促进 SARS 进展的副作用。

参考文献

- Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus [EB/OL]. Science, Publishing online, http://www.sciencexpress.org/1_May_2003/Page1/10.1126/science.1085953.
- 丁彦青,王慧君,申洪,等.严重急性呼吸综合征临床病理学观察[J].中华病理学杂志,2003,32(3):195-200.
- Ding YQ, Wang HJ, Shen H, et al. The clinical pathology observation of severe acute respiratory syndrome [J]. Chin Path J, 2003, 32(3):195-200.
- Xiong B, Gui CS, Xu XY, et al. A 3D model of SARS CoV3CL proteinase and its inhibitors design by virtual screening [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(6):497-504.
- Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J, et al. Measles virus induced immunosuppression: targets and effected mechanisms [J]. Curr Mol Med, 2001, 1(2):163-81.
- Servet-Delprat C, Vidalain PO, Bausinger H, et al. Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells [J]. Immunol, 2000, 164(4):1753-60.
- Lesauskaite V, Ivanoviene L, Valanciute A. Programmed cellular death and atherogenesis: from molecular mechanisms to clinical aspects [J]. Medicina (Kaunas), 2003, 39(6):529-34.
- Qian H, Atherton S. Apoptosis and increased expression of Fas ligand after uniocular anterior chamber (AC) inoculation of HSV-1 [J]. Curr Eye Res, 2003, 26(3-4):195-203.

责任编辑 杨金星

链接 769 页

- Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R, et al. Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retro-viral gene transfer of BMP-2 [J]. Differentiation, 2001, 67(4-5):128-38.
- Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 284(2):411-8.
- Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA, et al. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to

- transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix [J]. J Orthop Res, 2001, 19(4):738-49.
- Robinson CJ. Growth factors: therapeutic advances in wound healing [J]. Ann Med, 1993, 25(6):535-8.
- Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, et al. Principles of cartilage repair and regeneration [J]. Clin Orthop, 1997, 342(9):254-69.
- Gun IM, Kim DY, Shin JH, et al. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow [J]. Bone Surg, 2001, 83(2):289-94.