

温热对 HPV 感染皮肤中朗格汉斯细胞的影响

李晓东 高兴华 金力 王雅坤 洪玉晓 乌韦苏 王晓琴 陈洪铎

【摘要】 目的 探讨不同温热条件处理后的正常皮肤/尖锐湿疣皮损组织中朗格汉斯细胞(LC)的形态、数量及迁移。**方法** 利用 37℃、42℃、45℃不同的温热条件处理置于培养液中的离体尖锐湿疣皮损(16例)和正常皮肤组织(15例),采用免疫组化和流式细胞分析方法测定 LC 形态、数量和迁移的变化。**结果** 表皮中 LC 数量随着温度的增高而减少,正常皮肤组织表皮内 LC 数量分别为:782.40 ± 114.88 (37℃),649.44 ± 119.40 (42℃),510.88 ± 118.64 (45℃);疣体组织表皮内 LC 数量分别为:646.04 ± 135.67 (37℃),489.38 ± 118.19 (42℃),387.93 ± 110.15 (45℃);LC 树突变短、减少或消失。温热促进 LC 迁移至培养液中。不同温度下,游走的 LC 表达 CD1a 的数量不同,正常皮肤组织游走至培养液中 LC 表达 CD1a 的比率分别是 0.19% ± 0.18% (37℃),0.89% ± 0.19% (42℃),1.59% ± 0.28% (45℃);尖锐湿疣组织分别为 0.62% ± 0.31% (37℃),2.31% ± 0.54% (42℃),6.33% ± 0.98% (45℃)。**结论** 温热能够促进 LC 的迁移,籍此有可能增强 LC 在免疫应答中的抗原提呈作用。

【关键词】 高温,诱发;尖锐湿疣;朗格汉斯细胞

Effects of localized hyperthermia on Langerhans cells in HPV-infected skin LI Xiao-dong, GAO Xing-Hua*, JIN Li, WANG Ya-kun, HONG Yu-xiao, WU Wei-su, WANG Xiao-qin, CHEN Hong-Duo. *Department of Dermatology, No.1 Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China
Corresponding author: GAO Xing-Hua, Email: gaobarry@hotmail.com

【Abstract】 Objective To observe the morphology, quantity and migration of Langerhans cells in normal or HPV-infected skin treated with localized hyperthermia. **Methods** Tissue specimens obtained from 16 patients with condyloma acuminatum (CA) and 15 normal controls were divided into three equal parts, and irradiated by a self-made hyperthermia equipment at 37℃, 42℃ and 45℃ respectively for 30 minutes. Immunohistochemistry and flow cytometry were applied to detect the morphology, quantity and migration of Langerhans cells (LCs), respectively, in these treated specimens. **Results** With a rise in temperature, the number of LCs in epidermis decreased, the dendrites shortened, decreased in number or even disappeared. After exposure to hyperthermia at 37℃, 42℃ and 45℃, the number of LCs was 782.40 ± 114.8, 649.44 ± 119.40 and 510.88 ± 118.64 per square millimeter respectively, in normal tissue, 646.04 ± 135.67, 489.38 ± 118.19 and 387.93 ± 110.15 per square millimeter respectively in HPV-infected skin tissue. The percentage of migratory LCs expressing CD1a was 0.19% ± 0.18%, 0.89% ± 0.19% and 1.59% ± 0.28% in normal skin tissue treated with hyperthermia at 37℃, 42℃ and 45℃ respectively, 0.62% ± 0.31%, 2.31% ± 0.54% and 6.33% ± 0.98%, respectively, in HPV-infected skin tissue; the differences were significant among these different temperatures. Furthermore, the migration of LCs from tissue into culture was enhanced by the treatment with hyperthermia. **Conclusions** Hyperthermia can promote the migration of LCs, and accordingly enhance the antigen presenting effect of these cells in immune response.

【Key words】 Hyperthermia, induced; Condylomata acuminata; Langerhans cells

人乳头瘤病毒(HPV)感染可以引起皮肤黏膜的良性增生性病变甚至发生恶性肿瘤。朗格汉斯细胞(Langerhans cell, LC)在抗病毒免疫机制中有重要

作用,但 HPV 可通过某些机制逃逸 LC 对病毒的识别^[1]。近年来有学者将局部温热用于病毒疣的治疗,取得一定的效果^[2-3]。但温热的最适条件以及通过何种机制发挥治疗作用尚无系统研究。鉴于 LC 在抗 HPV 感染免疫触发阶段的重要作用,我们拟检测不同温热条件对 LC 数量和形态的影响以及对 LC 游走及功能成熟的影响,旨在说明温热促进朗格汉斯细胞有效诱发免疫应答中的作用,为病毒疣的温热治疗提供实验基础。

基金项目:国家自然科学基金(30740082);教育部《新世纪优秀人才支持计划》(NCEP-04-0287);教育部留学回国教外司留[2003]406

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院皮肤科[李晓东(现在沈阳医学院奉天医院皮肤科,110024)、高兴华、王雅坤、洪玉晓、乌韦苏、王晓琴、陈洪铎],妇产科(金力)

通信作者:高兴华,Email:gaobarry@hotmail.com

对象与方法

一、对象

病例组:16 例女性尖锐湿疣(CA)患者均为我院妇科 2006 年 1 月至 2007 年 1 月的门诊患者,符合 2000 年卫生部防疫司制订的 CA 诊断标准。年龄 20 ~ 42 岁,平均(26.9 ± 7.8)岁,病程 1 周至半年,平均(1.36 ± 1.63)个月,均为初发患者,未经过任何治疗。对照组:15 例对照为同期在我院外科接受手术的非 CA 患者。

二、主要试剂及仪器

CD1a 鼠抗人单克隆抗体、FITC 标记的 CD1a 鼠抗人单克隆抗体、PE 标记的 CD83 鼠抗人单克隆抗体(丹麦 Dako 公司),即用型 S-P 免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司),温热治疗仪(自制可调的恒定工作温热治疗仪,申报专利中),流式细胞仪(美国 BD 公司)。

三、方法

1. 取材:①征得受试者知情同意后,局部消毒麻醉,分别切取疣体或正常皮肤组织 11 例、10 例。每例组织等分为 3 份,将真皮侧向下,放入少量 RPMI 培养液(主要成分参照参考文献[4]),只将疣体底部浸于培养液中。用温热治疗仪分别以 37 ℃、42 ℃和 45 ℃3 个温度表面照射 30 min 后,将疣体取出,OCT 包埋剂包埋后-80 ℃保存。②取材方法同上,切取疣体或正常组织各 5 例,将组织分别以 37 ℃、42 ℃和 45 ℃3 个温度照射 30 min 后,将组织全部浸于 RPMI 培养液。37 ℃培养箱孵育 12 h 后将组织取出,OCT 包埋剂包埋后-80 ℃保存,同时收集培养液中的细胞。

2. 免疫组化染色:①步骤:分别将未孵育和孵育 12 h 后的速冻组织切成 6 μ m 薄片,以 CD1a 鼠抗人单克隆抗体作为一抗,按 S-P 免疫组化试剂盒说明书进行免疫组化染色。阳性树突细胞为 LC。

②LC 计数:将染色后的切片置于显微镜下观察,细胞膜和(或)细胞质呈桔红色的树突细胞为 LC,以微测尺标定目镜方格在 40 倍物镜下的大小,随机选 10 个视野,计数方格内的阳性细胞数,计算出单位面积内细胞的密度。③统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件对资料进行统计学分析。测得结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,同一组织不同温度之间比较采用区组方差分析;同一温度不同组织间比较采

用成组 t 检验。

3. 迁移 LC 的检测:将温热处理并孵育的组织培养液中的细胞收集到试管中,计数试管中细胞数,每 10×10^5 加入 FITC 标记的 CD1a 单克隆抗体 20 μ L,37 ℃水浴箱内孵育 30 min 后 PBS 冲洗。采用流式细胞分析仪分析计数 CD1a 阳性细胞。

结 果

一、温热处理后皮肤组织内 LC 数量和形态的变化

1. 温热处理后表皮内 LC 的数量变化:正常皮肤、疣体组织经不同温热条件处理后,表皮 LC 数量见表 1。在相同温度处理的病变组织和正常组织之间,LC 数量差异有统计学意义($P < 0.01$)。同一组织利用不同温度处理后,LC 数量差异也有统计学意义($P < 0.01$)。不同温热条件处理,并孵育 12 h 后,正常皮肤、疣体组织中 LC 数量见表 1。相同温度处理的病变组织和正常组织之间,LC 数量差异有统计学意义($P < 0.01$),同一组织利用不同温度处理后,LC 数量差异也有统计学意义($P < 0.01$)。

2. 温热处理后表皮内 LC 的形态学变化:37 ℃处理后的正常组织表皮中,可见许多细胞膜或细胞质呈桔红色并有树突状突起的 LC 镶嵌于棘细胞间。LC 可见于表皮全层,以表皮中部较多。LC 胞体呈圆形、椭圆形或不规则形,细胞突起多且细长,常见 3 ~ 4 个突起,高倍镜下可见二级突起(图 1)。42 ℃条件下,少数 LC 结构不完整,树突减少、变短,表现为红色的点状或条状结构(图 2);45 ℃处理后,多数 LC 结构不完整,树突状突起明显减少、缩短或消失,部分切片真皮浅层靠近基层处偶见不典型 LC,仅有胞体而无树突结构(图 3)。

42 ℃、45 ℃温热处理 CA 皮损内 LC 形态与 37 ℃处理相比,LC 胞体变小、树突状突起明显减少、缩短

表 1 尖锐湿疣和正常皮肤组织朗格汉斯细胞的分布密度($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	温度			F 值
		37 ℃(个/mm ²)	42 ℃(个/mm ²)	45 ℃(个/mm ²)	
未孵育组织					
正常皮肤组	10	782.40 ± 114.88	649.44 ± 119.40	510.88 ± 118.60	145.90
尖锐湿疣组	11	646.04 ± 135.67	489.38 ± 118.19	387.93 ± 110.15	75.02
t 值		-3.54	-4.44	-2.68	
孵育组织					
正常皮肤组	5	733.76 ± 69.49	604.48 ± 106.43	446.08 ± 65.92	55.36
尖锐湿疣组	5	328.00 ± 138.27	216.20 ± 125.21	100.00 ± 97.62	86.02
t 值		-5.62	-7.37	-9.79	

注:同一组织,不同温度之间采用区组方差分析;同一温度不同组织之间采用成组 t 检验, P 值均 < 0.01

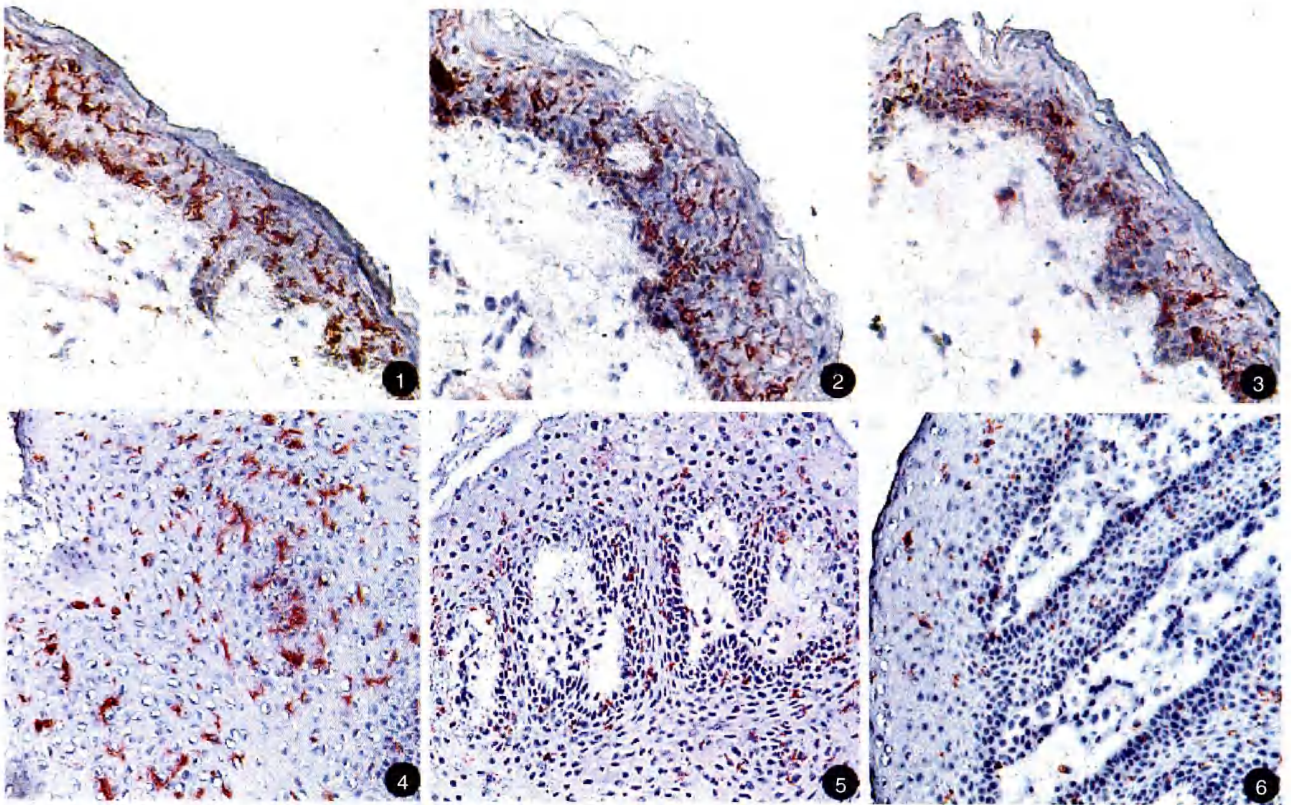


图 1 37 °C 正常皮肤组织朗格汉斯细胞 (CD1a 标记), 表皮中见细胞膜或细胞质染成桔红色的树突细胞 (SP × 200) 图 2 42 °C 正常皮肤组织: LC 树突变短, 减少 (SP × 200) 图 3 45 °C 正常皮肤组织: LC 数量减少, 胞突变短, 减少或消失 (SP × 200) 图 4 37 °C CA 皮损: 表皮中见细胞膜或细胞质染成桔红色的 LC (SP × 200) 图 5 42 °C CA 皮损: LC 树突变短, 减少或消失 (SP × 200) 图 6 45 °C CA 皮损: LC 数量减少, 胞突变短, 减少或消失 (SP × 200)

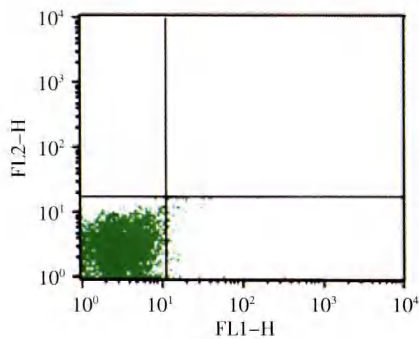


图 7 37 °C

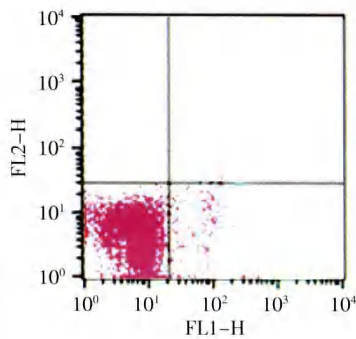


图 8 42 °C

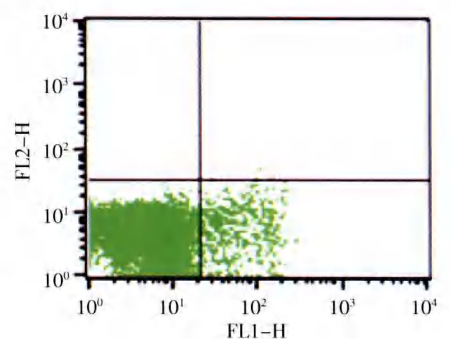


图 9 45 °C

图 7 ~ 9 不同温热处理尖锐湿疣组织后, 游走至培养液中的 CD1a⁺ 细胞的流式细胞仪分析结果 左下象限: CD1a⁺ 细胞; 右下象限: CD1a⁻ 细胞

或消失, 极少见到二级突起, 典型的树突细胞少见; 大部分 LC 结构不完整, 甚至仅表现点状或条状的胞突结构 (图 4 ~ 6)。45 °C 处理后的 LC 数量减少明显, 残留的 LC 结构不完整, 树突变短, 多数消失, 甚至仅表现点状或条状的胞突结构。

二、不同温热条件对 LC 迁移的影响

正常皮肤组织和疣体组织经不同温热处理, 并孵育 12 h 后, 培养液中有较多的游走细胞。本研究采用单色标记法, 检测游走至培养液中 CD1a 阳性

细胞的百分比 (图 7 ~ 9)。

正常皮肤组织、疣体组织经不同温热条件处理后, 游走至培养液中的 CD1a⁺ 细胞百分比见表 2。相同温度处理的病变组织和正常组织之间, LC 数量差异有统计学意义, 同一组织利用不同温度处理后, LC 数量差异也有统计学意义。

讨 论

HPV 感染皮肤病的自然病程较长, 可由数月、

表 2 尖锐湿疣皮损和正常皮肤组织游走至培养液中的朗格汉斯细胞百分比($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	温度			F 值
		37 ℃(%)	42 ℃(%)	45 ℃(%)	
正常皮肤组	5	0.19 ± 0.18	0.89 ± 0.19	1.59 ± 0.28	51.56*
尖锐湿疣组	5	0.62 ± 0.31	2.31 ± 0.54	6.33 ± 0.98	95.50*
t 值		2.68**	5.55*	10.42*	

注:同一组织,不同温度之间采用区组方差分析;同一温度,不同组织之间采用成组 t 检验,** $P < 0.05$,* $P < 0.01$

数年到十余年不等。目前临床上主要采用物理化学方法(如冷冻、电灼术、高热激光、化学腐蚀)、细胞毒类药物等创伤性方法治疗病毒疣。这些手段的基本原理是清除 HPV 感染的皮肤组织从而达到治疗目的。但这些方法引起的痛苦度高,需要的创伤恢复期长,多有瘢痕形成,不易被患者接受。局部温热疗法无创伤,痛苦小,复发率低,患者易于接受,有可能成为一种简捷、常规的治疗手段。

由于热效应的复杂性,热疗确切机制目前尚不明确。肿瘤热疗研究结果认为高温具有细胞毒性作用。随着热疗研究的进一步深入,人们逐渐认识到在肿瘤热疗中,免疫系统对杀灭肿瘤起重要作用,即热疗后的免疫反应对原发肿瘤和转移肿瘤的消退起重要作用。尤其是 39.5 ~ 41.5 ℃ 的温度对肿瘤细胞并无直接的杀伤作用,而是通过对机体免疫功能的调节作用而达到治疗目的;温热可以提高 T、B 淋巴细胞以及自然杀伤细胞的活性,影响免疫效应细胞如淋巴细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞和粒细胞等的再分布^[5]。以往研究结果表明,恶性肿瘤细胞在一定的温度和加热时间内(即热剂量 $D = tR^{T-43}$)可以发生凋亡甚至坏死。细胞的存活与温度和时间两个因素均有关系。其中 43 ℃ 被认为是转折温度点(breakpoint),43 ℃ 以上的温度诱导细胞死亡的能力明显高于 43 ℃ 以下温度时诱导细胞死亡的能力^[6]。

LC 是皮肤中的树突细胞,是机体进行免疫监视的前哨细胞,CD1a 是一种提呈脂类抗原的分子,目前被公认为树突细胞的主要特征性标志,已广泛应用于树突细胞分离、纯化和体外培养的鉴定^[7]。

本研究采用 37 ℃、42 ℃、45 ℃ 不同温度表面照射疣体组织和正常皮肤组织后发现,不同温度治疗后皮损中 CD1a⁺ LC 的形态和数量有很大差别。我

们发现随着温度升高,LC 胞体变小,树突突起明显减少、缩短或消失,典型的树突细胞少见,大部分 LC 结构不完整,甚至仅表现点状或条状的胞突结构。尤其 45 ℃ 治疗后的 LC 树突明显变短,多数消失,而且 LC 数量显著减少、密度显著降低。且 37 ℃ 孵育 12 h 后随着温度升高疣体组织内 LC 减少更加明显,45 ℃ 疣体组织内只有散在的 LC 存在,多数视野无 LC。我们推测 LC 减少的可能原因有:① LC 凋亡;② LC 不表达 CD1a 分子;③ LC 游走,或其他原因。我们将温热处理后的组织孵育 12 h 后发现,培养液中有大量的游离细胞。应用流式细胞仪检测发现,游走的部分细胞表达 CD1a,且随着温度的升高 CD1a⁺ 细胞数量逐渐增多。

我们的结果显示:局部温热处理后皮损部位较正常组织 LC 数量和结构均发生明显改变,且促进 LC 游走至培养液中。推测在体内条件下,温热促进 LC 通过真皮向局部淋巴结迁移,促进局部细胞免疫应答反应。这可能是温热能够有效治疗 HPV 感染皮肤病的机制之一。

参 考 文 献

- [1] Fausch SC, Fahey LM, Da Silva DM, et al. Human papillomavirus can escape immune recognition through Langerhans cell phosphoinositide 3-kinase activation. *J Immunol*, 2005, 174(11): 7172-7178.
- [2] El-Tonsy MH, Anbar TE, El-Domyati M, et al. Density of viral particles in pre and post Nd: YAG laser hyperthermia therapy and cryotherapy in plantar warts. *Int J Dermatol*, 1999, 38(5): 393-398.
- [3] Stern P, Levine N. Controlled localized heat therapy in cutaneous warts. *Arch Dermatol*, 1992, 128(7): 945-948.
- [4] Ostberg JR, Kabingu E, Repasky EA. Thermal regulation of dendritic cell activation and migration from skin explants. *Int J Hyperthermia*, 2003, 19(5): 520-533.
- [5] Olszewski WL, Grzelak I, Ziolkowska A, et al. Effect of local hyperthermia on lymph immune cells and lymphokines of normal human skin. *J Surg Oncol*, 1989, 41(2): 109-116.
- [6] Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002, 43(1): 33-56.
- [7] Fausch SC, Da Silva DM, Kast WM. Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells. *Cancer Res*, 2003, 63(13): 3478-3482.

(收稿日期:2007-10-17)

(本文编辑:尚淑贤)