

垂直喉部分切除术后喉狭窄瘢痕组织中炎症细胞表达及意义

吴 旋¹, 苏振忠¹, 蒋爱云¹, 古聪敏², 赖英荣², 雷文斌¹, 蔡 谦¹
(中山大学附属第一医院 1.耳鼻喉科医院, 2. 病理科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】通过喉狭窄瘢痕组织的病理学研究,了解炎症细胞在狭窄瘢痕组织表达及意义。【方法】垂直喉部分切除术后 2~3 月出现喉狭窄 10 例和未狭窄 16 例喉瘢痕肉芽组织为实验组及 10 例正常声带组织为对照组,分别进行苏木精-伊红及免疫组化染色,观察组织切片中中性粒细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞表达,并在全自动图像分析系统下进行细胞计数。【结果】喉狭窄瘢痕组织与非狭窄喉瘢痕组织、正常声带组织比较,固有层炎症细胞大量聚集,主要以巨噬细胞和 T 淋巴细胞为主。比较非狭窄喉瘢痕组织及正常声带组织,喉狭窄瘢痕组织的中性粒细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞数量均明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。【结论】喉狭窄瘢痕肉芽组织中存在明显炎症反应,持续炎症反应可能是导致喉狭窄瘢痕肉芽增生重要因素之一。

关键词: 垂直喉部分切除术; 喉狭窄 / 病理学; 炎症细胞

中图分类号: R767

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0545-04

Expression of Inflammatory Cells and Its Effects on Laryngeal Stenosis Scar after Vertical Partical Laryngectomy

WU Xuan¹, SU Zhen-zhong¹, JIANG Ai-yun¹, GU Cong-min², LAI Ying-rong², LEI Wen-bin¹, CAI Qian¹
(1. Hospital of Otolaryngology; 2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To explore the significance of the expression of inflammation cell in the laryngeal stricture scar by the study of the pathological features of laryngeal stenosis scar.【Methods】The laryngeal tissues were 10 human surgical specimens of laryngeal stenosis scar and 16 human surgical specimens of laryngeal scar which no-stenosis after vertical partial laryngectomy; 10 human normal vocal folds were control. Expression of neutrocytes, macrophage, and T lymphocyte were observed by Van Gieson and immunohistochemistry staining respectively in laryngeal tissue sections. The amount of inflammatory cells were analyzed with KONTRON IBAS 2.5 automatic image analysis system.【Results】The soakage density of neutrocytes, macrophage, and T lymphocyte were high in inhesion layer of laryngeal stenosis scar. The count of neutrocytes, macrophage, and T lymphocyte in laryngeal stenosis group were significantly higher than those in the no-stenosis scar group and normal vocal folds group ($P < 0.01$).【Conclusion】There were obvious inflammation reaction in the laryngeal stenosis scar. Persistence inflammation reaction may play an important role in the hyperplasia of laryngeal stenosis scar.

Key words: vertical partial laryngectomy; laryngeal scar/pathohistology; inflammatory cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):545-548]

手术创伤引起喉内瘢痕过度增生,导致喉狭窄是喉外科手术常见的并发症,虽然发病率不高,但临床处理较困难。对其发生原因,临床上大多数学者认为与喉支架大块缺损、喉腔组织大范围损伤而又修复不良有关。但从喉瘢痕组织形成的病理学角度去探索形成瘢痕的机理,从而明确产生

喉瘢痕狭窄个体差异原因的研究不多^[1,2]。喉部分切除术后瘢痕性喉狭窄的病理方面研究,国内外有关此方面报道也较少^[3]。本研究通过对垂直喉部分切除术后喉腔创面愈合不同转归(非狭窄与狭窄)的喉腔瘢痕肉芽组织病理学的研究,从病理学角度探索术后瘢痕性喉狭窄的发病机理。

收稿日期: 2005-11-12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(31733)

作者简介: 吴 旋(1974-),男,广东阳江人,博士,主治医师;苏振忠,教授,导师,通讯作者.E-mail:szzhz@163.com.cn

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 病例入选标准 非狭窄组: 声门型喉癌 T₂ 期患者行垂直喉部分切除术, 单侧胸骨舌骨肌瓣重建喉腔; 术后均成功拔管。随访期间未出现喉狭窄。喉狭窄组: 声门型喉癌 T₂ 期患者行垂直喉部分切除术, 单侧胸骨舌骨肌瓣重建喉腔; 术后早期能成功拔管, 术后 2~3 月时出现进行性呼吸困难, 需重新行气管切开, 喉狭窄组织病理活检已排除复发。内镜和影像学发现喉腔瘢痕肉芽堵塞, 喉腔狭窄。

1.1.2 临床及病理特征 非狭窄组: 中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科医院 2003 年 4 月-2005 年 4 月间收治的 16 例符合入选标准的喉部分切除术患者, 所有患者均为首次手术, 术前术后未做过放疗和化疗, 无远处转移, 年龄 46~71 岁, 平均年龄 59 岁, 病理类型: 高分化鳞癌 11 例, 中分化鳞癌 5 例。按照 UICC1997 年 TNM 分类和分期法对本组病例进行分期, T₂N₀M₀ 13 例, T₂N₁M₀ 3 例。随访时间为 6 月~12 月, 平均 10 月。

狭窄组: 收集中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科医院 1994 年 1 月-2005 年 6 月期间收治的符合入选标准的喉部分切除术后喉狭窄患者 10 例, 所有病例喉部分切除术前术后均未做过放疗、化疗、无远处转移, 年龄 42~69 岁, 平均年龄 56 岁。病理类型: 高分化鳞癌 7 例, 中分化鳞癌 3 例, 按照 UICC1997 年 TNM 分类和分期对 10 例进行分期, T₂N₀M₀ 8 例, T₂N₁M₀ 2 例。

1.2 标本提取及保存

正常对照组: 取自双声带麻痹行声带切除术的 10 例组织蜡块; 非狭窄组: 喉部分切除术后 2~3 月, 电子喉镜下钳取喉腔创面瘢痕肉芽组织(创面边缘、中央 2~3 处钳取), 经 40 g/L 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 储存备用; 狭窄组: 喉部分切除术后 2~3 月出现瘢痕性喉狭窄, 支撑喉镜或电子喉镜送检的瘢痕肉芽组织, 经 40 g/L 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 储存备用。

1.3 组织学观察

组织石蜡切片 HE 染色, 光镜下组织学观察。细胞计数: HE 染色组织切片, 每张切片于固有层随机取 8 幅视野, 采用德国 KONTRON IBAS 2.5

全自动图像分析仪对中性粒细胞进行计数, 在 400 倍显微镜下记录每屏幕(10814 μm²) 中的中性粒细胞数。

1.4 免疫组化检测组织中巨噬细胞(CD68)、T 淋巴细胞(CD3)

试剂: CD3 T 淋巴细胞鼠抗人单克隆抗体购自福建迈新生物公司, 产品编号 MAB-0030; CD68 巨噬细胞鼠抗人单克隆抗体购自福建迈新生物公司, 产品编号 MAB-0041; SP 免疫组化法检测试剂盒, 产品编号 KIT-9710, 购于福建迈新生物公司。SP 免疫组化方法: 组织石蜡切片, 60 恒温箱内烤片 1h。脱蜡和水化, 酒精梯度脱二甲苯, 蒸馏水清洗。抗原修复: CD3, 高温高压修复法处理; CD68, 胰酶消化, “Trypsin Kit”加胰酶液, 37 孵育 15 min, 蒸馏水洗 2 次。置于体积分数 3% H₂O₂ 溶液中室温下孵育 30 min, 去除内源性过氧化物酶活性, PBS 液洗。滴加正常山羊血清封闭, 37 孵育 10 min。滴加一抗, 4 过夜, PBS 清洗。滴加二抗(生物素化羊抗鼠抗体), 37 孵育 20 min, PBS 清洗。加三抗链霉菌抗生物蛋白--过氧化物酶溶液, 37 孵育 20 min, PBS 清洗。DAB 显色剂显色。苏木素复染, 烤干, 封片, 光镜下观察, 计数阳性细胞数。

1.5 统计学处理

计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 采用多个样本均数比较的方差分析(ANOVA)和 Student-Newman-Keuls 检验(SNK-q), P < 0.05 表示差异具有统计学意义, 统计在 SPSS11.0 软件下完成。

2 结果

2.1 组织学观察

正常对照组, 喉黏膜为复层鳞状上皮, 上皮下固有层可见胶原纤维, 下方有脂肪组织及黏液腺组织, 炎症细胞很少(图 1A)。非狭窄组, 创面大部上皮化, 上皮细胞层数增多。上皮下固有层可见炎症细胞浸润, 成纤维细胞和胶原纤维多。喉狭窄组, 部分组织可见上皮细胞, 上皮下固有层可见大量炎症细胞, 间质可见多量胶原纤维(图 1B)。

2.2 免疫炎症细胞表达分布情况

以细胞膜和/或细胞浆染成黄色或棕黄色为阳性细胞。正常对照组, 固有层少量中性粒细胞, 未见巨噬细胞、T 淋巴细胞浸润。非狭窄组, 固有层

中性粒细胞不多,巨噬细胞、T淋巴细胞浸润密度低,上皮浅层有少量分布(图2A,3A)。喉狭窄组,中性粒细胞浸润密度高,固有层组织内巨噬细

表1 3组不同类型炎症细胞计数

Table 1 The amount of inflammation cells in different groups ($\bar{x} \pm s$, cells/visual field)

Group	n	Neutrocyte cell	CD68 cell	CD3 cell
Control	10	4.5 \pm 1.89	5.7 \pm 4.34	7.3 \pm 4.17
No-stenosis	16	15.8 \pm 1.75	25.8 \pm 4.47	27.4 \pm 4.33
Stenosis	10	28.1 \pm 2.17	41.6 \pm 3.66	39.4 \pm 6.04

ANOVA of the amount inflammation cells in different groups: F=12.31, 8.46, and 10.17, respectively, all P < 0.05. Compared with control group and no-stenosis group, SNK-q test: all P < 0.01

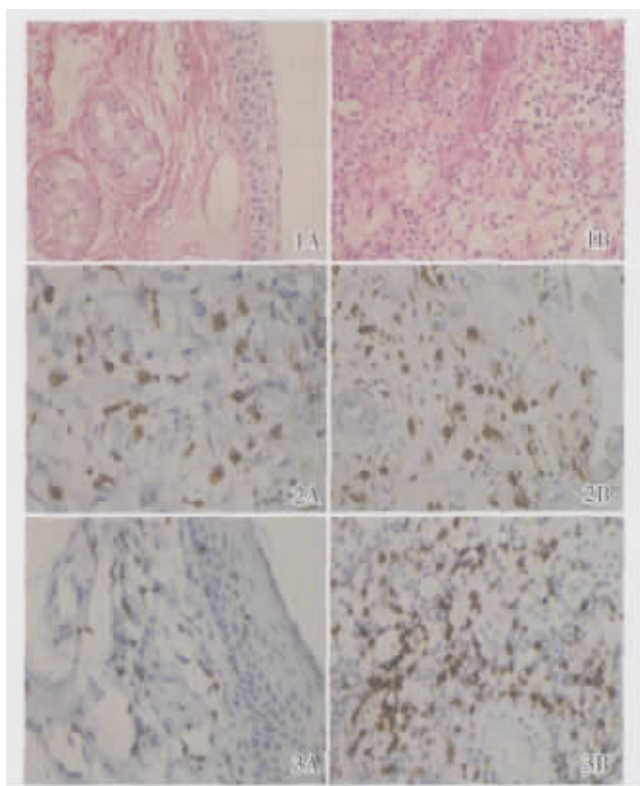


图1 对照和喉狭窄组喉组织炎症细胞 HE 染色

图2 非狭窄组和喉狭窄组喉组织 CD68 免疫组化染色

图3 非狭窄组和喉狭窄组喉组织 CD3 免疫组化染色

Fig.1 The inflammation cells in control larynx mucous membrane and stenosis scar

A: normal vocal fold; B: laryngeal stenosis scar, HE staining $\times 400$

Fig.2 The CD68 cells in no-stenosis scar and stenosis scar

A: no-laryngeal stenosis scar; B: laryngeal stenosis scar, immunohistochemical staining $\times 400$

Fig.3 The CD3 cells in no-stenosis scar and stenosis scar

A: no-laryngeal stenosis scar; B: laryngeal stenosis scar, immunohistochemical staining $\times 400$

胞分布广泛、密度高,尤其在部分细小血管周围,可见很多巨噬细胞围绕血管聚集现象,细胞体积较大,呈圆形或椭圆形(图2B)。T淋巴细胞分布趋势与巨噬细胞非常相似,较为丰富,但未见围绕血管浸润聚集现象,细胞体积明显比巨噬细胞小,呈圆形(图3B)。细胞计数及比较结果见表1。

3 讨论

研究表明,创面愈合起始的炎症反应阶段,中性粒细胞能分泌多种介质和酶,这些介质和酶有助于单核细胞、成纤维细胞和内皮细胞的趋化、迁移和基质结构的降解,刺激新生血管的再生和纤维组织的形成,从而影响创伤修复^[4]。

巨噬细胞在创面愈合早期炎症和免疫反应中作用复杂、功能多样,除吞噬清创作用外还产生多种活性介质、蛋白酶和生长因子,对成纤维细胞的增殖、胶原合成和血管形成起着重要调节作用^[5],是早期创面修复的关键细胞。研究资料已表明,T淋巴细胞对创伤愈合起重要的调节作用,在缺乏T淋巴细胞时创面愈合仍可进行,但完整的T淋巴细胞系统是确保创面正常愈合所必需的,T淋巴细胞在创面愈合中起主要的调节作用,不适当的T淋巴细胞增多在瘢痕及纤维化疾病中有重要作用,T淋巴细胞可通过释放细胞因子,激活巨噬细胞释放介质,从而诱导成纤维细胞的增生和胶原的合成^[6]。

本研究中,10例喉狭窄组患者,术后1月均能顺利拔除气管套管,术后2~3月渐出现吸入性呼吸困难,再次入院行气管切开,内镜检查发现重建喉腔创面水肿,瘢痕组织增生突向喉腔,喉腔明显狭窄。组织学检查,喉狭窄瘢痕肉芽组织部分可见上皮细胞,固有层可见大量炎症细胞、成纤维细胞,多量细胞外基质,毛细血管丰富。

本研究中,通过免疫组化染色,我们发现,即使是创面已上皮化,喉狭窄喉瘢痕组织中固有层炎症细胞仍大量聚集,主要以巨噬细胞和T淋巴细胞为主,中性粒细胞亦较多。而非狭窄组,喉腔创面上皮化后,组织中巨噬细胞、T淋巴细胞和中性粒细胞浸润已经不明显。经统计分析,喉狭窄瘢痕组织中巨噬细胞、T淋巴细胞和中性粒细胞数量较非狭窄组多,差异有统计学意义。Martin等^[7]发现增生性瘢痕组织中T淋巴细胞与瘢痕增生发

展有一定联系;赵焯德等^[9]亦证实,T淋巴细胞和巨噬细胞,在瘢痕增生组织内浸润均非常丰富。他们认为伤口上皮化愈合后局部免疫炎症细胞仍大量聚集是继发瘢痕增生的重要因素。本研究表明,结果与既往文献有关瘢痕肉芽增生中炎症细胞报道相似。

本研究结果表明,喉狭窄瘢痕肉芽组织中巨噬细胞、T淋巴细胞和中性粒细胞浸润显著多于非狭窄喉瘢痕肉芽组织。因此,我们认为喉部分切除术后喉腔创面愈合过程中,如果创面组织中炎症细胞过度增多,会影响喉腔创面愈合转归。喉狭窄瘢痕组织中巨噬细胞、T淋巴细胞和中性粒细胞局部聚集是喉瘢痕肉芽增生的重要因素。其形成机理可能是:术后呼吸道感染、细菌炎症刺激、胃食管返流等因素对创伤后的喉腔创面刺激可产生严重炎症反应。由于得不到有效控制,喉腔创面反复感染,炎症反应持续,中性粒细胞吸引大量巨噬细胞和T淋巴细胞至创面,巨噬细胞和T淋巴细胞通过释放大量细胞生长因子,刺激成纤维细胞合成和分泌胶原纤维、纤维连接蛋白和透明质酸等细胞外基质,细胞外基质大量沉积导致瘢痕增生。既往已有研究表明,局部应用环孢霉素A(Cyclosporine)治疗增生性瘢痕,增生瘢痕组织中T淋巴细胞明显减少,同时环孢霉素A也能显著抑制瘢痕组织中的成纤维细胞活性^[9]。

因此,在临床上设法控制喉腔创面组织内免疫炎症细胞过度浸润,以及抑制免疫炎症细胞活性功能,或许是防治喉瘢痕过度增生的有效途径。

参考文献:

- [1] DOOLIN EJ, TSUNO K, STRANDE LF, et al. Pharmacologic inhibition of collagen in an experimental model of subglottic stenosis [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1998,107(4):275- 279.
- [2] 蒋爱云, 苏振忠, 赖英荣, 等. 声带创伤性瘢痕的临床和病理研究[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25 (3): 284- 286.
- [3] 吴旋, 苏振忠, 蒋爱云, 等. 喉部分切除术后瘢痕性喉狭窄瘢痕组织中弹性纤维及胶原纤维分析[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(3): 312- 315.
- [4] CODY DT 2nd, FUNK GF, WAGNER D, et al. The use of granulocyte colony stimulating factor to promote wound healing in a neutropenic patient after head and neck surgery[J]. *Head Neck*, 1999, 21(2):172- 175.
- [5] PIERCE GF, MUSTOE TA. Pharmacologic enhancement of wound healing[J]. *Annu Rev Med*, 1995, 46: 467- 481.
- [6] LINARES HA. From wound to scar[J]. *Burns*, 1996,22 (5):339- 352.
- [7] MARTIN CW, MUIR IF. The role of lymphocytes in wound healing[J]. *Br J Plast Surg*, 1990, 43(6):655- 662.
- [8] 赵焯德, 牛星焘, 肖军军. 巨噬细胞、T淋巴细胞在增生性瘢痕组织中的分布研究[J]. *中华整形烧伤外科杂志*, 1997, 13 (6): 446- 448.
- [8] DUNCAN JI, THOMSON AW, MUIR IF. Topical cyclosporin and T lymphocytes in keloid scars [J]. *Br J Dermatol*, 1991, 124(1):109.

(编辑 刘清海)

(上接第 544 页 from page 544)

- a prospective study [J]. *Br J Dermatol*, 2003,149(3): 530- 534.
- [5] ZHAO G, FENG X, NA A, et al. Acute guttate psoriasis patients have positive streptococcus hemolyticus throat cultures and elevated antistreptococcal M6 protein titers [J]. *J Dermatol*, 2005,32(2):91- 96.
 - [6] PEREZ- LORENZO R, ZAMBRANO- ZARAGOZA JF, MOO- CASTILLO K, et al. IgG class antibodies to heat shock -induced streptococcal antigens in psoriatic patients[J]. *In J Dermatol*, 2003, 42(2):110- 115.
 - [7] 陈小红, 吴勤学, 王群, 等. 银屑病患者血清中抗 -溶血性链球菌及其相关提取物抗体状态的研究 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2002,31(6): 341- 343.
 - [8] 陈小红, 吴勤学, 王群, 等. 各型银屑病患者血清中

抗结核分支杆菌及其提取物抗体水平的研究[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2006, 22(1):14- 16.

- [9] 吴勤学, 陈小红, 张良芬, 等. 银屑病患者血清中检出抗分支杆菌及其有关抗原成分抗体[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2000, 16(1):16- 19.
- [10] 陈小红, 吴勤学, 王群, 等. -溶血性链球菌、结核分支杆菌提取物与银屑病患者血清发生免疫反应蛋白组分的研究[J]. *岭南皮肤病性病科杂志*, 2005,12(2):88- 90.
- [11] MCFADDEN J, VALDIMARSSON H, FRY L. Cross-reactivity between streptococcal M surface antigen and human skin[J]. *Br J Dermatol*, 1991,125(5):443- 447.
- [12] RAMBUKKANA A, DAS PK, KRIEG L, et al. Mycobacterial 65,000 MW heat- shock protient shares a carboxy -terminal epitope with human epidermal cytokeratin 1/2[J]. *Immunology*, 1992, 77(2):267- 276.

(编辑 刘清海)