

分离上皮的直接免疫荧光检查诊断口腔天疱疮

朱越广¹ 李伯有² 赵华婷¹

(中山医科大学孙逸仙纪念医院 1 口腔科 2 皮肤科免疫室; 广州, 510120)

摘要 目的: 对口腔粘膜损害缘分离的上皮组织作直接免疫荧光检查(DIF), 探讨应用该技术诊断天疱疮的可靠性。方法: 选择 22 例口腔寻常型天疱疮, 从患者口腔粘膜损害缘分离上皮, 制成冰冻切片作为 DIF 的底物, 用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的兔抗人抗体染色检查, 并与同一患者经传统活检取材的粘膜组织(含部分粘膜下层的完整粘膜块)的 DIF 检查作比较。结果: 分离上皮的 DIF, 22 例全部有 IgG 沉积在棘细胞间, 并有 3 例 IgA、1 例 IgM、13 例 C3 沉积在棘细胞间, 与传统活检法的粘膜组织 DIF 检查结果相同。结论: 从口腔粘膜损害缘分离的上皮组织作 DIF 检查, 用于诊断天疱疮其结果可靠, 操作简便易行, 创伤轻微。

关键词 荧光抗体技术; IgG; C3; 天疱疮/诊断; 口腔粘膜

中图分类号 R 781.5

Diagnosis of Oral Pemphigus by Direct Immunofluorescence on Separated Epithelium

Zhu Yueguang¹ Li Boyou² Zhao Huating¹

(1 Department of Stomatology 2 Department of Dermatology Immunology Laboratory, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510120)

Abstract Objective: To determine whether direct immunofluorescence (DIF) is reliable on the epithelial tissues separated from the edge of oral mucosal lesions for diagnosis of oral pemphigus. **Methods:** Twenty-two patients with oral pemphigus vulgaris were selected. Frozen epithelial sheets, separated from the edge of oral mucosal lesions in patients, were used as a substrate, staining with fluorescein isothiocyanate-conjugated rabbit anti-human antibody. The DIF tests of separated epithelial sheets were compared with that of twenty-two conventional biopsy specimens, which is a sheet of oral mucosa including a part of submucosal tissues, from the same patients. **Results:** In all twenty-two epithelial sheets, intercellular depositions of IgG were evident. IgA depositions were noted in three, IgM in one and C3 in thirteen out of these epithelial sheets. The findings of all conventional biopsy specimens on DIF were as the same as that of all separated epithelial sheets. **Conclusion:** It is easy to perform and reliable to diagnose pemphigus with epithelial tissues from the edge of oral mucosal lesions by DIF technique.

Subject headings fluorescent antibody technique; IgG; C3; pemphigus/diagnosis; mouth mucosa

天疱疮是一种严重的抗体介导的自身免疫性疱性疾病, 寻常型天疱疮(pemphigus vulgaris, PV)是最常见的类型^[1]。PV 多数先在口腔粘膜出现损害并局限于口腔可达数月甚至数年, 而皮肤损害的 PV 绝大多数也存在口腔损害^[2,3]。天疱疮早期诊断和治疗对预后十分重要^[4]。直接免疫荧光(direct immunofluorescence, DIF)是天疱疮早期诊断的重要方法^[1,5]。通常用作 DIF 检查的传统活检法(con-

ventional biopsy)要求包括部分损害与部分正常口腔粘膜并深达粘膜下层^[6]。但天疱疮口腔粘膜损害的传统活检法操作十分棘手, 切取的粘膜组织因发生上皮分离而需多次操作的情况时有发生。为此, 我们从 1993 ~ 1998 年, 采用口腔损害缘分离的上皮组织作 DIF 检查来诊断天疱疮, 并与传统活检法的粘膜组织 DIF 检查作比较。

1 材料和方法

1.1 病例

22 例损害局限在口腔的寻常型天疱疮, 临床和病理诊断一致, 服用肾上腺皮质激素或免疫抑制剂的患者不包括在内。前后共选病例 22 例(为本院口腔科 1993~1998 年就诊患者), 其中男 10 例, 女 12 例, 年龄 31~60 岁, 平均 39.5 岁。

1.2 切取上皮组织

口腔局部阻滞麻醉后, 用手术刀从患者口腔粘膜损害缘划切一梭形, 约 5 mm×8 mm 大小, 范围包括部分损害和部分正常粘膜, 切割深度仅透粘膜层即可, 然后用牙科探针从损害缘分离划切的梭形粘膜上皮块(天疱疮患者的口腔粘膜很易分离), 再用无齿镊取出上皮分离片。术创经止血后, 用确实舒松口腔膏涂盖即可。

1.3 切取粘膜组织(传统活检法)

口腔局部阻滞麻醉后, 用手术刀切取约 5 mm×8 mm 楔状梭形粘膜块, 包括部分口腔损害和部分正常粘膜, 深度达粘膜下层。创口施行无张力缝合。

1.4 DIF 操作步骤

标本速冻后应用冰冻切片机作 4 μm 的冰冻切片, 按常规做直接免疫荧光染色。所用荧光抗体系异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记兔抗人 IgG、IgA、IgM、C3 抗体(丹麦 DAKO 公司产品), FITC/Protein 之比为 2.3。冰冻切片加荧光标记的抗体染色后置 37 °C 温箱内孵育 30 min, pH 7.2 PBS 洗涤, 在 Olympus BHF 荧光显微镜下观察, 确定沉积的免疫复合物种类和部位, 以上皮细胞间出现亮绿染色为阳性。

2 结果

2.1 两种方法切取粘膜组织的结果

22 例上皮组织的分离、切取全部 1 次性顺利完成。22 例传统活检法的粘膜组织, 在唇粘膜部位取材的 8 例标本中, 7 例 1 次完成切取, 1 例标本 2 次完成, 其原因是切取粘膜块后出现上皮完全分离。在颊粘膜取材的 14 例标本中, 9 例 1 次性完成切取, 5 例因上皮分离需 2 次完成。所有经 2 次切取的标本, 都需另选部位切取。以上两种标本的活

检部位及其例数见表 1。

表 1 22 例口腔寻常型天疱疮患者活检标本资料

Table 1 Cases of biopsy specimens obtained from 22 patients with oral pemphigus vulgaris

Biopsy site	No. of ET	No. of MT
Buccal mucosa	11	14
Tongue mucosa	3	0
Labial mucosa	8	8
Total	22	22

ET= Epithelial tissues, which was separated from oral lesions; MT= Mucosal tissues, which was a sheet of oral mucosa including a part of sub-mucosal tissues, cut by conventional biopsy procedure

2.2 损害缘分离的上皮组织 DIF 检查结果

22 例标本 IgG 全部阳性, 抗体沉积在棘细胞间呈网状(如图 1)。IgA、IgM、C3 也有阳性, 例数各不相同, 见表 2。此外, 部分标本出现两种或两种以上抗体沉积的情况: 其中 1 例出现 IgG、IgA、IgM、C3 共同沉积; 3 例 IgG、IgA、C3 共同沉积; 13 例 IgG、C3 共同沉积。

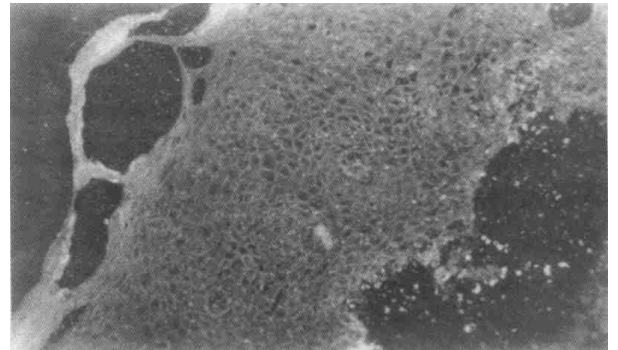


图 1 PV 患者损害缘分离上皮的 DIF 结果

Fig. 1 DIF staining of the epithelial tissue from the edge of an oral lesion in a patient with PV intercellular deposition of IgG can be seen (intraepithelial fishnet pattern, ×100)

表 2 22 例上皮分离片活检标本 DIF 检查结果

Table 2 Results of DIF on 22 biopsy specimens of separated epithelium sheets

Antibody	Positive cases	Rate(%)
IgG	22	100
IgA	3	13.6
IgM	1	4.5
C3	13	59.1

2.3 传统活检法的粘膜组织 DIF 检查结果

与损害缘分离的上皮组织 DIF 检查的结果相同。

3 讨论

天疱疮患者能产生抗复层鳞状上皮细胞表面抗原的特异性自身抗体——天疱疮抗体,并结合在上皮细胞表面。目前认为检查天疱疮抗体是诊断天疱疮的较可靠方法^[7]。天疱疮抗体与上皮细胞表面抗原结合,引起细胞物质分解破坏,导致棘细胞间的解离,其作用部位与组织病理原发损害部位完全一致^[8]。作为荧光抗体技术的 DIF,可准确地观察到天疱疮抗体与抗原特异性结合的部位,因而诊断天疱疮较可靠。本研究 22 例口腔损害缘分离的上皮组织 DIF 检查全部有 IgG 沉积在棘细胞间,阳性率 100%,与传统活检法的粘膜组织 DIF 检查结果一致。近年 Feliciani^[9] 等报道用皮损缘的表皮分离片作 DIF 检查诊断天疱疮,与口腔损害缘分离的上皮组织 DIF 检查结果相似。对 PV 作 DIF 检查,作为 DIF 底物的粘膜组织,只需基底层以上的上皮组织(可不包括基底层)就足以观察到免疫复合物沉积在棘细胞间特有的网状荧光,从而作出确诊。PV 病理特点是在基底细胞层以上的棘细胞层出现松解,而基底细胞层本身不出现松解。从组织学角度理解,PV 口腔损害缘分离的上皮组织,实际上是包括了除基底层外的绝大部分棘细胞层的上皮组织。此外,分离上皮还包括了部分正常上皮组织,因而组织细胞的活性应与传统活检法的粘膜组织细胞活性相似,从而减少了对 DIF 检查的影响。

用作 DIF 底物的口腔粘膜,传统活检法包括部分粘膜下层组织的完整粘膜,切取范围包括部分正常粘膜和部分损害。毫无疑问,传统活检法的组织适用于大多数软组织疾患的组织学检查,但天疱疮患者由于棘细胞层松解的原因,传统活检法的粘膜难免引起上皮分离。这种上皮分离不但会发生在已切取的粘膜标本身,也会出现在活检部位周缘粘膜。为获取完整的粘膜,操作者可能需超过一个以上的活检部位。由此会造成人为的损害扩大,增加创伤的程度,增加患者的痛苦。在本研究里,传统活检法标本一次性切取成功的多数是在操作受限较少的唇粘膜,而在操作受限较多的颊粘膜,二次切取才完成活检的不少。与传统活检法相比,分离

上皮的切取操作容易得多,操作极少出现失败,创伤轻微,患者容易接受。本研究分离上皮的标本全部一次性切取成功。

DIF 检查不但对天疱疮诊断重要,而且还可作为监测病情变化和指导治疗的可靠的客观指标^[10]。Ratnam 等^[10] 曾对天疱疮临床消退期患者作 DIF 检查,结果所有 DIF 阳性患者,中断治疗后 3 个月病情复发。用 DIF 技术监测病情,对于口腔天疱疮更为重要,因为局限于口腔的早期天疱疮,患者血液中较难检测到天疱疮的抗体^[3]。如果采用上皮分离片作 DIF 检查来监测天疱疮病情,因其操作容易,创伤轻微,可反复多次活检,使患者可能较容易接受。

参 考 文 献

- 1 Becker B A, Gaspari A A. Pemphigus vulgaris and vegetans. *Dermatol Clin*, 1993, 11(4): 453
- 2 Eversole L R. Immunopathology of oral mucosal ulcerative, desquamative, and bullous diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1994, 77(6): 555
- 3 Robinson J C, Lozada-Nur F, Frieden I. Oral pemphigus vulgaris: a review of the literature and a report on the management of 12 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1997, 84(4): 349~55
- 4 张水龙, 曹宏康, 周曾同. 免疫金银染色法检测天疱疮损害组织中的免疫沉积物. *上海免疫学杂志*, 1996, 16(2): 108
- 5 Helander S D, Rogers R D. The sensitivity and specificity of direct immunofluorescence testing in disorders of mucous membranes. *J Am Acad Dermatol*, 1994, 30(1): 65
- 6 Siegel M A, Baltimore M D. Intraoral biopsy technique for direct immunofluorescence studies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1991, 72(6): 681
- 7 Korman N P. Continuing medical education. *J Am Acad Dermatol*, 1988, 18(10): 1219
- 8 刁庆春, 刘荣卿, 唐书谦. 天疱疮、类天疱疮自身抗体检测的临床意义. *中华皮肤科杂志*, 1988, 21(5): 283
- 9 Feliciani G, Pour S M, Toto P, Coscione G, *et al.* Direct immunofluorescence diagnosis of pemphigus without biopsy. *J Cutan Med Surg*, 1998, 2(4): 209
- 10 Ratnam K V, Pang B K. Pemphigus remission value of negative direct immunofluorescence in management. *J Am Acad Dermatol*, 1994, 30(4): 547

(1999-03-12 收稿 1999-05-12 修回)