

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00418

## 移植肾内新生淋巴管的病理学特征及其临床意义

吴卫真<sup>1</sup>, 陈忠华<sup>1</sup>, 朱凌峰<sup>2</sup>, 王 栋<sup>2</sup>, 叶永峰<sup>2</sup>, 谭建明<sup>2\*</sup>

1. 华中科技大学同济医院器官移植研究所, 武汉 430030
2. 南京军区福州总医院全军器官移植中心, 福州 350025

**[摘要]** **目的:**探讨移植肾内新生微淋巴管的病理学特征,并分析其临床病理学意义。**方法:**对45例肾移植患者移植肾组织标本,采用podoplanin单抗二步法免疫组化标记移植肾内微淋巴管,观察微淋巴管形态学及分布特点,并计算淋巴管密度(Lymphatic vessel density, LVD),根据不同病理学诊断进行比较分析,并与正常肾组织作对照。**结果:**功能稳定的移植肾组织中微淋巴管数量较少,形态上与正常肾组织相同;急性排斥的移植肾内微淋巴管数量相对较多,管腔大小不等,多分布在末梢小动脉周围;慢性/硬化性移植肾的微淋巴管数明显增多,管腔扩张,扭曲,其周围多见局灶性单核细胞浸润。肾功能稳定的移植肾组织LVD平均值最低(1.26±0.27),与急性排斥和慢性/硬化性移植肾组织的比较均有统计学差异( $P<0.05$ );慢性/硬化性移植肾组织LVD平均值最高(20.76±5.30),高于其他各组( $P<0.01$ );肾功能稳定的移植肾组织与正常肾组织比较无差异。**结论:**移植肾内存在淋巴管增生的现象,并与排斥反应有关,在不同类型的排斥中淋巴管增生有不同的病理特点。

**[关键词]** 淋巴管;肾移植;病理学;淋巴管密度;podoplanin

**[中图分类号]** R 692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0418-05

### Pathologic characteristics of lymphangiogenesis in renal transplants and its clinical implication

WU Wei-zhen<sup>1</sup>, CHEN Zhong-hua<sup>1</sup>, ZHU Ling-feng<sup>2</sup>, WANG Dong<sup>2</sup>, YE Yong-feng<sup>2</sup>, TAN Jian-ming<sup>2\*</sup>

1. Institute of Organ Transplantation, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
2. Institute of Organ Transplantation, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the pathologic characteristics of lymphangiogenesis in renal transplants and to analyze its clinical implication. **Methods:** The morphology and distribution of lymphangiogenesis were investigated by a biotin-streptavidin horseradish-peroxidase method with anti-podoplanin monoclonal antibody in 45 archival biopsies. The lymphatic vessel density (LVD) was calculated and the results were compared between different pathologic types and with the normal renal tissues. **Results:** Fewer podoplanin-positive lymphatic vessels were identified in the biopsies from the renal transplants with normal function, and the transplants had a similar morphological profile as normal renal tissues. More podoplanin-positive lymphatic vessels were observed in the transplants suffering acute rejection episode; the vessels mainly located around peripheral arteriole with different lumen sizes. Transplants with chronic rejection had the most podoplanin-positive lymphatic vessels with focal mononuclear infiltration and distended/distorted lymphatic vessels. The lowest mean LVD (1.26±0.27) was observed in the biopsies from transplants with normal function, which was significantly different from those in the acute rejection and chronic rejection groups ( $P<0.05$ ). The highest mean LVD was found in the chronic rejection group (20.76±5.30), which was significantly higher than those of the other 2 groups ( $P<0.01$ ); no significant difference was observed between the transplants with normal function and the normal kidney. **Conclusion:** Lymphatic neoangiogenesis occurs in the renal transplant and its pathologic characteristics differs in the transplants with different rejection types.

**[KEY WORDS]** lymphatic vessels; kidney transplantation; pathology; lymphatic vessel density; podoplanin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(4): 418-422]

**[收稿日期]** 2007-07-10 **[接受日期]** 2008-02-25

**[基金项目]** 福建省自然科学基金(2006J0117), Supported by Natural Science Foundation of Fujian Province(2006J0117).

**[作者简介]** 吴卫真, 硕士, 主任医师, 硕士生导师. E-mail: wwzhen@medmail.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0591-28859398, E-mail: tanjm156@yahoo.com.cn

淋巴系统是人类循环系统的重要组成部分,淋巴管生成(lymphangiogenesis)参与体内许多生理和病理过程,如胚胎发育、伤口愈合、组织和器官再生、肿瘤生长和转移等<sup>[1-3]</sup>。然而,有关移植肾内淋巴管生成的研究国内外报道较少,其与移植肾免疫排斥的相关性仍缺乏深入研究。因此,本研究采用淋巴管上皮细胞特异标志物 podoplanin(肾小球足细胞膜黏蛋白)单抗染色观察移植肾组织的微淋巴管,分析移植肾组织中淋巴管的分布及病理特点,并结合临床病理资料分析淋巴管增生与移植肾免疫病理状态的关系。

## 1 材料和方法

1.1 病理样本及临床资料 45例移植肾组织库存石蜡块切片,其中肾穿刺活检标本38例,移植肾切除组织标本7例,来自45例肾移植患者。其中男33例,女12例,年龄21~69岁,中位年龄41岁。移植肾标本获取时间为移植术后1~97个月。45例标本行H-E染色后,以Banff标准<sup>[4]</sup>进行病理学诊断:肾功能稳定15例,急性细胞性排斥反应15例,慢性/硬化性移植肾肾病15例。另取15例正常肾脏组织库存石蜡块切片作为对照(样本来自于急性肾外伤后肾切除样本)。

1.2 淋巴管免疫组化染色 EnVision™ plus 免疫组化二步染色(试剂盒购自福州市迈新生物公司,编号kit-9903)。石蜡切片脱蜡和水化后,PBS(pH 7.4)冲洗3次,柠檬酸盐抗原修复液高温高压修复抗原(120℃,高压锅,喷气2 min),3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液阻断内源性过氧化物酶,PBS冲洗3次后,先后加滴50 μl 鼠抗 podoplanin(1:50 稀释,美国 Angiobio Co.,编号11-003)、50 μl 聚合物增强剂(试剂A)和50 μl 酶标抗鼠聚合物(试剂B),PBS冲洗,每张切片加滴100 μl 新鲜配制的DAB显色液,显微镜下观察3~10 min,阳性显色为棕色。蒸馏水冲洗后,苏木精复染,PBS冲洗返蓝20 min,切片经梯度乙醇脱水干燥(二甲苯透明),中性树胶封片。

1.3 淋巴管形态学观察及淋巴管密度(LVD)的计算 由内皮细胞形成的条状、隙状等孤立或簇状结构呈棕黄染色及有管腔者为 podoplanin 阳性管腔, podoplanin 阳性管腔视为淋巴管。淋巴管计数在盲法下进行,采用 Kerjaschki 等<sup>[5]</sup>的方法,即每张切片

由2名病理医师分别计数,计算LVD。计数方法:先于低倍光镜(40倍和100倍)下确定3个淋巴管着色最密集的区域(hotpot,热点),然后在200倍视野下计淋巴管,取3个视野的均值作为LVD。两名医师计数差10%以上者重新计数。

1.4 统计学处理 所有数据应用SPSS 12.0软件分析处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料的样本多组两两比较用 $q$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 正常肾组织和移植肾标本淋巴管标记结果

2.1.1 正常肾组织 15例正常肾组织样本中均可见零散的 podoplanin 染色阳性的淋巴管管腔,为棕红色管腔;淋巴管多分布于肾小动脉周围,管径等大,较细,管腔内及周围未见有炎性细胞;邻近充满红细胞的毛细血管上皮细胞未着色(图1)。

2.1.2 肾功能稳定的移植肾组织 移植肾内可见 podoplanin 染色阳性的淋巴管(图2A),数量较少,多伴随肾末梢小动脉零星分布,管径等大,较细,未见深入到肾小球和肾小管周边间质;管腔内及周围未见有炎性细胞浸润。2例肾移植早期(3个月以内)的移植肾组织内可见少量炎性细胞浸润,微淋巴管内未见有炎性细胞浸润(图2B)。

2.1.3 急性细胞性排斥反应的移植肾组织 10例中度急性排斥反应标本中(Banff II型), podoplanin 阳性微淋巴管数量相对增多(图3A),多分布在末梢小动脉周围,未见深入到肾小球和肾小管周边间质;淋巴管管腔大小不等,腔内可见单核炎性细胞,肾小管间质可见炎性细胞浸润,炎性细胞呈散在分布。5例重度急性排斥(Banff III型)标本中,可见明显的炎性细胞浸润,同样呈散在分布,淋巴管腔内多见单核炎性细胞(图3B)。

2.1.4 慢性/硬化性移植肾组织 8例 Banff II型慢性/硬化性移植肾的标本中, podoplanin 阳性淋巴管数量明显增多(图4A),管腔扩张,扭曲明显,并且深入到肾小管周边的间质内,腔内可见炎性细胞,肾间质中炎性细胞浸润明显,炎性细胞呈局灶性分布,多见于淋巴管周边。7例 Banff III型慢性/硬化性移植肾的标本中,淋巴管腔内可见活性炎性细胞,淋巴管周局灶性炎性细胞现象常见,肾小管间质可见组织纤维化改变(图4B、4C)。

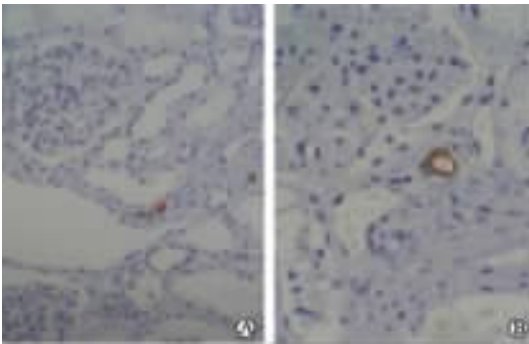


图 1 正常肾组织 podoplanin 染色结果

Fig 1 Podoplanin expression in normal kidney cortex

A: No significant proliferation of lymphatic vessels was observed in the normal kidney cortex. Original magnification:  $\times 200$ . B: In a normal human kidney, a small amount of podoplanin-expressing lymphatic capillaries were observed without interstitial mononuclear infiltration. Original magnification:  $\times 400$

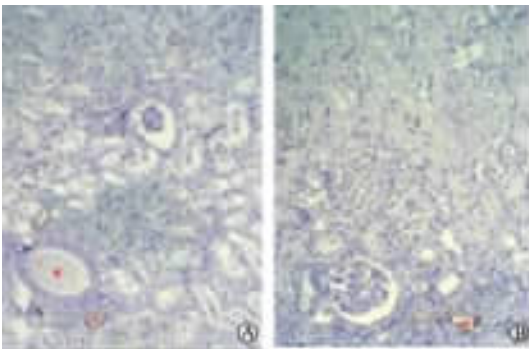


图 2 功能稳定的移植肾组织 podoplanin 染色结果

Fig 2 Podoplanin expression in renal grafts with stable function

A: A small amount of lymphatic vessels were found around arterioles minor-sized arteries in the renal grafts with stable function; B: In the renal grafts with stable function, a small amount of podoplanin-expressing lymphatic capillaries and same caliber vessels were observed without interstitial mononuclear infiltration. Original magnification:  $\times 200$

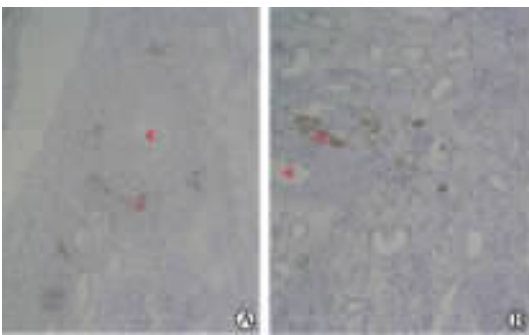


图 3 急性细胞性排斥反应的移植肾组织 podoplanin 染色结果

Fig 3 Podoplanin expression in kidney with acute rejection

A: In the kidney with acute rejection (Banff II), numerous podoplanin-expressing lymphatic capillaries were found around arterioles; B: In the kidney with acute rejection (Banff III), lymphatic vessels and interstitial mononuclear infiltration were observed. Original magnification:  $\times 200$

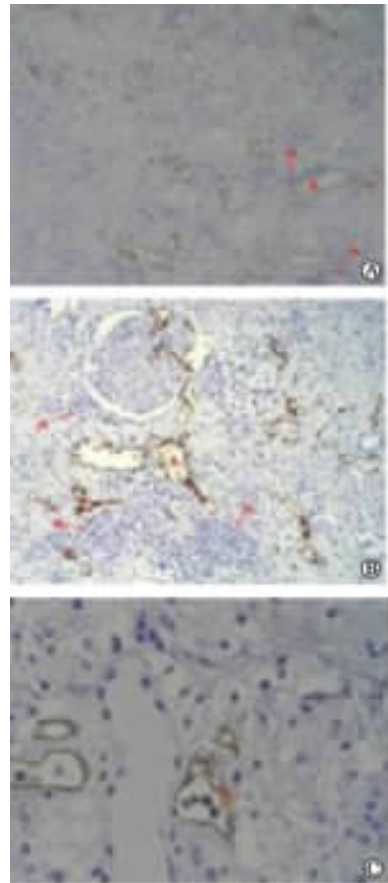


图 4 慢性/硬化性移植肾肾病组织 podoplanin 染色结果

Fig 4 Podoplanin expression in renal grafts with chronic allograft nephropathy (CAN)

A: In the renal grafts (Banff II) with chronic allograft nephropathy (CAN), numerous podoplanin-expressing lymphatic capillaries were found with larger caliber vessels. Original magnification:  $\times 200$ . B: In the renal grafts (Banff III) with CAN, lymphatic microvessels were found deep into the tubulointerstitial space with nodular mononuclear infiltration. Original magnification:  $\times 200$ . C: The lymphatic microvessels holding lymphocytes were found in the renal grafts (Banff III) with CAN. Original magnification:  $\times 400$

2.2 不同病理类型 LVD 值的比较 15 例正常肾组织 LVD 平均值为  $1.09 \pm 0.30$  (0~2.18), 在移植肾功能稳定组中 LVD 平均值为  $1.26 \pm 0.27$  (0.21~3.31), 两组比较差异无统计学意义。急性排斥组中 LVD 平均值为  $3.33 \pm 0.92$  (2.41~4.10), 与前面两组比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。慢排组中平均值为  $20.76 \pm 5.30$  (12.54~29.33), 与其他各组间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

随着组织配型的广泛应用和新型免疫抑制剂的

不断涌现,肾移植的早期存活率已得到明显的提高。但肾移植的长期存活仍不令人满意,其原因是多方面的,其中急性排斥反应的复发和慢性排斥反应的发生是移植肾后期失功的主要原因。由于其机制尚不明确,以至于几乎没有令人满意的治疗手段。因此,对排斥反应机制探索一直是器官移植学科研究的重点。

淋巴管生成(或称微淋巴管增生)为组织既存淋巴管外新淋巴管的生成<sup>[6-7]</sup>,常见于肿瘤组织及外伤修复组织中,但由于淋巴管上皮细胞与毛细血管上皮细胞在组织学上难以鉴别,因此,一直未能确切了解新生微淋巴管的形态分布和功能作用。Schoppmann等<sup>[8]</sup>应用抗 podoplanin 抗体标记微淋巴管上皮细胞获得成功,具有很强的特异性。对淋巴系统而言,podoplanin 只染由单层内皮衬托的微淋巴管,而有外周细胞或平滑肌细胞的大淋巴管以及淋巴结的高内皮小静脉均不染色。目前有关新生淋巴管的研究主要集中在肿瘤生长及淋巴转移上<sup>[1-3]</sup>。比较明确的是,许多人类肿瘤组织内存在淋巴管增生,并且与肿瘤淋巴转移显著相关,包括乳腺癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞癌、前列腺癌、胃癌、结肠癌、甲状腺乳头状癌、宫颈癌等<sup>[9-10]</sup>。此外在受损皮肤的修复、胚胎发育及组织器官再生中也发现淋巴管的增生现象,但其作用和机制尚不十分清楚<sup>[11]</sup>。Jussila等<sup>[12]</sup>证实在急性炎症、致病微生物感染、良性组织增生等组织中,不存在微淋巴管增生现象,只是出现了微淋巴管扩张等功能性改变。

由于淋巴系统是重要的免疫器官,它既是免疫细胞的运输通道又在调节免疫细胞组织浸润中起重要作用,提示其与移植免疫反应可能的密切相关。肾移植手术中,供肾在移植到受者前,通常已将肾脏周围的淋巴管清除,移植后的肾脏与受者已无淋巴管相通。那么肾移植术后移植肾内的淋巴管系统发生了什么变化?淋巴管的变化与移植肾排斥反应有何关联?移植肾内炎症细胞浸润有无新的通路?这些都成为困扰移植科医师的问题,且目前国内外此类研究较少。

Kerjaschki等<sup>[5]</sup>在检查移植肾穿刺病理组织时,发现有10%的样本存在大量的微淋巴管增生,其密度高于正常肾脏的50倍以上,他们认为微淋巴管增生是肾移植后一个特有的现象,可能与移植肾的免疫反应有关。本研究再次证实移植肾内存在微

淋巴管增生现象,针对其病理特点的观察中可以发现:在正常肾脏组织、正常移植肾组织微淋巴管的密度相差不大,其主要围绕在小动脉周围,不会进入肾小球及小管间质;急性排斥反应的移植肾组织中淋巴管增生相对较多,但还是主要分布在小动脉周围。上述病理现象表明,移植肾内微淋巴管增生与移植肾内的免疫反应有着显著关联,并且推测微淋巴管的增生程度与急性排斥程度有关。而最为明显的微淋巴管增生发生在慢性/硬化性移植肾肾病组织中,其病理特点亦不同于其他组织,表现为微淋巴管主要集中在间质内浸润的局灶性单核细胞群周围,其管腔进一步扩大,扭曲,并且深入到肾小管周边的间质内,管腔内多见单核炎性细胞,淋巴管周边可见组织纤维化改变。这一现象提示移植肾内微淋巴管增生与移植肾内慢性排斥反应有着密切的关系。已有大量病理研究<sup>[13-15]</sup>发现,移植肾发生急性排斥反应后,部分移植肾内会长期存在局限性免疫细胞浸润,这些细胞多为CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>细胞和一些巨噬细胞,这些免疫细胞可能是经免疫抑制治疗后,移植肾内广泛免疫细胞浸润后留下的“残余”,此类移植肾以后出现急性排斥复发及发展为慢性排斥反应的概率明显高于其他患者。虽然移植肾内长期存在局灶性免疫细胞浸润的机制尚不明了,但可以认为这一病理现象与微淋巴管增生有显著关联,至于两者之间的生成机制,以及它们对慢性移植肾肾病的发生、发展有何影响仍有待进一步研究。

本研究进一步将移植肾内LVD与不同Banff病理诊断进行比较,结果发现正常肾组织与肾功能稳定的移植肾之间的LVD值没有显著差别,肾功能稳定的移植肾与发生排斥的移植肾之间差别明显,慢性/硬化性移植肾组织中LVD值远高于正常组及急性排斥反应组,尤其在因移植肾慢性失功而切除的肾脏中,微淋巴管增生更为显著。这些结果提示,移植肾内淋巴管增生在排斥反应的发生、发展中起作用,尤其在慢性排斥的发生及其病理改变进程中起重要作用,与Stuht等<sup>[16]</sup>观点类似。

本研究例数尚少,与之对比的临床指标尚显不足,仍需进一步的大样本研究,但从所得出的结果分析,检测移植肾内微淋巴管的形态、分布及计算LVD值可能有助于对排斥反应的鉴别诊断,它可能可作为移植肾排斥反应及其分级的一项病理学检测指标用于临床。尤其是微淋巴管与慢性移植肾肾病

有显著关联,对它的病理检测可作为对移植肾慢性免疫损伤的一种判断,由此来评估预后,并指导慢性移植肾失功的治疗选择。移植肾的 Banff 病理诊断标准一直是应用最广的病理学诊断方法<sup>[4]</sup>,从病理诊断上讲,发现移植肾内有明显的微淋巴管生成,可能预示着排斥的持续存在,并提示慢性移植肾肾病的发生,这有利于进一步对移植肾病理做更为细致的分类,并指导临床抗排斥及预防慢性移植肾肾病的治疗。对移植物淋巴管增生调控机制的研究可能会揭示移植排斥的发生、发展及转归的新机制;在抗排斥治疗上,抗移植物淋巴管形成可望成为对抗移植排斥病损的新治疗靶点。

### [参考文献]

- [1] Mäkinen T, Alitalo K. Lymphangiogenesis in development and disease[J]. *Novartis Found Symp*, 2007, 283: 87-98.
- [2] Wong A K, Schonmeyer B H, Singh P, Carlson D L, Li S, Mehrara B J. Histologic analysis of angiogenesis and lymphangiogenesis in acellular human dermis[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2008, 121: 1144-1152.
- [3] He X W, Yu X, Liu T, Yu S Y, Chen D J. Vector-based RNA interference against vascular endothelial growth factor-C inhibits tumor lymphangiogenesis and growth of colorectal cancer in vivo in mice[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121: 439-444.
- [4] Racusen L C, Solez K, Colvin R B, Bonsib S M, Castro M C, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology[J]. *Kidney Int*, 1999, 55: 713-723.
- [5] Kerjaschki D, Regele H M, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 603-612.
- [6] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 10931-10934.
- [7] Paavonen K, Poulakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156: 1499-1504.
- [8] Schoppmann S F, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(4A): 2351-2355.
- [9] Reis-Filho J S, Schmitt F C. Lymphangiogenesis in tumors: what do we know[J]? *Microsc Res Tech*, 2003, 60: 171-180.
- [10] Karpanen T, Alitalo K. Lymphatic vessels as targets of tumor therapy[J]? *J Exp Med*, 2001, 194: F37-F42.
- [11] Ristimäki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 8413-8418.
- [12] Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82: 673-700.
- [13] McLaren A J, Fuggle S V, Welsh K I, Gray D W, Morris P J. Chronic allograft failure in human renal transplantation: a multivariate risk factor analysis[J]. *Ann Surg*, 2000, 232: 98-103.
- [14] van Besouw N M, van der Mast B J, de Kuiper P, Smak-regoor P J, Vaessen L M, Ijzermans J N, et al. Down-regulated donor-specific T-cell reactivity during successful tapering of immunosuppression after kidney transplantation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 128: 388-393.
- [15] Codarri L, Vallotton L, Ciuffreda D, Venetz J P, Garcia M, Hadaya K, et al. Expansion and tissue infiltration of an allospecific CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> IL-7 R alphahigh cell population in solid organ transplant recipients[J]. *J Exp Med*, 2007, 204: 1533-1541.
- [16] Stuh T, Gwinner W, Franz I, Schwarz A, Jonigk D, Kreipe H, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human renal allografts: results from sequential protocol biopsies[J]. *Am J Transplant*, 2007, 7: 377-384.

[本文编辑] 贾泽军

### · 消 息 ·

## 上海成立造口护理师学校

2008年3月18日,上海市护理学会和上海交通大学联合成立上海国际造口护理师学校,并举行了开班典礼。会上世界造口师协会主席伊丽莎白·英格利希女士宣读了《上海国际造口治疗师培训项目资质认证证书》。上海护理学会、上海交通大学、上海市卫生局、上海市科技协会到会领导先后讲话祝贺。尊为“中国造口之父”的83岁高龄的肛肠外科专家喻德洪教授也到会致贺词。造口护理师学校的成立,将使造口护理事业得到更快的发展,使造口患者得到更多的关爱。

(上海造口联谊会供稿)