

沉淀白喉类毒素免疫大白鼠淋巴結的 組織化学变化及細胞反应

楊貴貞* 彭大才* 張紹倫* 高 進**
沈宗英** 李兴春* 謝少文***

現在大家都公認产生抗体的器官为淋巴样組織^[1,2], 在抗原作用下, 这些組織所发生的細胞化学变化, 近来有許多研究報告。首先引起注意的是, 免疫动物組織中的核酸含量与抗体蛋白合成的关系, 此外, 也研究了組織內 PAS 反应等变化^[3-6]。

本文报告对免疫动物的淋巴結細胞反应的观察, 着重在 1 次与 2 次免疫反应, 免疫后的不同時間以及在細菌脂多糖的作用下細胞形态学及組織化学变化和抗体效价关系。

材 料 及 方 法

免疫用抗原 为长春生物制品所生产的磷酸铝吸附白喉类毒素, 絮状反应单位 (Lf) 40/毫升。

实验动物 为本校饲养园之健康大白鼠, 体重 120 克左右。淋巴結的组织化学观察, 共用了 18 只大白鼠, 于第 2 次免疫后 24、48 小时、7 和 10 天各剖检动物 3 只, 并用 3 只正常动物作为对照。动物剖检时, 采取血液、膈窝、腋下淋巴結和脾脏标本, 进行组织切片。按常规方法处理标本, 切片后, 用苏木精-伊红和甲绿-派咯宁染色^[7], 观察组织学和组织化学改变, 并以 PAS 反应检查多糖类^[8]。

淋巴結的細胞反应共观察了 9 组动物, 每组 6 只。除对照组外, 8 个实验组中 1 次及 2 次免疫者各有 4 组。每 4 组中各有 2 组为正常免疫, 另 2 组用脂多糖处理。条件相同的每 2 组又皆分別于 4 天及 7 天取血。細菌脂多糖系卫生部生物制品研究所制备。每只大白鼠与抗原同时注入脂多糖 8 微克。

免疫方法及观察指标 于两侧后脚掌, 每次注入 8 Lf 抗原, 共免疫两次, 间隔 14 天。观察淋巴結涂片中的細胞类型(网状細胞、过渡浆細胞¹⁾、浆細胞等)的变化为主。并按照 Boyden 及 Stavitsky 的血凝方法测定血清及淋巴組織中的抗体含量。淋巴結取出后称重, 以 1:20 加入盐水, 剪碎, 然后放置 -30℃ 冰箱中冻结融化, 取上清液进行滴定。以“2+”为试验终点。細胞类型变化的观察, 乃取局部注入抗原的膈窝淋巴結及腋下淋巴結作涂片, 用苏木精-伊红染色。观察时, 计算每只动物淋巴結涂片中 50 个视野的細胞数目, 每个视野要求細胞数为 5—15 个, 最后统计每组动物 (6 只) 同一淋巴結在 50 个视野中的細胞平均数, 同时计算各种細胞所占的百分率。

結 果 及 分 析

(一) 形态学及組織化学变化

1. 膈窝淋巴結 对照组: 皮質淋巴組織界限清楚, 生发中心不明显, 其內只有少数

* 吉林医科大学; ** 中国医学科学院实验医学研究所; *** 中国医科大学。

本文 1964 年 9 月 20 日收到。

1) 包括浆母細胞和前浆細胞。

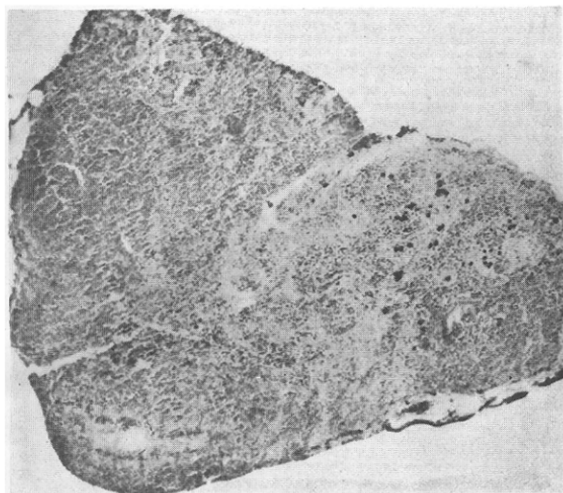


图1 正常大白鼠膈窝淋巴结(组织切片), 甲绿-派咯宁染色($6\times6\times1.4$)。

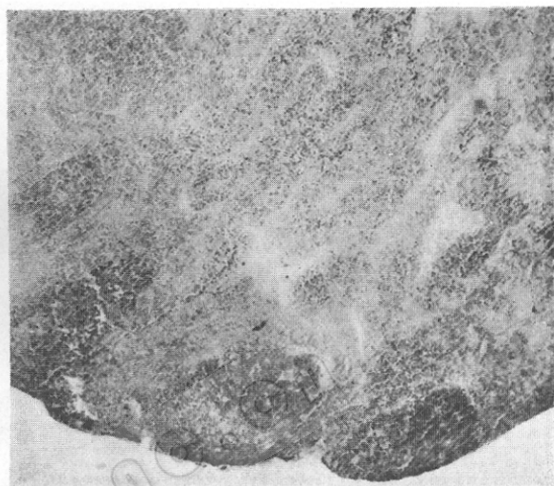


图2 大白鼠2次免疫后, 4天的膈窝淋巴结, 视野中可见皮质和髓质明显增生。皮质内出现生发中心(组织切片); 甲绿-派咯宁染色($6\times6\times1.4$)。



图3 上述淋巴结原部位放大, 视野中可见浆细胞和网状细胞明显增生($10\times100\times1.2$)。

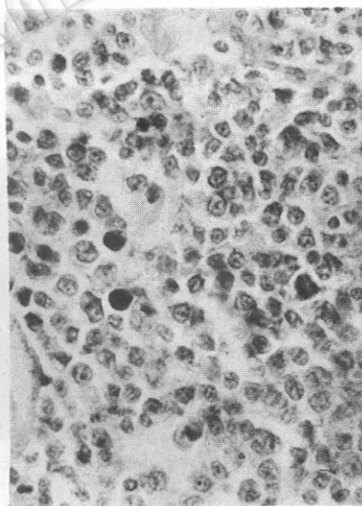


图4 大白鼠2次免疫后, 4天的膈窝淋巴结, 视野中可见散在的PAS阳性的浆细胞(组织切片); PAS染色($6\times45\times1.4$)。

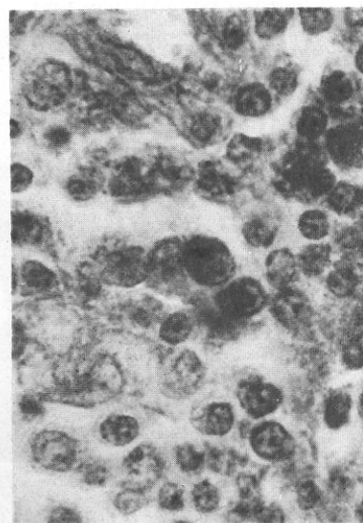


图5 上述淋巴结原部位放大, 视野中可见胞浆PAS强阳性的浆细胞($10\times100\times1.2$)。

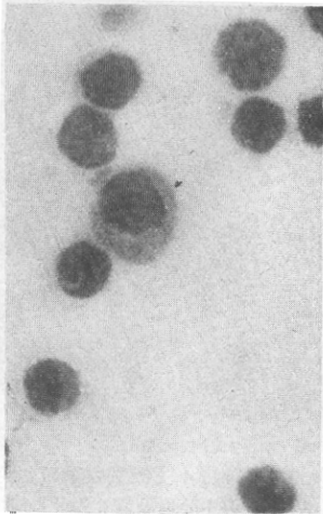


图6 大白鼠1次免疫后4天的
脾窝淋巴结, 视野中只见到1个
浆细胞(涂片 $10 \times 100 \times 1.2$)。

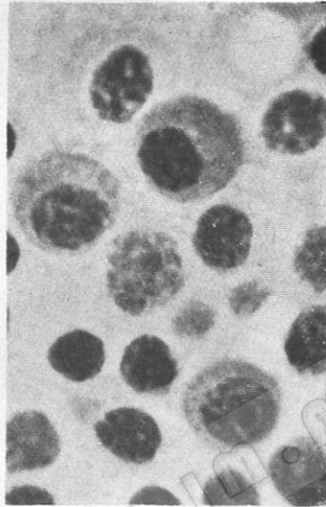


图7 大白鼠2次免疫后, 4天的
脾窝淋巴结, 视野中可见各种类型
的浆细胞(涂片 $10 \times 100 \times 1.2$)。

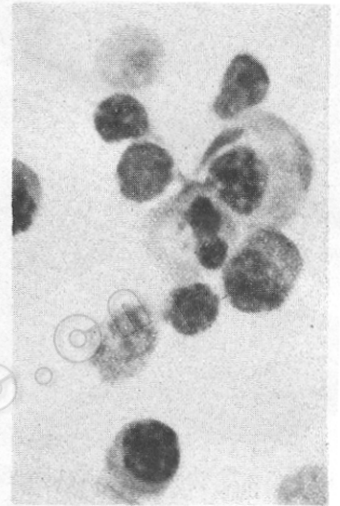


图8 大白鼠2次免疫后4天的
脾窝淋巴结, 视野中可见细胞分裂
现象(涂片 $10 \times 100 \times 1.2$)。

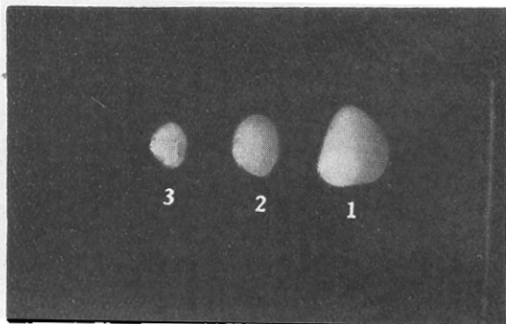


图9 大白鼠脾窝淋巴结, 1为2次免疫; 2为1
次免疫; 3为正常动物($2 \times$)。

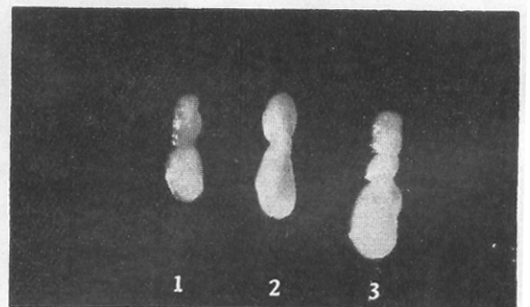


图10 大白鼠腋下淋巴结, 1为正常动物; 2为1次免
疫; 3为2次免疫($2 \times$)。

大、中淋巴細胞¹⁾，后两者胞浆內含有較多的RNA。髓索清楚，由小淋巴細胞、少数中淋巴細胞、纵状內皮細胞和浆細胞組成。纵状內皮細胞的胞浆內呈PAS弱阳性反应。淋巴竇內含有小淋巴細胞，也可見少数的大吞噬細胞及浆細胞(图1)。

免疫后24小时，淋巴結比对照組增大，皮質淋巴組織內大、中淋巴細胞稍有增加，有形成生发中心的趋势。髓質內网状內皮細胞增生，但胞浆內PAS反应未見普遍增強，只有成組的細胞PAS反应較強。这种反应用唾液及淀粉酶处理不消失，髓索內浆細胞有所增加。

免疫后48小时，淋巴結体积变得更大，皮質內出現生发中心，其內含有不少大、中淋巴細胞，核仁清楚。在有些区域中，可見胞浆內PAS強阳性的浆細胞，这些阳性反应物質，用唾液及淀粉酶处理，亦不消失。髓索加寬，有大量浆細胞增殖，RNA含量丰富。中淋巴細胞也頗多，可見明显的核仁。

免疫后4天，淋巴組織內已有明显的生发中心，其內主要为中淋巴細胞，也有少数淋巴細胞。髓質內有大量的浆細胞及中淋巴細胞，RNA含量丰富。其中夹有成組的PAS阳性的网状內皮細胞(图2—5)。

免疫后7天，淋巴結体积未見繼續增大，皮質內生发中心仍很活跃。髓質內髓索比以前有些縮小，其成分仍以浆細胞为主，不过其增殖現象有点減弱。淋巴竇加寬，含有不少呈PAS阳性反应的大吞噬細胞。

免疫后10天，淋巴結体积有些縮小，但比对照組仍大。其他变化基本与7天反应相同。

2. 脾脏

免疫后，脾小体的变化与对照組无明显区别，都有同样中等大的生发中心，生发中心內有大、中淋巴細胞及少数变性細胞。在紅髓內，免疫后24小时及第10天的变化也不明显。主要在免疫后48小时，4天和7天的三組，紅髓內出現較多的浆細胞及中淋巴細胞的增殖。

(二) 細胞反应

表1 網状細胞平均数

取材部位	正常动物	免 疫 組				免疫加脂多糖組			
		免疫后4天		免疫后7天		免疫后4天		免疫后7天	
		1次	2次	1次	2次	1次	2次	1次	2次
膈窝淋巴結	0.74	5.41	12.14	1.91	6.33	7.33	9.33	4.83	6.00
腋下淋巴結	1.12	2.49	1.91	2.99	3.58	2.17	3.00	3.83	5.12

从表1可見，正常大白鼠組的网状細胞在膈窝及腋下淋巴結中，50个視野平均各有0.74及1.12个。

一次免疫后4天，膈窝淋巴結50个視野平均有5.4个細胞，其数目較对照組多

1) 在组织切片中，胞浆丰富的中淋巴細胞和前浆細胞的形态难以区别，故中淋巴細胞中可能包括有幼稚的浆細胞。

表2 过渡浆细胞平均数

取材部位	正常动物	免 疫 组				免疫加脂多糖组			
		免疫后 4 天		免疫后 7 天		免疫后 4 天		免疫后 7 天	
		1 次	2 次	1 次	2 次	1 次	2 次	1 次	2 次
膈窝淋巴结	0.74	5.20	14.58	4.41	21.75	19.33	18.08	12.41	21.25
腋下淋巴结	1.00	2.50	3.66	2.33	6.66	5.08	5.75	4.91	3.44

表3 浆细胞平均数

取材部位	正常动物	免 疫 组				免疫加脂多糖组			
		免疫后 4 天		免疫后 7 天		免疫后 4 天		免疫后 7 天	
		1 次	2 次	1 次	2 次	1 次	2 次	1 次	2 次
膈窝淋巴结	0.82	1.50	14.99	0.99	9.83	3.91	15.16	1.92	19.37
腋下淋巴结	0.54	0.49	3.74	0.66	2.08	0.83	4.56	1.17	1.94

($p < 0.02$)。2 次免疫较 1 次免疫者更有显著增加, 为 12.14, 与对照组相比, $p < 0.01$, 有显著差别。

正常动物的膈窝淋巴结与腋下相比, 没有差别 ($p < 0.5$), 而在免疫 4 天, 近端与远端淋巴结的细胞变化差别甚为明显 (1 次免疫后 $p < 0.02$; 2 次免疫后 $p < 0.01$)。

7 天解剖观察者, 无论 1 次或 2 次免疫组, 膈窝细胞数目均较 4 天者降低, 但与对照组相比仍有差别 ($p < 0.01$)。此时膈窝与腋下淋巴结细胞数目没有差别 ($p > 0.2$), 但腋下淋巴结细胞数目较 4 天者有所增加。

用脂多糖处理组, 无论膈窝或腋下淋巴结的网状细胞, 其数目皆较对照组多, 但与同样免疫组相比, 1 次免疫者细胞数量似显较多, 2 次免疫者细胞的改变未有一定规律性。

表 2 说明 6 个大白鼠的膈窝及腋下淋巴结 50 个视野中过渡浆细胞的平均数, 正常动物的过渡浆细胞仅为 0.74 及 1.00。1 次免疫后 4 天, 膈窝淋巴结的细胞数目有增加 ($p < 0.05$), 加脂多糖组则细胞数目增加更为明显, 增为 19.33 ($p < 0.01$)。二次免疫后, 无论加脂多糖组及未加脂多糖组, 其过渡浆细胞组数目皆较对照组者多 ($p < 0.01$)。免疫后 7 天者, 其膈窝及腋下淋巴结细胞数目亦皆较对照组高 ($p < 0.01$)。

2 次免疫后, 无论 4 天或 7 天, 其近端淋巴结中的细胞数目皆较远端为高 ($p < 0.01$)。而正常动物的膈窝及腋下的细胞数目并无差别 ($p > 0.5$)。

脂多糖对于淋巴结中过渡浆细胞数目的影响似只见于 1 次免疫, 且明显地作用在近端淋巴结 ($p < 0.01$)。

由表 3 中浆细胞的平均数可看出, 在 1 次免疫后, 无论 4 天或 7 天, 膈窝及腋下淋巴结中浆细胞数目与对照组相比并无差别 ($p > 0.4$), 只有加脂多糖组 4 天膈窝淋巴结数目的增加较有意义 ($p < 0.05$)。

2 次免疫后 4 天及 7 天, 其膈窝淋巴结中的细胞数目较对照组皆有明显差别 ($p < 0.01$, $p < 0.02$)。脂多糖对于 1 次免疫者似有加强浆细胞反应的能力, 但没有对过渡浆

細胞那样显著。

表 4 总細胞数中各种类型細胞所占的百分比

取 材 部 位	细 胞 种 类	正 常 (对照)	免 疫 组				免疫加脂多糖组			
			免疫后 4 天		免疫后 7 天		免疫后 4 天		免疫后 7 天	
			1 次	2 次	1 次	2 次	1 次	2 次	1 次	2 次
膈 窝 淋 巴 結	淋 巴	99.5	97.62	88.70	98.45	92.02	94.38	90.10	96.39	90.64
	网 状	0.16	1.05	3.27	0.40	1.31	1.34	2.17	0.91	1.20
	过渡浆	0.16	1.03	3.95	0.93	4.57	3.55	4.2	2.34	4.26
	浆	0.18	0.29	4.07	0.21	2.08	0.72	3.49	0.36	3.89
腋 下 淋 巴 結	淋 巴	99.49	98.85	97.29	98.79	97.43	98.34	96.68	98.20	97.62
	网 状	0.22	0.52	0.57	0.60	0.74	0.42	0.76	0.69	0.76
	过渡浆	0.19	0.52	1.05	0.47	1.38	0.98	1.44	0.89	0.77
	浆	0.11	0.10	1.08	0.13	0.43	0.25	1.11	0.21	0.44

从表 4 各細胞类型的变化百分比可看出,在正常未免疫动物淋巴结中,大約99.5% 为淋巴細胞,其他各类型細胞仅占 0.5%。1 次免疫后,淋巴細胞百分数稍有下降,变为 98% 左右。

脂多糖对 1 次免疫后 4 天者淋巴細胞百分数变化的影响較为明显 (94—96%), 可能是促进了淋巴細胞的轉化,此时过渡浆細胞数目明显增多。

2 次免疫后,淋巴細胞的百分比繼續下降,在膈窝淋巴结的淋巴細胞数目占 88—92%, 此时浆細胞数目增多,特别是在 2 次免疫后 4 天者,已由正常对照組的 0.18% 增至 4.07%, 腋下淋巴结的浆細胞变化亦与此相同。

由上面 3 个表中可看到以下几点: (1) 正常与免疫大白鼠的局部 (膈窝) 及远端 (腋下) 淋巴结組織相比, 1 次或 2 次免疫动物的淋巴结中, 无论是网状細胞, 过渡浆細胞及浆細胞, 数量皆有明显增多 (见图 6, 7, 8); (2) 局部淋巴结比远端淋巴结的細胞反应明显; (3) 2 次免疫的細胞反应較 1 次者更为明显; (4) 1 次免疫后 4 天, 网状及过渡浆細胞皆有增加, 此时浆細胞的数目增加很少; (5) 2 次免疫后 4 天与 7 天, 网状細胞、过渡浆細胞及浆細胞反应皆明显, 但以后二种細胞数目增加为著; (6) 加脂多糖免疫組与未加脂多糖的細胞反应有区别, 但对 1 次免疫与 2 次免疫者作用不同。1 次免疫后 4 天与 7 天, 过渡浆細胞均有明显增加 (2—4 倍), 2 次免疫后, 脂多糖在不同時間对各种細胞反应的影响无規律性。

从淋巴结的重量看来, 正常动物的膈窝淋巴结的平均重量为 7.17 毫克, 1 次免疫后 4 天者, 淋巴结重量增至 19.87 毫克, 2 次免疫后淋巴结又有增加, 至 32.64 毫克 (见图 9)。但 4 天时, 其淋巴结重量皆較 7 天时重。此点与細胞类型的变化有一致关系, 4 天較 7 天变化明显。

腋下淋巴结重量变化与膈窝不同, 7 天者較 4 天者重。这可能与抗原注入的部位有关, 膈窝为局部淋巴结, 首先受到抗原的作用, 因此在 4 天重量就增加, 而腋下为远端淋巴结, 受抗原作用較迟, 因此重量变化亦較晚, 但腋下淋巴结重量亦随之免疫次数而增加, 其正常者平均为 28.63 毫克, 1 次免疫后为 42.35 毫克, 2 次免疫后增至 47.74 毫克 (图 9,

10)。

表 5 血 凝 效 价

免疫后取材 时间(天)	实 验 材 料		正常对照	1 次 免 疫		2 次 免 疫	
				未加脂多糖	加脂多糖	未加脂多糖	加脂多糖
4	血 清		0	0	0	436	452
	淋 巴 结	膈 窝	0	0	0	1600	1131
		腋 下	0	0	0	15.8	2.7
7	血 清		0	0	0	8100	26805
	淋 巴 结	膈 窝	0	0	0	2101.5	3805.4
		腋 下	0	0	0	68.4	378.3

由表 5 可見,正常大白鼠血清及淋巴結組織中的血凝反应皆为阴性,1 次免疫后未見抗体效价上升,2 次免疫后 4 天,血清及淋巴結皆已出現血凝素,此时局部淋巴結抗体效价較血清中高 4 倍,远端淋巴結的抗体效价的增加不明显。2 次免疫后 7 天,血清中抗体較 1 次免疫者明显上升达 20 倍,远端淋巴結抗体效价亦有上升。脂多糖对于 7 天的抗体效价有提高作用,且明显作用于远端淋巴結。

血凝抗体效价与浆細胞系反应的关系見表 6。

表 6 漿細胞系細胞反应与血凝抗体

观 察 项 目		正 常 对 照	免 疫 组				免疫加脂多糖组			
			免疫后 4 天		免疫后 7 天		免疫后 4 天		免疫后 7 天	
			1 次	2 次	1 次	2 次	1 次	2 次	1 次	2 次
血 清 效 价		0	0	436	0	8100	0	452	0	26805
膈 淋 巴 结	细 胞 数	1.56	6.70	29.57	5.30	31.58	23.24	33.24	14.31	41.62
	血 凝 效 价	0	0	1600	0	2101	0	11.31	0	3805
腋 淋 巴 结	细 胞 数	1.54	3.00	7.40	2.99	8.74	6.91	10.25	6.07	5.38
	血 凝 效 价	0	0	15.8	0	68.4	0	2.7	0	378.3

由表 6 可以看出,浆細胞系(成熟浆細胞及过渡浆細胞)的細胞数目与体液及淋巴結組織抗体的效价确有一定关系。細胞数目多者,其抗体效价亦較高。細胞数目在 7 以下者未見有抗体效价,7.40 者抗体效价为 15.8, 29.57 者为 1600, 31.58 者則較 7.40 者的抗体效价有所增加,为 2101。在脂多糖組,此規律性較差,虽細胞数很少,甚至較对照組为低,但其效价尚不算太低,如細胞数为 5.38 者,抗体效价为 378.3。

脂多糖能增加抗体产生的強度,至于它促进特异性抗体产生的机制問題,至今尚有不同的看法,未完全解决。从我們的实验中可以看到,脂多糖能增強淋巴結的細胞反应(表 1, 2, 3),尤其是对 1 次免疫后的动物有比較規律的作用。而对体液 抗体的加强作用却是在 2 次免疫后 7 天方有明显表現,此时浆細胞系数目不一定加多。因此若认为脂多糖因刺激形成浆細胞的能力,因而加强抗体产生,这种看法似乎不够全面。它很可能促进每

个浆细胞合成抗体的能力增强,而细胞总数并不增多。

文献上常以细胞反应及体液抗体产生作为抗体生成的两个高峰^[9,10,11],而细胞反应常在抗体产生高效价以前。在我们的实验中亦看到,2次免疫后4天,淋巴结浆细胞反应较7天明显,而7天抗体效价较4天高,但由浆细胞系细胞的平均数来看,则细胞数多时,抗体效价亦高。

摘 要

本实验共分为两部分,第一部分观察了大白鼠经沉淀白喉类毒素2次免疫后24、48小时、4、7及10天时,淋巴结的形态学及组织化学变化。

大白鼠免疫后,近端(髓窝)淋巴结发生明显的组织学变化,主要是皮质和髓质增生;前者出现明显的生发中心,后者出现浆细胞、中淋巴细胞以及网状细胞的增殖。此变化在免疫后48小时和4天最明显,同时期,在相同的淋巴结内,浆细胞和嗜派咯宁细胞反应亦最显著。

第二部分为免疫动物淋巴结的细胞反应。

是用沉淀白喉类毒素免疫大白鼠,并以细菌脂多糖与抗原同时注入动物。在1次免疫和2次免疫后经4与7天进行取材观察。观察指标为淋巴结各类型细胞反应,淋巴结重量及血凝抗体滴度等。

从实验结果来看,无论是1次或2次免疫,淋巴结的细胞类型皆发生变化。局部淋巴结的细胞变化较远端显著,2次免疫者较1次者明显。细胞类型的变化以浆细胞系细胞反应为主,包括过渡浆细胞及成熟浆细胞。血凝抗体的效价亦随着浆细胞系的反应而逐渐增强,二者具有平行关系,随此亦可见到淋巴结重量的增加及组织悬液中细胞总数的增多。

脂多糖与抗原同时注入时,在2次免疫后7天取材观察,见到增强了血液及淋巴结组织中的血凝抗体。但浆细胞反应仅稍有增加。

参 考 文 献

- [1] Ehrlich, W. R. & Harris, T. N.: *J. Exp. Med.*, **76**:335, 1942.
- [2] Reiss, E. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**:712, 1950.
- [3] Wissler, R. W. et al.: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **50**:265, 1957.
- [4] Карташева, В. Н. и др.: *Ж.М.Э.Н.*, (3):34, 1963.
- [5] Фролова, М. А. и др.: *Ж.М.Э.Н.*, (6):70, 1964.
- [6] Zlotnick, A. et al.: *Blood*, **14**:564, 1959.
- [7] 张作干: *解剖学报*, **1**:257, 1954.
- [8] 张作干: *临床检验*, **4**:32, 1957.
- [9] Мешалова, А. Н.: *Ж.М.Э.Н.*, (9):77, 1961.
- [10] Здродовский, П. Ф.: *Вест. АМН, СССР*, (4):57, 1962.
- [11] Годованный, Б. А.: *Ж.М.Э.Н.*, (7):51, 1963.

HISTOCHEMICAL CHANGES AND CELLULAR RESPONSE OF LYMPH NODES IN RATS IMMUNIZED WITH PRECIPITATED DIPHTHERIA TOXOID

YANG KUEI-CHEN, PENG TA-TSAI, CHANG SHAO-LUN,
(*Department of Microbiology, Kirin Medical Institute, Changchun*)

KAO CHIN, SHEN TSUNG-YING,
(*Institute of Experimental Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

LI HSING-CHUN,
(*Department of Microbiology, Kirin Medical Institute, Changchun*)

AND HSIEH SHAO-WEN
(*Chinese Medical Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

This work is in two parts. The first part involved the observation of the histologic and histochemical changes in the lymph nodes of rats 24 hours, 48 hours, 4 days, 7 days and 10 days after immunization with precipitated diphtheria toxoid. In rats after immunization, the proximal (popliteal) lymph nodes displayed remarkable histologic changes, which consisted chiefly in hyperplasia of the cortex and the medulla, the former showing manifestation of germinal centres, and the latter, hyperplasia of plasma cells, medium lymphocytes and reticulocytes. At the 48th hour and the 4th day, when these changes were the most striking, pyroninophilic cell response was also at its climax in the same lymph nodes.

The second part of the present work concerned the cellular responses in animals after immunization. Rats were immunized with precipitated diphtheria toxoid, the antigen being injected in conjunction with bacterial lipopolysaccharide. 4 and 7 days subsequent to both the primary and the secondary immunization, observations were made with regard to the cellular response of the various kinds of cells in the lymph nodes, and on the weight of lymph nodes and on indirect hemagglutination.

As is clear in the experimental results, the types of cells, chiefly those of the plasmacyte series, underwent alteration both after the primary and secondary immunization. The change was more marked in the regional lymph nodes than in the remote, after the secondary immunization than after the primary.

The titre of hemagglutinin increased *pari passu* with the reaction of the plasmacyte series, as a definite correlation being demonstrable between the two. Concordantly with this, the weight of the lymph nodes and the number of cells in tissue suspension became higher. All these pointed to changes in the material basis for antibody production.

With lipopolysaccharide injected together with the antigen, the hemagglutinin titre in the blood and lymph node tissues was elevated in the 7th day after the secondary immunization, but the plasmacyte response increased only slightly.