

# 血栓闭塞性脉管炎是涉及多种超敏反应的自身免疫性疾病

郑萍<sup>1\*</sup>, 王万超<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海

<sup>2</sup>上海交通大学医学院上海市免疫学研究所, 上海

收稿日期: 2023年5月25日; 录用日期: 2023年6月19日; 发布日期: 2023年6月27日

## 摘要

目的: 本研究是基于我们早期研究报告显示的血栓闭塞性脉管炎(TAO, Buerger' Disease)可能是涉及到超敏反应III和IV的自身免疫性疾病的进一步研究。方法: 测定28例TAO患者的体液免疫(IgE); 采用三种免疫标记技术同步探测28例TAO血清中抗血管自身抗体和18例TAO病变血管上的抗原抗体复合物等, 以确保结果的可靠性。结果: 发现TAO病人血清中IgE显著升高( $P < 0.01$ ); 三种免疫标记技术均发现血清中有高达86%的抗血管自身抗体( $P < 0.001$ )和在血管壁全层有抗原抗体复合物沉积及自身抗体直接结合于血管胶原。结论: 进一步证实TAO是一种自身免疫性疾病, 且发现涉及多种超敏反应。其发病机制主要是III型超敏, 除了与IV型有关外, 还有II型的参与。IgE明显升高提示TAO患者或有被致敏原致敏的I型超敏反应的存在。

## 关键词

血栓闭塞性脉管炎, 自身免疫性疾病, 免疫标记技术, 抗原抗体复合物, 抗血管自身抗体, III、IV、II、I型超敏反应

# Thromboangiitis Obliterans Is an Autoimmune Disease Involving Multiple Hypersensitivity Types

Ping Zheng<sup>1\*</sup>, Wanchao Wang<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine, Shanghai

<sup>2</sup>Shanghai Institute of Immunology, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai

Received: May 25<sup>th</sup>, 2023; accepted: Jun. 19<sup>th</sup>, 2023; published: Jun. 27<sup>th</sup>, 2023

\*通讯作者 Email: Portiaz@126.com

#Email: wcwang40@gmail.com

文章引用: 郑萍, 王万超. 血栓闭塞性脉管炎是涉及多种超敏反应的自身免疫性疾病[J]. 临床医学进展, 2023, 13(6): 10050-10057. DOI: 10.12677/acm.2023.1361405

## Abstract

**Object:** Our early study about thromboangiitis obliterans (TAO, Buerger's Disease) has been reported that it may be an autoimmune disease involving hypersensitivity Type III & Type IV. In this study, we further explored the immune pathogenesis of thromboangiitis obliterans based on initial research. **Method:** We detected humoral immunity (IgE) in 28 cases, antigen-antibody complex depositing on the vessel wall in 18 cases, and anti-vessel antibodies in 28 cases using three kinds of immune-labeling technique to confirm the new findings. **Result:** IgE levels were significantly high ( $P < 0.01$ ). As high as 86% of anti-vessel antibodies in serum were found ( $P < 0.001$ ), and the auto-antibodies against the vessel were combined directly with vascular collagen. Antigen-antibody complexes were deposited on the vascular wall. **Conclusion:** These findings further confirm thromboangiitis obliterans is an autoimmune disease and involving multiple hypersensitivity reactions. This is mainly Type III hypersensitivity and type II in addition to type IV. The elevated IgE suggests that TAO may a type I hypersensitivity involved.

## Keywords

Thromboangiitis Obliterans (TAO, Buerger's Disease), Autoimmune Disease, Immune-Labeling Technique, Antigen-Antibody Complexes, Anti-Vessel Antibodies, Type III, Type IV, Type II, Type I Hypersensitivity Types

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

1908年 Leo Buerger 首次描述了该疾病。血栓闭塞性脉管炎(TAO)的发生率在世界范围内分布广泛,但分布非常不均[1]。在北美和西欧,它占周围血管疾病 0.75%~5.6%。但在东欧,中东、地中海地区和亚洲,它占周围血管疾病可高达 60%~80% [1]。发病率随着经济发展有下降[2],多数患者伴有营养不良[3]。据报道女性的 TAO 发病率有升高[1],这很可能因年轻女性吸烟的增加。

TAO 是一种影响中小型动脉和静脉血管壁的炎症性疾病,伴有血管腔内血栓形成,主要累及肢体。多发生在青壮年男性吸烟者,剧痛导致药物滥用和肢体丧失,国外报道高位截肢率达 20% [1]。近年来其免疫发病机制已引起国内外学者注意,但深入全面研究尚不足。我们于 1985 年报道了 TAO 的免疫发病机制主要涉及 III 型超敏反应,并且与 IV 型超敏反应有关[4]。现进一步对 TAO 免疫发病机理作深入研究。

## 2. 临床资料和方法

### 2.1. 病人

共 74 例,均为男性;年龄 21~50 岁;临床病程:2~28 年;复发次数:1~6 次;最近病期:1 至 10 个月。

TAO 的诊断基于以下标准:1) 发病年龄在 20~40 岁;2) 吸烟;3) 通常伴有肢端游走性浅静脉炎;4) 有肢体缺血症状和体征;5) 必须排除其他外周血管疾病如动脉硬化性闭塞,糖尿病足等。

根据病情将患者分为“进展态”、“迁延态”和“稳定态”。

## 2.2. 观察和方法

1) 检测体液免疫 IgE: 采用 ELISA 法检测无过敏性疾病的 28 例 TAO 患者血清 IgE。并设有正常人组以资对照。

2) 检测 TAO 病变血管沉积抗原抗体复合物: 对 18 例 TAO 患者病变血管(截肢后血管和活肝炎性浅静脉), 用以下 3 种免疫标记方法同时进行, 以确保检测结果的准确性。并设有正常人组以资对照。

a) 免疫荧光法(IF): TAO 血管固定在冷却酒精(95%)中, 用低温石蜡包埋, 切片使用胰酶消化, 免疫荧光染色, 采用异硫氰酸荧光素兔抗人免疫球蛋白和免疫球蛋白 G (兔抗人 FITC-Ig 与 FITC-IgG); 荧光显微镜下观察 TAO 病变血管[5];

b) 免疫酶标记染色(ABC): 为了证明 IF 的结果, 并排除非特异性交叉反应, 使用了与上述相同的连续切片, ABC 免疫酶标记, 生物显微镜下观察 TAO 病变血管;

c) 免疫金银染色(IGSS): 使用与上述相同的连续切片, IGSS 免疫标记染色, 生物显微镜下观察 TAO 病变血管[6]。

3) 抗血管自身抗体的检测:

使用正常血管(非脉管炎截肢动脉或静脉)作为抗原替代物, 将 28 例 TAO 患者的血清用作第一抗体, 使用兔抗人作为第二抗体。采用以上三种免疫标记同时进行, 以确保检测结果的准确性。均采用间接染色方法。设有正常人组对照(血清来自瑞金医院志愿者捐血)和另外 5 组对照: 1) 兔血清替代人血清; 2) 缓冲液替代人血清; 3) 抗小鼠抗体取代标记抗体; 4) 缓冲液替代标记抗体; 5) 生理盐水空白。

我们进行了配对的 t 检验, 并确定了均值和标准差。P 值  $< 0.05$  被认为具有统计学意义(显著), P  $< 0.01$  非常显著。

## 3. 结果

1) 体液免疫: TAO 患者 IgE 呈非常明显升高(P  $< 0.01$ ); 各组均升高, 而在“迁延”和“稳定”组明显高于对照组(P  $< 0.05$ ) (见表 1)。

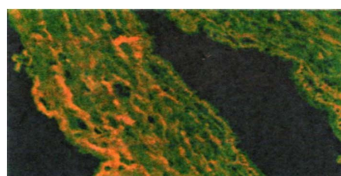
**Table 1.** Determination value of humoral immune IgE in normal people and TAO patients

**表 1.** 正常人与 TAO 患者体液免疫 IgE 测定数值(\*P  $< 0.01$ , \*\*P  $< 0.05$ )

项目	正常人	TAO	发展态	迁延态	稳定态
IgE (微克/毫升)	151.5 ± 135.7	415.2 ± 388.2*	219.5 ± 135.4	427.6 ± 414.4**	543.14 ± 37.4**
例数	58	28	5	17	6

2) 免疫标记后观察病变血管沉积的抗原抗体复合物:

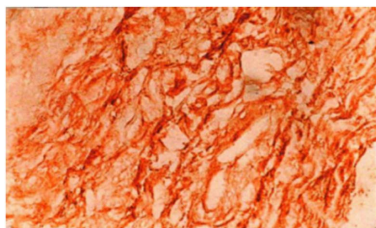
a) 直接免疫荧光(DIF) (见图 1): 在血管内膜、中层和外层中可见黄绿色条纹状、斑块状和颗粒状免疫复合物荧光物质的沉积。



**Figure 1.** Deposits with yellowish-green striped, lumpy and particle-shaped immunofluorescence on TAO vascular wall (DIF 400×)

**图 1.** TAO 血管壁上有黄绿色条纹、块状和颗粒状免疫复合物荧光沉积物免疫荧光(DIF 400×)

b) 免疫酶标记染色(ABC) (见图 2): 在血管内膜、中层和外层有棕黄色的条纹块状免疫酶标物质的沉积(结果与 DIF 相同)。



**Figure 2.** Streaky and massive of brown-yellow immunoenzyme-labeled staining substances deposited on the vessel wall of TAO (ABC 400×)

**图 2.** TAO 血管壁上有条纹状、块状的棕黄色免疫酶标物质的沉积。免疫酶标记染色(ABC 400×)

c) 免疫金银染色技术(IGSS) (见图 3): 在血管内膜、中层和外层可见黑色的条纹颗粒状免疫复合物金标物质的沉积。(IGSS 的结果与 ABC 和 IF 相同, IGSS 技术显示出良好的特异性和灵敏度)



**Figure 3.** Black stripes and granular immune gold and silver staining substances were deposited on blood vessel (IGSS 400×)

**图 3.** TAO 血管壁上有黑色条纹颗粒状免疫金标物质的沉积。免疫金银染色(IGSS 400×)

所有上述三种免疫标记技术都显示了血管壁上的抗原抗体复合物沉积, 其中 IgG 和 IgM 的荧光强度更强。

### 3) 抗血管自身抗体

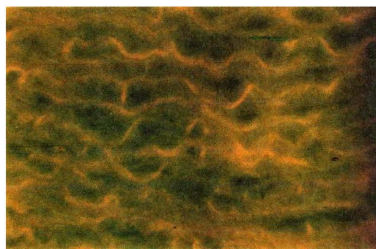
通过三种免疫标记技术证明: 抗血管自身抗体存在于 TAO 患者的血清中, 占 72%~86% (见表 2) 并见到抗血管的自身抗体直接与血管胶原蛋白结合(如图 4~6 所示)。IGSS 方法的特异性和敏感性优于 DIF 和 ABC 方法。

**Table 2.** Detection of antivasular autoantibodies in serum of TAO patients

**表 2.** 检测 TAO 患者血清中的抗血管自身抗体

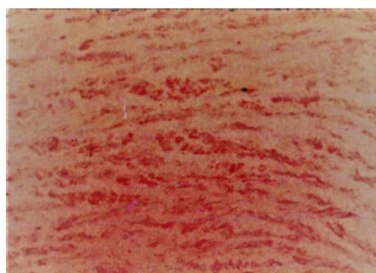
项目	患者组			正常组*			P 值
	病例数	阳性	%	病例数	阳性	%	
IF**	32	23	72	13	2	18	<0.001
ABC**	28	21	75	13	3	23	<0.001
IGSS**	28	24	86	11	0	0	<0.001

\*正常组是指瑞金医院志愿捐血者。 \*\*5 种对照均为阴性: 兔血清替代人血清; 缓冲液替代人血清; 抗小鼠抗体取代标记抗体; 缓冲液替代标记抗体; 空白。



**Figure 4.** Antivascular antibodies are present in the sera of TAO patients, showing that the secondary antibody yellow-green FITC-antibody binds to the vessel wall (DIF 200×)

**图 4.** 在 TAO 患者的血清中存在抗血管抗体, 显示第二抗体黄绿色 FITC-抗体与血管壁结合(DIF 200×)



**Figure 5.** Antivascular antibodies are present in the sera of TAO patients, showing that the second antibody brown red ABC-antibody binds to the vessel wall (ABC 200×)

**图 5.** 在 TAO 患者的血清中存在抗血管自身抗体, 显示第二抗体棕红色 ABC-抗体与血管壁结合(ABC 200×)



**Figure 6.** Antivascular antibodies are present in the sera of TAO patients, showing secondary antibody dark brown Gold-antibody bound to vessel wall (IGSS 200×)

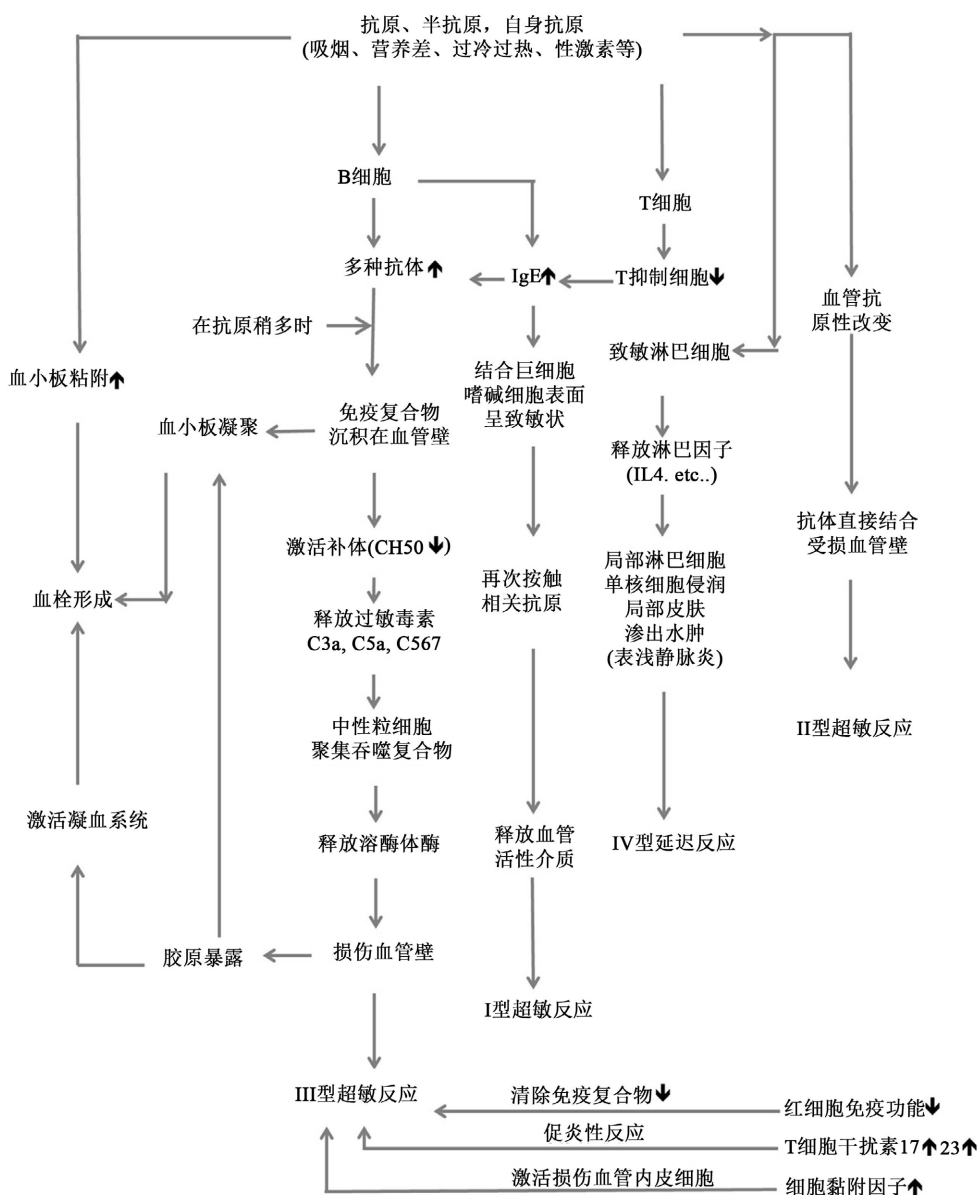
**图 6.** TAO 患者血清中存在抗血管自身抗体, 显示第二抗体深棕色 Gold-抗体与血管壁结合(IGSS 200×)

## 4. 讨论

自 1962 年, Pokorny 报道, 在 TAO 并发游走性浅静脉炎者血清中检出抗血管抗体以来[7], TAO 免疫学的研究在逐渐展开。

80 年代, 国内学者王嘉桔, 郑萍, 王万超, 杨博华、于爱莲等也开始进行 TAO 的免疫学研究[4] [8] [9]。

郑萍, 王万超等以体液免疫( $\gamma$  球蛋白, 免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM、补体 CH50、C3、C4、免疫复合物 CIC); 细胞免疫(T 细胞花环试验 E-RFC、T 抑制细胞 As、表面带有 SmIg、SmIgG 的外周 B 淋巴细



注: 郑萍, 王万超 1985 年原创, 2020 年修改。

**Figure 7.** Conceptual diagram of the pathogenesis of thromboangiitis obliterans  
**图 7.** 血栓闭塞性脉管炎发病机理构思图

胞、白细胞移动抑制试验 LMIT)和免疫病理(光镜、免疫荧光、透射电镜)为指标, 较系统地观察了 30 例 TAO 患者及其处于发展、迁延、稳定状态的免疫学改变, 其研究结果显示: 体液免疫中  $\gamma$  球蛋白升高、IgG 升高、CIC 升高, 且在病情处于发展状态时, 显示非常显著差异( $P < 0.01$ ), 自身抗体(抗血管 IgG 抗体)存在, 并见到免疫荧光复合物沉积于血管壁, B 细胞升高, T 细胞尤其是 T 抑制细胞降低等表现, 提示 TAO 是一个与抗原抗体复合物形成并沉积于血管壁的 III 型超敏反应有关的自身免疫病[4], 同时, 根据临床 TAO 患者有反复浅静脉炎结节发作, 结节表面皮肤炎症水肿, 可能为致敏淋巴细胞释放淋巴因子所致, 根据病理光镜下显示以淋巴细胞浸润为主, 且结合 LMIT 的结果还表明: TAO 患者的淋巴细胞确可被变性主动动脉的抗原致敏, 并使白细胞移动抑制加强, 故考虑在 TAO 的免疫发病机理中, 除 III 型超

敏反应, 尚有 IV 型迟发超敏反应的参与[4]。

近年来, 不少学者在 TAO 中发现了多种抗体: 抗内皮细胞抗体(AECA) [10], 抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA) [11], 抗磷脂抗体(APA) [12] [13], G 蛋白受体抗体(AAB) [14]等, 提示多种抗体可攻击血管内皮细胞和血管壁。并有报道各种细胞因子、E-选择素、白介素等对血管免疫反应的作用[15] [16]。国内伏祥茂等通过测定患者红细胞膜上 C3b 受体活性及红细胞免疫调节因子活性, 发现 TAO 患者它们的活性均显著下降, 红细胞具有调节机体免疫的多种功能, C3b 受体能与循环中的免疫复合物粘附、运转、清除, 其活性的下降, 使清除免疫复合物(CIC)的能力下降[17]。郭轶等研究 TAO 患者的 T 淋巴细胞对管壁的浸润, 引起免疫损伤[18]; Peter 等在临床上使用免疫吸附法均获得正面效果[19] [20]。作者于 85 年创制的含少量免疫抑制作用的西药小复方也获得临床上不错的疗效。

本研究示 TAO 患者体液免疫 IgE 非常显著升高( $P < 0.01$ )。结合临床, TAO 有反复急性发作, 发作有一定诱因(烟草、气候、外伤、营养不良等) [3], 患者似发于致敏状态, 提示有 I 型超敏反应的存在, 或 IgE 升高正是其自身免疫性疾病的一种表现[21]。本研究还通过三种免疫标记方法均证明 TAO 患者血清中有抗血管自身抗体的存在(高达 72%~89%), 并直接观察到抗原抗体复合物沉积在血管壁上, 再次鉴定了 III 型超敏反应的存在。还观察到抗血管自身抗体直接与病损的血管胶原结合, 显示 II 型超敏反应的存在。

根据 1985 年我们先前的研究结果[4]结合本次研究表明, TAO 具有了以下自身免疫疾病的特点: 高 r 球蛋白血症; 存在自身抗体和致敏淋巴细胞; 抗原抗体复合物在受损组织中的沉积; 淋巴细胞、浆细胞、单核细胞浸润在靶器官中; 国内外学者并发现 TAO 病人有多种自身抗体; 与遗传基因有关[22]。结合临床, 病情呈反复发作和慢性迁延过程; 在急性发作时, 免疫吸附法和使用免疫抑制剂对病情有较好的控制; 四肢和内脏 TAO 同时存在[23] [24]; 疾病发生有明显诱因, 吸烟被公认为是 TAO 的主要发病因素, 不仅烟雾可直接致敏, 尼古丁还能作为半抗原, 其与细胞内的组蛋白或 DNA 结合, 使自身组织成分发生改变, 导致自身抗体的产生[25]; 性激素变化可导致自身免疫疾病[26], TAO 患者 94.5%~99%均为青壮年男性。

总之, 我们的研究发现了 TAO 是属于涉及多种超敏反应的自身免疫性疾病。主要为 III 型超敏, 除 IV 型外还有 II 型超敏, 并提示 I 型超敏反应的涉及。TAO 的血管壁炎症、血液高凝状态[27]和血管腔中的血栓形成可以被认为是其多种超敏反应的后果(见图 7)。

## 致 谢

我们衷心感谢上海市免疫研究所黎力、谢雅莉、黄冬生在某些免疫技术上的协助和马宝骊的指导; 感谢上海交通大学医学院数学教研组苏炳华的数据统计; 更感谢中国中西医结合周围血管病委员会主任杨博华的鼓励与肯定。

## 参考文献

- [1] Mills Sr, J.L. (2003) Buerger's Disease in the 21st Century: Diagnosis, Clinical Features and Therapy. *Seminars in Vascular Surgery*, **16**, 179-189. [https://doi.org/10.1016/S0895-7967\(03\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0895-7967(03)00023-1)
- [2] 王嘉桔, 赵文光, 孙思翘, 等. 血栓闭塞性脉管炎的发病变迁(百年回顾之一) [J]. 中国血管外科杂志(电子版), 2009, 1(1): 9-12.
- [3] 郑萍. 血栓闭塞性脉管炎的病因和发病机理[J]. 北方医学, 1983(5): 13-15.
- [4] 郑萍, 傅培彬, 王万超, 等. 血栓闭塞性脉管炎(TAO)的免疫功能状态研究[J]. 上海免疫学杂志, 1985(3): 146-151.
- [5] 王万超, 谢雅莉, 李萱茂, 等. 直接免疫荧光技术对人体 T 淋巴细胞表面免疫球蛋白检测的探讨及应用[J]. 中华

医学检验杂志, 1982, 5(2): 74-76.

- [6] 马宝骊, 王一飞, 王万超, 等. 医学免疫学[M]. 第1版. 上海: 上海同济大学出版社, 1987: 164-1718.
- [7] Pokorny, J. and Jezkova, Z. (1962) Significance of Immunological Studies in Peripheral Obliterating Vascular Diseases. *Circulation Research*, **11**, 961-965. <https://doi.org/10.1161/01.RES.11.6.961>
- [8] 王嘉桔, 赵文光, 郑萍, 等. 对血栓闭塞性脉管炎的新认识[J]. 吉林医学, 1886, 7(5): 53.
- [9] 杨博华, 张述刚, 李令根, 等. 关于血栓闭塞性脉管炎人体液免疫功能的研究[J]. 中医药信息, 1987(5): 34-36.
- [10] Eichhorn, J., Sina, D., Lindschau, C., et al. (1995) Antiendothelial Cell Antibodies in Thromboangiitis Obliterans. *The American Journal of the Medical Sciences*, **315**, 17-23.
- [11] Halacheva, K.S., Manolova, I.M., Petkov, D.P., et al. (1998) Study of Anti-Neutrophil Disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, **48**, 544-550.
- [12] 王俊英, 蒋米尔, 薛莲. 血栓闭塞性脉管炎患者抗磷脂蛋白抗体检测及意义[J]. 上海医学, 1997(5): 280-282.
- [13] de Godoy, J.M.P. and Braile, D.M. (2009) Burger's Disease and Anticardiolipin Antibodies. *Journal of Cardiovascular Medicine*, **10**, 792-794. <https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e32832ce8d0>
- [14] Klein-Weigel, P.F., Bimmler, M., Hempel, P., et al. (2014) G-Protein Coupled Receptor Auto-Antibodies in Thromboangiitis Obliterans (Buerger's) and Their Removal by Immunoabsorption. *Vasa*, **43**, 347-352. <https://doi.org/10.1024/0301-1526/a000372>
- [15] Dellalibera-Joviliano, R., Joviliano, E.E., Silva, J.S. and Evora, P.R.B. (2012) Activation of Cytokines Corroborate with Development of Inflammation and Autoimmunity in Thromboangiitis Obliterans Patients. *Clinical and Experimental Immunology*, **170**, 28-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04624.x>
- [16] Halacheva, K., Gulubova, M.V., Manolova, I. and Petkov, D. (2002) Expression of ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin and TNF- $\alpha$  on the Endothelium of Femoral and Iliac Arteries in Thromboangiitis Obliterans. *Acta Histochemica*, **104**, 177-184. <https://doi.org/10.1078/0065-1281-00621>
- [17] 伏祥茂, 景在平, 郭峰. 血栓闭塞性脉管炎患者红细胞免疫功能及调节因子的研究[J]. 上海医学, 1997(7): 403-404.
- [18] 郭轶, 代远斌. 血栓闭塞性脉管炎患者血管壁的免疫病理学研究[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(12): 1683-1685.
- [19] Baumann, G., Stangl, V., Klein-Weigel, P., et al. (2011) Successful Treatment of Thromboangiitis Obliterans (Burger's Disease) with Immunoabsorption: Results of a Pilot Study. *Clinical Research in Cardiology*, **100**, 683-690. <https://doi.org/10.1007/s00392-011-0298-z>
- [20] Klein-Weigel, P., Volz, T.S., Gutsche-Petrak, B., et al. (2016) Immunoabsorption in Buerger's Disease (Thromboangiitis Obliterans): A Promising Therapeutic Option: Result of Consecutive Patient COHORT Treated in Clinical Routine Care. *Lupus Open Access*, **1**, Article 114. <https://doi.org/10.35248/2684-1630.16.1.114>
- [21] 尹悦, 李莉. IgE与自身免疫性疾病关系的研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(3): 242-245.
- [22] Kimura, A., Kohayashi, Y., et al. (1998) MICA Gene Polymorphism in Takayasu's Arteritis and Buerger's Disease. *International Journal of Cardiology*, **66**, S107-S113. [https://doi.org/10.1016/S0167-5273\(98\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(98)00157-0)
- [23] Fakour, F. and Fazeli, B. (2019) Visceral Bed Involvement in Thromboangiitis Obliterans: A Systematic Review. *Vascular Health and Risk Management*, **15**, 317-353. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S182450>
- [24] 上海第二医学院附属瑞金医院中西医结合脉管炎小组, 上海第二医学院附属瑞金医院内科. 血栓闭塞性脉管炎合并心肌梗塞三例报告[J]. 心脏血管疾病, 1978, 6(1): 19-21.
- [25] Papa, M., Bass, A., Adar, R., et al. (1992) Autoimmune Mechanisms in Thromboangiitis Obliterans (Buerger's Disease): The Role of Tobacco Antigen and the Major Histocompatibility Complex. *Surgery*, **111**, 527-531.
- [26] 孙凯, 冯琦, 窦科峰. 性激素免疫调节效应与疾病发生的关系[J]. 中华预防医学杂志, 2002, 36(6): 421-423.
- [27] 郑萍, 陈赛娟, 邵慧珍. 血栓闭塞性脉管炎血液高凝状态的研究[J]. 中华医学杂志(英文版), 1989, 102(1): 67-71.