

# 胚胎及胚后发育期鸭腔上囊淋巴细胞增殖与凋亡的研究

方 静, 崔恒敏\*, 廖婷彬, 崔 雪  
(四川农业大学动物医学院, 雅安 625014)

**摘 要:** 采用 PCNA 免疫组化法和 TUNEL 染色法, 并结合光、电镜技术研究天府肉鸭胚胎及胚后发育期腔上囊淋巴细胞增殖与凋亡的动态变化规律。结果显示胚胎期腔上囊淋巴细胞增殖明显, 其滤泡淋巴细胞增殖指数 (PIF) 随胚龄增加而逐渐增高, 26 d 胚龄达峰值。胚后期各组滤泡皮质淋巴细胞增殖指数 (PIC) 和髓质淋巴细胞增殖指数 (PIM) 均呈下降趋势; 各组 PIM 均明显高于 PIC。胚胎期腔上囊滤泡淋巴细胞凋亡指数 (AIF) 随胚龄增大而逐渐增高。胚后期 0~3 周龄滤泡髓质淋巴细胞凋亡指数 (AIM) 继续增高, 滤泡皮质淋巴细胞凋亡指数 (AIC) 则无明显变化; AIC 和 AIM 在 5 周龄下降, 17 周龄明显升高, 29 周龄达峰值。胚后 0~14 周龄, 各组 AIM 均明显高于 AIC, 而 17~29 周龄 AIM 则明显低于 AIC。凋亡淋巴细胞核呈现多种形态, 线粒体肿胀, 嵴断裂。结果提示淋巴细胞增殖与凋亡在鸭腔上囊胚胎及胚后发育的整个过程中普遍存在, 具有明显增龄变化特性, 二者协同参与腔上囊发育和退化过程。

**关键词:** 天府肉鸭; 腔上囊发育; 细胞凋亡; 细胞增殖

中图分类号: S852.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)11-1581-07

## Study on Lymphocyte Proliferation and Apoptosis in the Embryonic and Post Embryonic Development of the Duck Bursa of Fabricius

FANG Jing, CUI Heng-min\*, LIAO Ting-bin, CUI Xue

(College of Animal Veterinary, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** By proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry, terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL), light and electron microscopy techniques, the changing patterns of lymphocyte proliferation and apoptosis during the embryonic and post embryonic development of the Tianfu duck bursa of Fabricius were studied. In the embryonic period, the lymphocyte proliferation in the bursa was prominent. As the embryos grew, the proliferative index of lymphocytes in the follicle (PIF) increased gradually, and reached the peak at 26 embryonic days. After hatching, both proliferative indexes of lymphocyte in the cortex (PIC) and medullar (PIM) in each age group dropped progressively. PIM was higher than PIC in each group. During the embryonic development of the organ, the apoptosis index of lymphocyte in the follicle (AIF) increased gradually. During 0-3 weeks posthatching, the apoptosis index of lymphocytes in the medullar (AIM) rose continually, whereas the apoptosis index of lymphocytes in the cortex (AIC) kept unchanged. Both AIM and AIC decreased at 5 weeks and increased at 17 weeks, reaching their plateaus at 29 weeks. During 0-14 weeks after hatching, AIM in each group was higher than AIC, whereas AIM in each group was lower than AIC during 17-29 weeks. The nucleus of apoptotic lymphocytes with swollen mitochondria and broken

收稿日期: 2007-11-07

基金项目: 国家自然科学基金 (30471304); 科技厅重点项目 (03JY029-030-02)

作者简介: 方 静 (1963-), 女, 四川昭觉人, 博士生, 副教授, 硕士生导师, 主要从事比较组织学研究, E-mail: fangjing@sicau.edu.cn

\* 通讯作者: 崔恒敏 (1958-), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事禽病免疫病理学研究, E-mail: hmcui@safc.edu

cristae mitochondriales presented different futures. The results indicated that the proliferation and apoptosis of lymphocytes exist universally during the normal embryonic and post embryonic development of the duck bursa of Fabricius which undergoes obvious age-related changes, and then supervise and control the whole development, and regression of the bursa cooperatively.

**Key words:** Tianfu duck; development of the bursa of Fabricius; apoptosis; cell proliferation

细胞增殖是细胞新生的过程,是组织和器官发育的基础。而细胞凋亡则是细胞退化、死亡的过程,以清除发育不正常、衰老以及有害的细胞,以防止发生疾病<sup>[1]</sup>。两者的关系不是随机出现的,而是受生长因子或相关基因的调节与控制,具有严格的时空程序<sup>[2]</sup>。腔上囊是禽类特有的中枢免疫器官,是培育B淋巴细胞的场所,在不同发育阶段其大小、组织结构和功能有很大的变化<sup>[3]</sup>。而这种变化往往与淋巴细胞的选择性发育密切相关。因此,研究腔上囊发育过程中淋巴细胞增殖与凋亡变化的规律及相互关系对探讨腔上囊发育和退化过程的相关机理,调节免疫器官发育,制定合理的免疫程序具有重要意义。目前有关腔上囊淋巴细胞正常凋亡和增殖已有一些报道,但主要集中在鸡,且集中在腔上囊发育的某一特定时期<sup>[4-7]</sup>。而鸭腔上囊胚胎及胚后发育期淋巴细胞增殖和凋亡的动态研究还未见报道。本试验应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL染色法)、增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)免疫组织化学方法并结合光、电镜技术对天府肉鸭腔上囊胚胎和胚后发育整个过程中淋巴细胞的增殖和凋亡进行动态观察,以揭示这2种细胞行为各自的作用及相互联系的规律。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选用四川农业大学种鸭场同批孵化和饲养的天府肉鸭。胚胎期分为4个组,即20、22、24、26 d 胚龄;胚后期分为12个组,即:0(新生雏)、3、5、8、11、14、17、20、23、26、29、32周龄。每组5只(胚胎期不分性别,新生雏及胚后期均为雄鸭)。

### 1.2 光、电镜标本制作

分别采取胚体和雄鸭的腔上囊,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,5  $\mu\text{m}$ 连续切片,供光镜染色用。此外,在22、26 d 胚龄和胚后3、5、8、20、29周龄组中分别再取腔上囊组织1~2块,2.5%戊二醛固定,环氧树脂包埋,超薄切片,锇酸染色,于透射电镜(H

—600型)下观察淋巴细胞凋亡的超微结构变化。

### 1.3 HE染色

石蜡切片脱蜡后,HE染色。

### 1.4 PCNA免疫组织化学染色

小鼠抗人PCNA单克隆抗体、SABC试剂盒购于博士德公司。石蜡切片脱蜡至水,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 室温孵育。pH6.0的枸橼酸缓冲液抗原热修复,加5% BSA封闭液后,加入PCNA(1:100),4  $^\circ\text{C}$ 过夜。滴加生物素标记的二抗,37  $^\circ\text{C}$ 孵育30 min,滴加SABC试剂,37  $^\circ\text{C}$ 孵育30 min后DAB显色。苏木素复染,常规脱水,透明,封片。各步骤间均用PBS冲洗,同时另用PBS代替一抗作为阴性对照。PCNA阳性反应物定位于细胞核,呈棕黄色。

### 1.5 TUNEL染色

TUNEL试剂盒购于博士德公司。石蜡切片脱蜡至水,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 室温孵育10 min,蛋白酶K(1:200)室温孵育10 min,滴加20  $\mu\text{L}$ 的TUNEL反应混合液,于湿盒中37  $^\circ\text{C}$ 孵育120 min,加封闭液室温孵育30 min,加50  $\mu\text{L}$ 生物素化抗地高辛抗体(1:100),37  $^\circ\text{C}$ 孵育30 min,滴加SABC(1:100)试剂,37  $^\circ\text{C}$ 孵育60 min后DAB显色。苏木素复染,常规脱水,透明,封片。以上各步骤均用TBS冲洗。阴性对照用不含末端脱氧核苷酸转移酶的液体孵育。TUNEL阳性反应物定位于细胞核,呈棕黄色。

### 1.6 定量分析和统计学处理

每个腔上囊标本间隔200  $\mu\text{m}$ 取1张切片,共取3张切片,每张切片随机选取淋巴滤泡各10个进行淋巴滤泡面积的测定和阳性细胞计数(江苏捷达801形态分析软件)。增殖指数或凋亡指数=单位面积内PCNA或TUNEL阳性淋巴细胞总数/单位面积内淋巴细胞总数 $\times 100\%$ <sup>[8]</sup>。结果均用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用单因素方差分析F检验和组间t检验。数据处理均用SPSS11.5软件。

## 2 结果

### 2.1 腔上囊胚胎和胚后发育的组织形态学

胚胎及胚后发育期各组腔上囊淋巴滤泡面积见

表 1、2。20 d 胚龄淋巴滤泡逐渐形成,滤泡内尚未出现明显可辨的皮质和髓质样结构;22~24 d 胚龄滤泡不断生长,其面积逐渐增大,部分滤泡已能分辨出皮、髓质;26 d 胚龄滤泡面积增长幅度较大,滤泡显著长大,多数滤泡已能分辨出皮、髓质。新生雏滤泡已基本具有成熟的组织结构,大多数滤泡皮、髓质分界明显。胚后 0~3 周龄,滤泡面积增长幅度较大,滤泡生长迅速;5~8 周龄滤泡面积增长幅度较小,滤泡生长缓慢;8~14 周龄滤泡面积变化不大,滤泡不再扩大。17 周龄腔上囊开始退化,滤泡面积

显著减小;20~29 周龄随腔上囊进一步退化,滤泡面积呈下降趋势,滤泡逐渐变小且数量减少,滤泡髓质淋巴细胞稀疏,滤泡间结缔组织增多;32 周龄腔上囊严重萎缩,管腔狭小,滤泡消失,遗留下黏膜上皮和固有膜中大量结缔组织及其残留分散的淋巴细胞。由此可见,腔上囊的胚后发育可分为继续发育期(0~8 周龄)、成熟持续期(8~14 周龄)、退化萎缩期(17~32 周龄)。其中继续发育期又可分为快速生长期(0~3 周龄)和慢速生长期(5~8 周龄)。

表 1 胚胎发育期腔上囊滤泡面积以及淋巴细胞增殖指数和凋亡指数

Table 1 Follicle areas, proliferative and apoptosis indexes of lymphocytes during the bursal embryonic development

组别 Group	滤泡面积 Follicle area/ $\mu\text{m}^2$	滤泡淋巴细胞增殖指数 PIF/%	滤泡淋巴细胞凋亡指数 AIF/%
20 d	7 569.78 $\pm$ 890.12	73.40 $\pm$ 5.32	2.63 $\pm$ 0.74
22 d	27 123.19 $\pm$ 3 396.73	77.70 $\pm$ 7.47	4.10 $\pm$ 0.72
24 d	33 304.67 $\pm$ 6 639.77	84.03 $\pm$ 6.94	6.01 $\pm$ 0.69
26 d	89 124.23 $\pm$ 8 591.74	89.57 $\pm$ 5.79	7.91 $\pm$ 0.83

在同一测定项目中,各组间均差异显著( $P<0.05$ )

In the same tested item, the values are different among groups( $P<0.05$ ). PIF. Proliferative index of lymphocyte in the follicle; AIF. Apoptotic index of lymphocyte in the follicle

表 2 胚后发育期腔上囊滤泡面积以及淋巴细胞增殖指数和凋亡指数

Table 2 Follicle areas, proliferative and apoptosis indexes of lymphocytes during the bursal post embryonic development

组别 Group	滤泡面积 Follicle area/ $\mu\text{m}^2$	滤泡髓质淋巴 细胞增殖指数 PIM/%	滤泡皮质淋巴 细胞增殖指数 PIC/%	滤泡髓质淋巴 细胞凋亡指数 AIM/%	滤泡皮质淋巴 细胞凋亡指数 AIC/%
0 week	106 583.41 $\pm$ 4 420.27 <sup>a</sup>	72.30 $\pm$ 7.43	64.11 $\pm$ 8.63	10.55 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup>	7.99 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>
3 weeks	223 968.41 $\pm$ 16 534.02	54.90 $\pm$ 5.87	47.61 $\pm$ 9.37	14.67 $\pm$ 1.74	8.10 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>
5 weeks	257 637.79 $\pm$ 13 764.85	36.01 $\pm$ 6.26	30.97 $\pm$ 6.84	8.18 $\pm$ 1.31 <sup>b</sup>	6.36 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>
8 weeks	274 500.70 $\pm$ 14 172.78 <sup>b</sup>	25.36 $\pm$ 5.74 <sup>a</sup>	20.03 $\pm$ 4.80 <sup>a</sup>	8.27 $\pm$ 1.13 <sup>b</sup>	5.99 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>
11 weeks	280 351.67 $\pm$ 7 737.38 <sup>b</sup>	25.10 $\pm$ 5.15 <sup>a</sup>	19.77 $\pm$ 3.23 <sup>a</sup>	7.90 $\pm$ 1.04 <sup>b</sup>	5.46 $\pm$ 1.06 <sup>b</sup>
14 weeks	280 681.07 $\pm$ 10 958.59 <sup>b</sup>	24.39 $\pm$ 5.37 <sup>a</sup>	19.53 $\pm$ 3.87 <sup>a</sup>	8.94 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	6.76 $\pm$ 1.31 <sup>b</sup>
17 weeks	193 894.64 $\pm$ 12 995.71	12.66 $\pm$ 1.85	9.89 $\pm$ 1.97	10.81 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	12.14 $\pm$ 1.29
20 weeks	153 677.56 $\pm$ 7 361.03	10.45 $\pm$ 1.46 <sup>b</sup>	7.15 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>	12.16 $\pm$ 1.71	15.88 $\pm$ 1.77
23 weeks	127 237.31 $\pm$ 11 721.92	9.48 $\pm$ 1.61 <sup>b</sup>	6.51 $\pm$ 0.84 <sup>b</sup>	14.59 $\pm$ 1.92 <sup>c</sup>	17.19 $\pm$ 1.98
26 weeks	107 577.59 $\pm$ 7 779.47 <sup>a</sup>	7.34 $\pm$ 1.01	5.58 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	14.81 $\pm$ 1.48 <sup>c</sup>	20.34 $\pm$ 1.76
29 weeks	16 714.70 $\pm$ 2 864.39	4.47 $\pm$ 0.99	3.80 $\pm$ 0.78	16.21 $\pm$ 2.00	22.28 $\pm$ 2.57

在同一测定项目中,相同小写字母间差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母及未标注间差异显著( $P<0.05$ )。在同一组中,PIM 和 PIC 之间以及 AIM 和 AIC 之间,差异均显著( $P<0.05$ )

In the same tested item, the values followed by the same small letters are not different( $P>0.05$ ), and those followed by the different small letters or without letters are different among groups( $P<0.05$ ). In the same group, the values are different( $P<0.05$ ) between PIM and PIC, or AIM and AIC. PIC. Proliferative index of lymphocyte in the cortex; PIM. Proliferative index of lymphocyte in the medullar; AIM. Apoptotic index of lymphocyte in the medullar; AIC. Apoptotic index of lymphocyte in the cortex

## 2.2 PCNA 免疫组织化学染色结果

胚胎及胚后发育期各组腔上囊淋巴细胞增殖指数见表1、2。20~24 d 胚龄, PIF 随胚龄增加而逐渐增高, 26 d 胚龄时达峰值。新生雏的 PIC 和 PIM 明显下降。在胚后发育中, 各组的 PIC 和 PIM 一直呈下降趋势。与前一周龄相比较, 3、5、8 和 17 周龄的 PIC 和 PIM 下降幅度较大(图1~4)。32 周龄固有膜中残留淋巴细胞的增殖指数仅为  $(2.36 \pm 0.53)\%$ 。在胚后期, 各组 PIM 均明显高于 PIC。

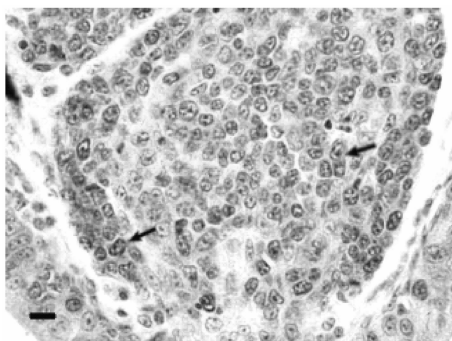


图1 22 d 胚龄腔上囊淋巴细胞 PCNA 阳性反应, 细胞核呈棕黄色(箭头), 标尺=5  $\mu\text{m}$

Fig. 1 PCNA positive reaction of bursal lymphocytes with yellow brown nucleus( arrows) at 22 days embryonic stage, bar=5  $\mu\text{m}$

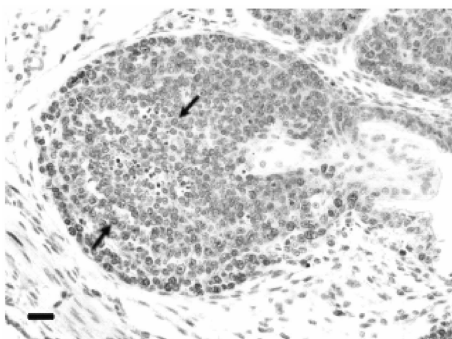


图2 26 d 胚龄腔上囊淋巴细胞 PCNA 阳性反应, 细胞核呈棕黄色(箭头), 标尺=20  $\mu\text{m}$

Fig. 2 PCNA positive reaction of bursal lymphocytes with yellow brown nucleus( arrows) at 26 days embryonic stage, bar=20  $\mu\text{m}$

## 2.3 TUNEL 染色结果

胚胎及胚后发育期各组腔上囊淋巴细胞凋亡指数见表1、2。20~26 d 胚龄, AIF 逐渐增高。胚后0~3 周龄, AIM 呈上升趋势, 而 AIC 则无明显变化。AIM 和 AIC 在 5 周龄均显著下降, 并维持恒定直到 14 周龄, 17 周龄又明显升高, 随后呈上升趋势, 29 周龄达峰值(图5~8)。32 周龄固有膜中残留淋巴

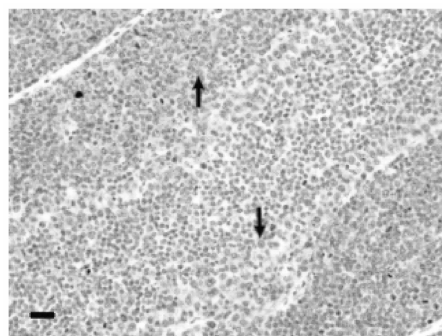


图3 胚后3 周龄腔上囊淋巴细胞 PCNA 阳性反应, 细胞核呈棕黄色(箭头), 标尺=20  $\mu\text{m}$

Fig. 3 PCNA positive reaction of bursal lymphocytes with yellow brown nucleus( arrows) at 3 weeks after hatching, bar=20  $\mu\text{m}$

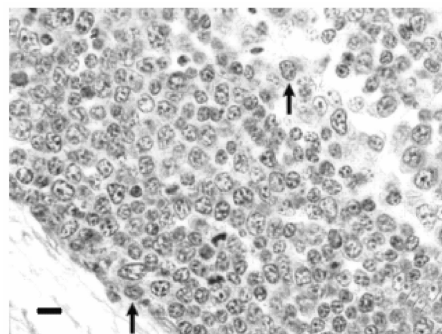


图4 胚后29 周龄腔上囊 PCNA 淋巴细胞阳性反应, 细胞核呈棕黄色(箭头), 标尺=5  $\mu\text{m}$

Fig. 4 PCNA positive reaction of bursal lymphocytes with yellow brown nucleus( arrows) at 29 weeks after hatching, bar=5  $\mu\text{m}$

细胞的凋亡指数仅为  $(2.32 \pm 0.66)\%$ 。此外, 胚后0~14 周龄的 AIM 明显高于 AIC, 17~29 周龄的 AIC 则显著高于 AIM。

## 2.4 增殖指数和凋亡指数的关系

20~26 d 胚龄, PIF 远大于 AIF。胚后0~14 周龄, PIC 和 PIM 也明显高于 AIC 和 AIM, 但随周龄增加, 二者差值分别逐渐减小; 17 周龄, PIC 和 PIM 与 AIC 和 AIM 已接近; 20~29 周龄, AIC 和 AIM 则显著高于 PIC 和 PIM, 二者的差值分别随周龄增加而增高。详情见表1和2。

## 2.5 电镜观察结果

在各测定组中均观察到淋巴细胞的凋亡, 其中3 周龄髓质和 29 周龄皮、髓质中淋巴细胞凋亡最明显。凋亡的形态学改变主要为核染色质固缩边聚, 呈新月形、环形、球形或不规则形高电子密度的浓缩核, 线粒体肿胀, 嵴断裂, 最后凋亡细胞裂解为凋亡

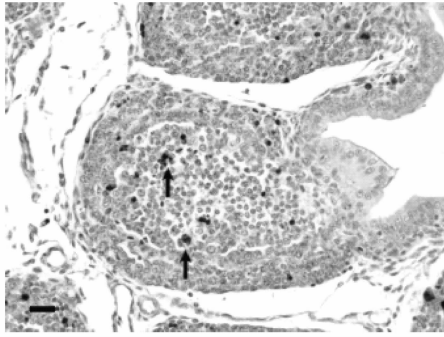


图 5 26 d 胚龄腔上囊淋巴细胞 TUNEL 阳性反应 (箭头), 标尺=20 μm

Fig. 5 TUNEL positive reaction of bursal lymphocytes (arrows) at 26 days embryonic stage, bar=20 μm

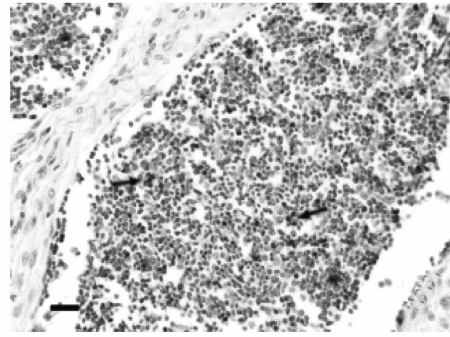


图 8 胚后 29 周龄腔上囊淋巴细胞 TUNEL 阳性反应 (箭头), 标尺=20 μm

Fig. 8 TUNEL positive reaction of bursal lymphocytes (arrows) at 29 weeks after hatching, bar=20 μm

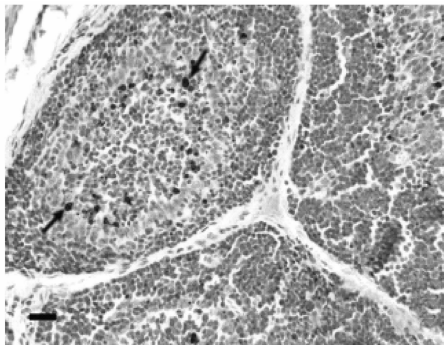


图 6 胚后 3 周龄腔上囊淋巴细胞 TUNEL 阳性反应 (箭头), 标尺=20 μm

Fig. 6 TUNEL positive reaction of bursal lymphocytes (arrows) at 3 weeks after hatching, bar=20 μm

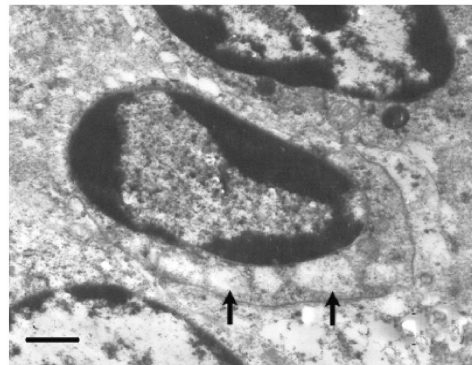


图 9 胚后 8 周龄腔上囊, 凋亡淋巴细胞核染色质固缩呈新月型, 线粒体肿胀, 嵴断裂 (箭头), 标尺=1 μm

Fig. 9 The chromatin of apoptotic bursal lymphocytes with swollen mitochondria and broken cristae mitochondriales (arrows) appear crescent at 8 weeks after hatching, bar=1 μm

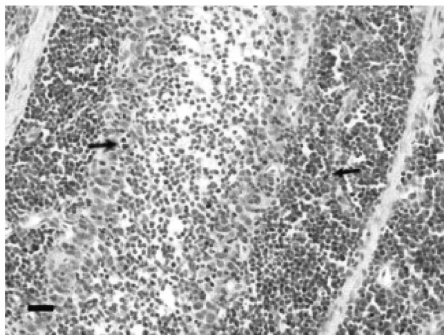


图 7 胚后 14 周龄腔上囊淋巴细胞 TUNEL 阳性反应 (箭头), 标尺=20 μm

Fig. 7 TUNEL positive reaction of bursal lymphocytes (arrows) at 14 weeks after hatching, bar=20 μm

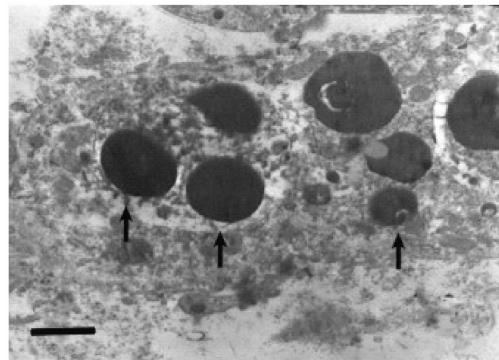


图 10 胚后 3 周龄腔上囊, 凋亡淋巴细胞裂解后形成多个凋亡小体 (箭头), 标尺=1 μm

Fig. 10 Several apoptotic bodies (arrows) are formed by the breakage of apoptotic bursal lymphocytes at 3 weeks after hatching, bar=1 μm

小体(图 9、10)。

### 3 讨论

#### 3.1 淋巴细胞增殖与腔上囊的胚胎和胚后发育

PCNA 是一种只出现在增殖状态细胞核中的蛋白质,PCNA 阳性细胞着色多少反映出细胞增殖的状态<sup>[9]</sup>。本研究结果显示在腔上囊胚胎和胚后发育的整个过程中均存在淋巴细胞 PCNA 阳性反应。在淋巴滤泡逐渐形成时,即 20 d 胚龄,淋巴细胞增殖分化活跃,PIF 高达 73.40%,以后随胚龄的增加,滤泡逐渐增大,PIF 也逐渐增高。26 d 胚龄时,滤泡显著增大,大多数淋巴滤泡皮、髓质分界明显,PIF 达峰值(89.57%),此时是腔上囊淋巴细胞增殖分化最明显的时期。新生雏的腔上囊已基本具有成熟的组织结构,大多数淋巴滤泡皮、髓质分界明显,PIM 和 PIC 降低。胚后 3 周龄,PIM 和 PIC 虽然较出壳时明显下降,但仍维持较高水平(PIM 为 54.90%,PIC 为 47.61%),较多淋巴细胞处于增殖状态,淋巴滤泡显著增长。胚后 5~8 周龄淋巴滤泡的生长已趋于缓慢,8~14 周龄,腔上囊基本不再继续生长,滤泡不再扩大,PIM 和 PIC 分别在 5 和 8 周龄出现下降高峰。17 周龄腔上囊开始退化,PIM 和 PIC 再次显著下降,且随腔上囊进一步退化(20~29 周龄)呈下降趋势。32 周龄腔上囊严重萎缩,滤泡消失,遗留下黏膜上皮和固有膜中大量的结缔组织及其残留分散的淋巴细胞,其淋巴细胞增殖指数降至 2.36%。由此可见,天府肉鸭腔上囊淋巴细胞增殖具有明显增龄变化特性,与腔上囊发育和退化密切相关。陈吉龙等通过常规光、电镜技术在北京鸭胚胎和胚后腔上囊的发育研究中也得出类似的结论<sup>[10]</sup>。此外,胚后各组 PIM 均明显高于 PIC,这符合滤泡发育的正常规律,因为滤泡髓质多为幼稚型的大、中淋巴细胞,皮质多为成熟的小淋巴细胞<sup>[3]</sup>。这也说明了滤泡髓质在淋巴细胞发育、分化中占有重要的地位。

#### 3.2 淋巴细胞凋亡与腔上囊的胚胎和胚后发育

从骨髓来的淋巴干细胞经血液循环进入腔上囊滤泡,在上皮网状细胞构成的微环境诱导下,不断分裂分化,形成各种特异性的 B 淋巴细胞,然后迁移到外周淋巴组织和器官定居<sup>[3]</sup>。然而,在这一过程中仅 5% 的 B 淋巴细胞离开腔上囊,大多数细胞通过凋亡的方式死亡<sup>[11]</sup>。因此,凋亡对腔上囊中淋巴细胞的发育、分化和成熟以及保持其功能稳定性方面均发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。作者采用 TUNEL 法与

电镜技术检测发现天府肉鸭腔上囊在胚胎和胚后发育的整个过程中都存在着淋巴细胞凋亡现象。在淋巴滤泡逐渐形成时(20 d 胚龄),淋巴细胞凋亡较少,随胚龄增大,滤泡的生长,凋亡逐渐活跃。出壳后,0~3 周龄 AIM 增高,而 AIC 则变化不大。5 周龄时,AIM 和 AIC 均显著下降,并维持恒定直到 14 周龄;17 周龄腔上囊开始退化,AIM 和 AIC 明显升高,随后呈上升趋势,29 周龄腔上囊严重退化,皮、髓质凋亡最为活跃。由此说明天府肉鸭腔上囊淋巴细胞凋亡具有显著增龄变化特征,与腔上囊发育和退化密切相关。本试验中发现胚后期腔上囊淋巴细胞凋亡指数较胚胎期高,说明胚后期腔上囊淋巴细胞凋亡较胚胎期活跃,这与李奎等<sup>[5]</sup>在鸡中的报道相似。本研究结果还显示在腔上囊胚后继续发育期(0~8 周龄)和成熟持续期(8~14 周龄),AIM 明显高于 AIC;而在退化萎缩期(17~32 周龄),AIM 则明显低于 AIC,表明在腔上囊胚后发育不同时期,其滤泡皮、髓质淋巴细胞凋亡程度不同。此外,胚后 3 周龄是腔上囊继续发育的快速生长期,髓质淋巴细胞凋亡也较明显(AIM 达 14.67%),提示胚后 3 周龄可能是天府肉鸭腔上囊对淋巴细胞进行严格选择的时期,是 B 淋巴细胞进行分化发育的重要阶段。

目前有关腔上囊淋巴细胞凋亡的原因还不甚清楚,主要有 2 种观点:一是与识别自身抗原有关,因此,经过阴性选择,那些产生抗自身抗原抗体的细胞,会迅速凋亡以防止自身免疫性疾病的产生;二是与阳性选择失败有关,即 B 淋巴细胞在发育过程中必须经历免疫球蛋白的基因重排,基因重排未成功的 B 淋巴细胞将发生凋亡<sup>[13-14]</sup>。现已发现许多基因的表达与凋亡有关,目前研究较多的有 bcl-2 家族、fas 和 fas-L 系统、p53 基因等。bcl-2 家族编码的蛋白质在凋亡的调节中发挥着重要的作用<sup>[15]</sup>。bcl-2 和 bax 是 bcl-2 家族中功能相反的 2 个重要成员,分别有抑制和促进凋亡的作用,它们对凋亡的调节与线粒体上的 PT 孔(Permeability transition)有关。当凋亡发生时,bax 从细胞质中转移到线粒体,并通过其疏水性的 C 端 BH1、BH2 结构域与线粒体膜相结合,形成线粒体跨膜通道,促进 PT 孔开放,释放细胞色素 c,激活 caspase 级联反应,促进细胞凋亡;bcl-2 的表达产物主要分布于线粒体膜上,其高表达时,与 bax 结合成异源二聚体,抑制 PT 孔开放,抑制 caspase 级联反应的激活,从而阻止和抑制凋亡<sup>[15]</sup>。本试验结果表明,凋亡淋巴细胞的线粒体

肿胀,嵴断裂,可能严重影响了 bcl-2、bax 的表达及其功能的发挥,从而影响细胞凋亡的发生。

### 3.3 胚胎和胚后发育过程中腔上囊淋巴细胞增殖与凋亡的关系

本研究结果显示,20~26 d 胚龄,PIF 远大于 AIF,说明在胚胎期淋巴细胞具有高分化潜力和增殖能力,有利于 B 细胞的最大增殖和最小死亡,有利于免疫球蛋白的基因表达和体内成熟过程,使干细胞库不断扩大。胚后继续发育期(0~8 周龄),PIM 和 PIC 也显著大于 AIM 和 AIC,表明淋巴细胞的增殖仍处于活跃阶段,有利于腔上囊滤泡进一步分化发育,形成完善的形态结构,并发挥其有效的免疫效应。胚后成熟持续期(8~14 周龄),腔上囊基本不再继续生长,滤泡不再扩大,PIM 和 PIC 与 AIM 和 AIC 之间的差值逐渐减小。17 周龄腔上囊开始退化,PIM 和 PIC 与 AIM 和 AIC 已接近。以后随腔上囊进一步退化萎缩(23~29 周龄),AIM 和 AIC 则显著高于 PIM 和 PIC,二者的差值分别随周龄增加而增大,提示腔上囊逐渐完成对 B 淋巴细胞的增殖,淋巴细胞以凋亡为主,以消除不必要的淋巴细胞,维持正常的免疫功能。总之,细胞增殖与凋亡相互协调,及时调控着细胞的增殖和分化,及时清除异常、衰老的淋巴细胞,在鸭腔上囊发育、分化和退化过程中发挥着重要作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] DAVID R H,STEPHEN M C. Connecting proliferation and apoptosis in development and disease[J]. *Molecular Cell Biology*,2004,(4):895-915.
- [ 2 ] LICHNOVSKY V,KOLAR Z,MURRAY P, et al. Differences in P53 and Bcl-2 expression in relation to cell proliferation during the development of human embryos[J]. *Mol Pathol*,1998,51(3):131-137.
- [ 3 ] HODGES R D. The histology of the fowl[M]. London:Academic Press, 1974:206-212.
- [ 4 ] HIGGINS S E, BERGHMAN L R, MOORE R W. *In situ* detection and quantification of bursa of fabricius cellular proliferation or apoptosis in normal or steroid-treated neonatal chicks [J]. *Poultry Science*, 2002,81:1 136-1 141.
- [ 5 ] 李 奎,康相涛,刘 英. 固始鸡中枢免疫器官细胞和自然凋亡细胞超微结构研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2007,38(1):89-95.
- [ 6 ] 张书霞,陈万芳,于 勇,等. Bcl-2 基因在成年和胚胎鸡免疫器官中的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. *南京农业大学学报*,1999,22(4):65-68.
- [ 7 ] 张书霞,鲍恩东. 鸡免疫器官中半胱天冬酶-3、Bcl-2 的表达与细胞凋亡的关系[J]. *畜牧兽医学报*,2002, 33(6):619-622.
- [ 8 ] SANCHEZ-REFUSTA E,CIRIACO E,GERMANA G, et al. Age-related changes in the medullary reticular epithelial cells of the pigeon bursa of Fabricius [J]. *Anatomical Record*,1996,246:473-480.
- [ 9 ] OGATA K,KURKI P,CELIS J E, et al. Monoclonal antibodies to a nuclear protein(PCNA/cyclin) associated with DNA replication[J]. *Exp Cell Res*,1987, 168(2):475-486.
- [10] 陈吉龙,王 平. 北京鸭腔上囊的研究, IX、胚胎后期及胚后腔上囊的发育[J]. *北京大学学报(自然科学版)*,1993,29(6):640-647.
- [11] RUEY M L,GERMAIN G,JOAN B. Role of Nr13 in regulation of programmed cell death in the bursa of Fabricius[J]. *Genes & Dev*, 1999,13(6): 718-728.
- [12] NEIMAN P E,THOMAS S J,LORING G. Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1991,88:5 857-5 861.
- [13] RUEY M L,GERMAIN G, PAUL N. Molecular events in avian neoplasia: regulators of cell death in development of B-cell lymphomas in the chicken bursa of Fabricius [J]. *Avian Pathology*,1998,27:516-520.
- [14] 罗 克. 程序性细胞死亡与发育生物学(续)[J]. *福建畜牧兽医*,2001,6(23):47-53.
- [15] BOISE L H, GOTTSCHALK A R, QUINTANS J, et al. Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*,1995,200: 107-121.