

猪呼吸道淋巴组织发育的亚显微结构变化

杨 倩, 庾庆华, 李玉磊

(南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室, 南京 210095)

摘 要: 应用组织学和电镜技术研究猪呼吸道发育过程中淋巴组织的变化。结果表明: 扁桃体和咽部是呼吸道进入机体的第一个淋巴组织集中的部位, 弥散淋巴组织在出生时就存在, 淋巴小结不明显; 20 日龄时扁桃体中淋巴组织增生, 淋巴小结清晰可见; 120 日龄淋巴小结数量增加, 紧靠鳞状上皮密集排列, 淋巴小结发育很好, 并出现生发中心。扁桃体复层鳞状上皮中含有大量的上皮内淋巴细胞。气管又是呼吸道进入机体的第二个淋巴组织集中的部位, 出生时气管叉外膜中淋巴组织直接与气管支气管淋巴结相连, 淋巴组织明显可见。20 日龄时气管叉外膜中淋巴组织已分开, 形成气管叉外膜密集的淋巴组织和气管支气管淋巴结两个部分。120 日龄时气管叉处淋巴组织特别发达, 黏膜上皮中上皮内淋巴细胞数量也显著增加。肺内气管和细支气管固有膜中均有较多的淋巴细胞, 其中浆细胞数量增加, 上皮中仍存在少量的上皮内淋巴细胞。本试验结果提示猪呼吸道是黏膜免疫较理想的诱导位点和效应位点, 新生仔猪通过鼻腔免疫可提高呼吸道局部黏膜免疫力。

关键词: 猪呼吸道; 淋巴组织; 淋巴细胞; 发育

中图分类号: S852.16

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)04-0374-05

Ultrastructure Observation on the Ontogeny of Respiratory Tract Lymphoid Tissues in the Pig

YANG Qian, YU Qing-hua, LI Yu-lei

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry of Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Histology method and electron microscopy technique were used to investigate the changes of respiratory tract lymphoid tissues in pig during growth. The result showed that tonsil and pharynx were the first place of lymphoid tissue aggregation for respiratory tract entering the body. Lymphoid tissue in the tonsil existed at birth without any apparent lymph nodule aggregations. Lymphoid tissue began to increase at 20 days, with clear lymph nodule aggregations. The lymph nodules increased and densely packed beneath the stratified squamous epithelium of tonsils at 120 days. The well-developed lymph nodules were present with germinal center. A number of intraepithelial lymphocytes were located between the stratified squamous epithelium of tonsil. The bifurcation of trachea is the second place of lymphoid tissue aggregation for respiratory tract entering the body. The apparent lymphoid tissue in the adventitia of trachea bifurcation linked with tracheobronchial lymph nodule at birth, whereas they divided into two parts at 20 days: the packed lymphoid tissue in the adventitia of trachea bifurcation and tracheobronchial lymph nodule. The trachea bifurcation was rich with lymphoid tissue with increased intraepithelial lymphocytes at 120 days. More lymphocytes were located in the laminal propria of branches and bronchioles in the lung. The number of plasma cells increased and few intraepithelial lymphocytes existed

收稿日期: 2005-04-25

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2002111)

作者简介: 杨 倩(1962-), 女, 山东临沂人, 教授, 博导, 主要从事动物黏膜免疫方面的研究。E-mail: zxybq@njau.edu.cn

between the columnar epithelium. Our results showed that the respiratory tract of pig was the effective induction sites and effective sites of mucosal immune. The local immunity in the respiratory tract can be enhanced by the nasal immunity in the piglet.

Key words: respiratory tract of pig; lymphoid tissue; lymphocyte; development

呼吸道直接与外界相通,是机体最先接触细菌、病毒等病原微生物的部位。呼吸道黏膜下的固有层内存在一些淋巴组织,构成了机体抵御外界病原微生物入侵的第一道免疫屏障。人和小鼠等一些动物呼吸道中有丰富的鼻黏膜相关淋巴组织(NALT)和气管相关淋巴组织(BALT)^[1,2]。但有关猪的呼吸道淋巴组织的发育报道却很少。

随着我国养猪业生产规模的扩大,猪呼吸系统的传染病发生越来越频繁。目前疫苗免疫仍然是控制呼吸系统传染病的有效方法。其它动物上的试验表明通过鼻腔免疫不仅可引起局部呼吸道免疫反应,还可诱导全身性免疫保护作用^[3,4]。因此,鼻腔免疫愈来愈受到广大免疫学家的关注。鼻腔免疫的基础是呼吸道黏膜下的淋巴组织,研究猪呼吸道黏膜中淋巴组织的发育及组织学结构对鼻腔免疫的应用具有重要的理论意义。本研究主要通过组织学和电镜技术观察猪生长过程中的几个发育阶段淋巴组织的变化,进一步丰富黏膜免疫的基础理论,为预防因呼吸道传播为主的猪的传染病提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物及取材

由常州康乐种猪场提供大白猪 12 头。常规饲养管理。分别于 1 日龄、20 日龄及 120 日龄各宰杀 4 头。取鼻后孔、咽部、扁桃体、气管、气管叉和肺等组织各 6 块,分别用于组织学研究和电镜观察。

1.2 组织学方法

用于组织学研究的组织置 Bouin 氏液固定,常规石蜡切片(切片厚为 5 μm),HE 染色,树胶封片。应用 Olympus 显微镜观察并拍照。

1.3 电镜样品制备

用于电镜观察的组织各 3 块,制备电镜样品。将靠近黏膜面的组织修成 1 mm³ 的组织块,置于 2.5% 戊二醛固定液中,1% 四氧化锇后固定,常规电镜制片技术处理,Epon812 环氧树脂包埋。半薄切片用甲苯胺蓝、硫堇、次甲基蓝、焦油紫混合染液染色后,选出所取组织的黏膜面。超薄切片用醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色。JEM-100CX II 型透射

电镜观察并拍照。

2 结 果

2.1 鼻后孔

鼻后孔的黏膜上皮为复层鳞状上皮,上皮细胞基底部含有少量的淋巴细胞。固有层主要为大量的疏松的结缔组织,其中淋巴细胞较少。

2.2 扁桃体和咽部

扁桃体就位于鼻后孔的周围,扁桃体的上皮为复层鳞状上皮,上皮向黏膜内凹陷,形成很多隐窝。复层鳞状上皮中分布有大量的淋巴细胞(称上皮内淋巴细胞)。上皮下有大量的淋巴组织,其中含有一些淋巴小结。出生时(1 日龄)扁桃体处就存在淋巴组织,淋巴小结不明显;20 日龄淋巴组织增生,淋巴小结则清晰可见;120 日龄淋巴小结密集排列,甚至紧靠鳞状上皮(图 1)。淋巴小结发育很好,并出现生发中心。复层鳞状上皮内含有大量的上皮内淋巴细胞,这些淋巴细胞似乎从上皮基底面向上皮的游离面运动。上皮内淋巴细胞大多分布在上皮细胞基底部较疏松的间隙中,有的散在分布在复层鳞状上皮的多形细胞层和棘细胞层。上皮内淋巴细胞数量太多,以至于上皮内淋巴细胞在穿过复层鳞状上皮过程中形成淋巴细胞的细胞间通道(图 2),后者相互连接并开口于微隐窝。

2.3 气管和气管叉

气管的黏膜上皮为假复层纤毛柱状上皮,主要由纤毛细胞、杯状细胞和基细胞等组成。1 日龄仔猪气管的纤毛柱状上皮的纤毛不如 20 日龄和 120 日龄猪的明显。气管上皮细胞的基底部和近游离面均分布有少量的上皮内淋巴细胞(图 3)。1 日龄仔猪气管的纤毛柱状上皮中几乎没有上皮内淋巴细胞,20 日龄则有少量分布,120 日龄气管上皮中上皮内淋巴细胞数量明显增多。黏膜固有层中弹性纤维较多,其中散在分布有浆细胞和淋巴细胞,其数量也是随着猪日龄的增加而增加。1 日龄仔猪气管固有层中的淋巴细胞数量很少,20 日龄和 120 日龄淋巴细胞数量则逐渐增多。

与气管相比,气管叉处淋巴组织特别发达,黏膜

上皮中上皮内淋巴细胞数量显著增加。固有层中的淋巴细胞数量远多于气管。1 日龄仔猪气管叉外膜中淋巴组织直接与气管支气管淋巴结相连(图 4), 20 日龄时气管叉外膜中淋巴组织与淋巴结已分开, 形成气管叉外膜密集的淋巴组织和气管支气管淋巴结两个部分。

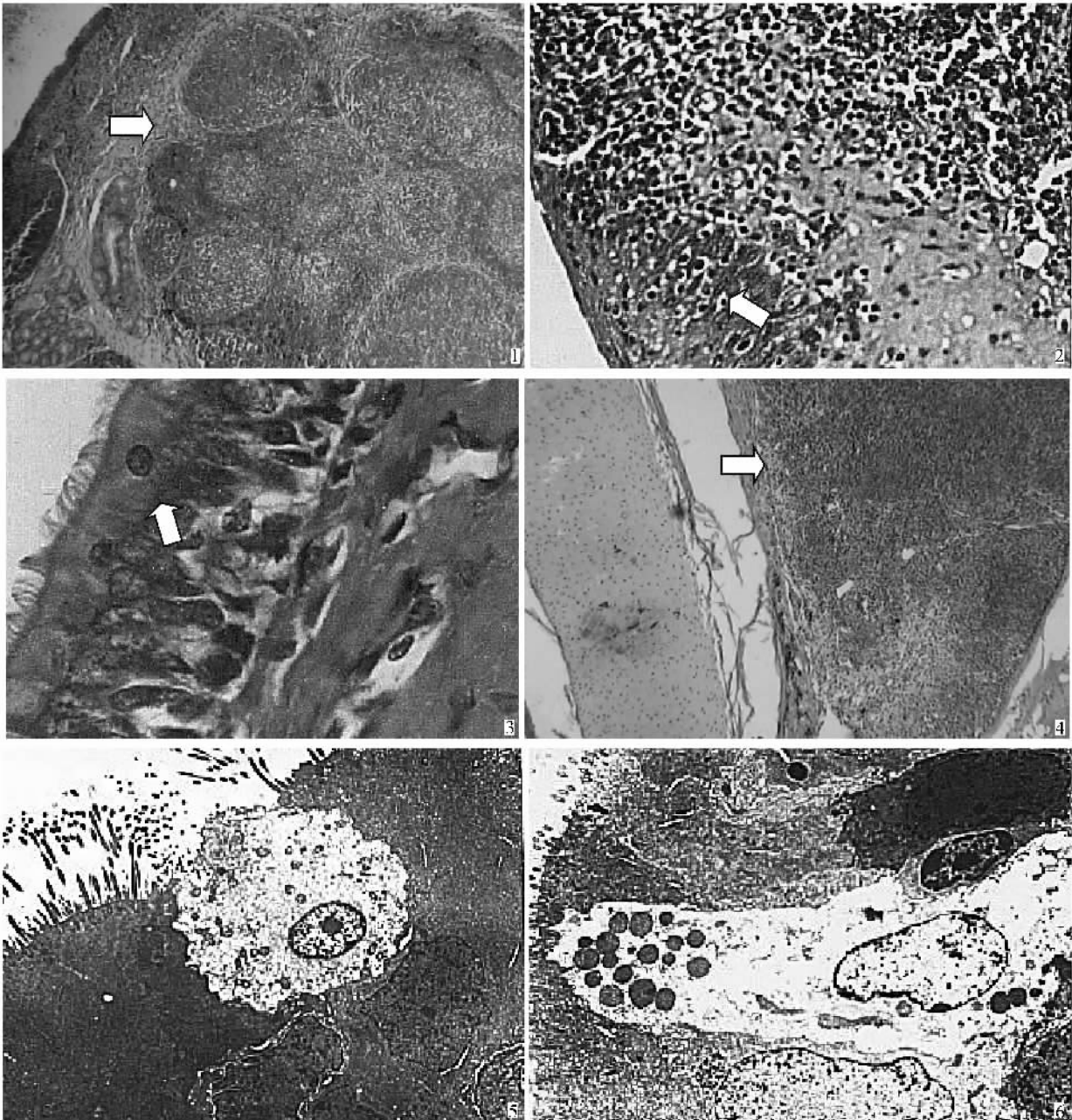
2.4 肺内气管和细支气管

肺内气管和细支气管上皮为单层纤毛柱状上皮, 上皮中夹杂着 Clara 细胞(图 5)和微绒毛细胞(图 6), Clara 细胞着色淡, 胞质内有较多的糖原颗粒, 顶部有致密的分泌颗粒。随着气管的不断分支

Clara 细胞数量增多。微绒毛细胞位于上皮的浅部, 细胞着色浅, 基部大, 上端形成狭窄的颈部, 顶部有少量微绒毛。肺内气管和细支气管上皮中仍存在少量的上皮内淋巴细胞, 固有膜中淋巴细胞数量比气管中的多(图 7), 浆细胞数量也增加, 浆细胞胞质内粗面内质网发达, 极度扩张, 呈绳索状排列(图 8)。

2.5 气管支气管淋巴结

1 日龄仔猪气管支气管淋巴结与气管叉外膜密集的淋巴组织相连; 20 日龄时淋巴细胞数量明显增加, 淋巴小结不明显, 无生发中心; 120 日龄时淋巴组织发达, 淋巴小结和生发中心均明显出现。



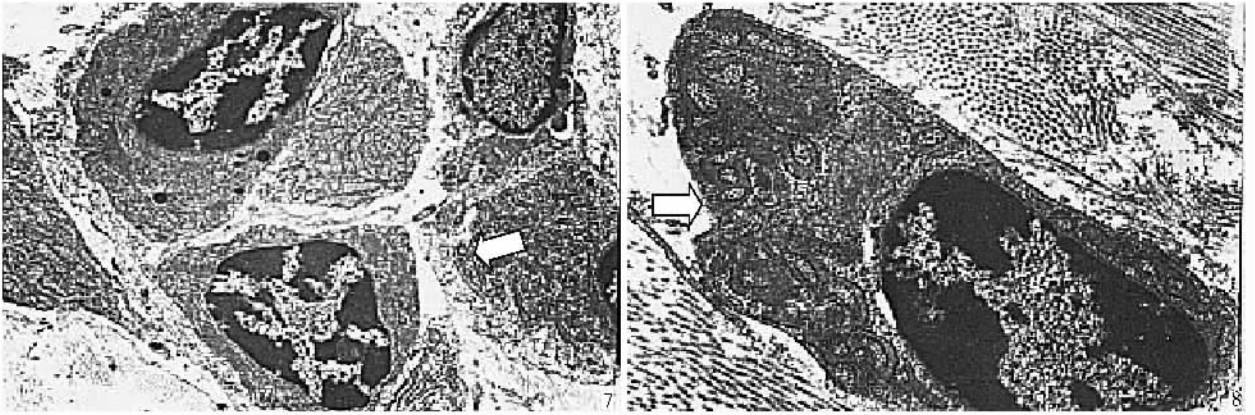


图 1 120 日龄猪扁桃体中密集排列的淋巴小结 40×

图 2 上皮内淋巴细胞正在穿过扁桃体复层鳞状上皮 200×

图 3 气管上皮细胞中分布的上皮内淋巴细胞 1 200×

图 4 1 日龄仔猪气管叉外膜中的淋巴组织 40×

图 5 120 日龄猪肺内细支气管上皮中的 Clara 细胞 4 000×

图 6 120 日龄猪肺内细支气管上皮中的微绒毛细胞 4 000×

图 7 肺内细支气管固有膜中的淋巴细胞 5 000×

图 8 肺内细支气管固有膜中的浆细胞 (注意胞浆内极度扩张的粗面内质网) 10 000×

Fig. 1 The densely packed lymph nodule in pig tonsils at 120 days 40×

Fig. 2 A number of intraepithelial lymphocytes were passing through the stratified squamous epithelium of tonsil 200×

Fig. 3 The intraepithelial lymphocytes located in the pseudostratified columnar of trachea 1 200×

Fig. 4 The lymphoid tissue in the adventitia of trachea bifurcation at 1 day 40×

Fig. 5 The Clara cells between the epithelium of bronchioles in the lung at 120 days 4 000×

Fig. 6 The microvilli cells between the epithelium of bronchioles in the lung at 120 days 4 000×

Fig. 7 The lymphocytes located in the lamina propria of bronchioles in the lung 5 000×

Fig. 8 The plasma cells located in the lamina propria of bronchioles in the lung (Note the maximally dilated rough endoplasmic reticulum in the cytoplasm) 10 000×

3 讨 论

上呼吸道是病原微生物进入机体的主要途径之一。猪咽部也有类似人的 Waldeyer's 环,包括腭扁桃体、咽扁桃体、咽鼓管咽口扁桃体和舌扁桃体,在咽部大致围成环状^[5]。在人和其它动物,扁桃体中均含有丰富的淋巴组织^[6]。这些扁桃体中大量淋巴小结和淋巴组织构成守卫呼吸道大门的卫兵。1 日龄刚出生的仔猪扁桃体中淋巴组织较少,淋巴小结较小。随着日龄的增加,猪的扁桃体中从有淋巴小结到淋巴小结发育良好并出现生发中心。这可能与出生后动物与外界环境密切接触有关系。新生儿及置于无菌环境中的动物,其淋巴组织中的淋巴小结很稀少;胎儿出生以后,咽淋巴环中的腭扁桃体常受抗原刺激引起免疫应答,导致淋巴组织增生^[7]。通过口腔免疫,扁桃体中淋巴组织大量增生,并产生免疫应答^[8]。这就提示新生仔猪通过鼻腔免疫可提高扁桃体中淋巴细胞的特异性免疫能力,扁桃体是呼吸道抵御病原微生物入侵机体的第一道屏障。

上皮内淋巴细胞(intestinal intraepithelial lymphocytes, iIEL)是机体首先接触外界微生物的免疫活性细胞。iIEL 可分泌多种细胞因子,如 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 等^[9]。小鼠小肠受到感染后分离出 iIEL 可长期对再次同样病原体的侵入产生长期的免疫保护作用^[10],表明 iIEL 在黏膜保护中的重要防御作用。近来研究发现,小肠黏膜中上皮内淋巴细胞来自固有膜,通过黏膜上皮间断地向肠腔排放^[11]。本研究结果发现气管上皮中也分布有上皮内淋巴细胞,特别是扁桃体和咽部复层鳞状上皮中存在大量的上皮内淋巴细胞。上皮中上皮内淋巴细胞数量与固有层中淋巴细胞数量一致,即固有层中淋巴细胞数量越多,上皮中上皮内淋巴细胞数量也越多。很明显这些上皮内淋巴细胞可能来源于固有层中的淋巴细胞。但有趣的是复层鳞状上皮之间存在较多的连接复合体,固有层中的淋巴细胞通过复层鳞状上皮比通过假复层柱状上皮要困难得多,什么原因导致上皮内淋巴细胞顺利穿过重重防线?有试验证明上皮内淋巴细胞能通过上皮迁移的原因可能是上皮表达趋化细胞因子,而固有膜淋巴细胞和 IEL 恰好

有趋化细胞因子特异性受体^[12],也有人认为腔内微生物的存在是导致上皮内淋巴细胞迁移的原因^[13]。扁桃体位于消化道和呼吸道入口的交汇处,其黏膜面的表面积相当大,并经常与抗原接触,微生物的存在很可能是主要原因。

Bradley 最早发现猪的支气管叉中存在大量的淋巴组织,将其称之为“支气管相关淋巴组织”^[14]。本试验进一步证明了这一点。支气管叉存在大量的淋巴组织也可成为鼻腔免疫的诱导位点和效应位点。如果说扁桃体是防御病原微生物从呼吸道进入机体的第一道大门,支气管叉则可看作是呼吸道防御病原微生物入侵的第二道大门。本试验还证明肺的支气管和细支气管的固有层中均有淋巴细胞的分布,其中一些浆细胞功能呈旺盛状态,表明猪肺也参与局部黏膜免疫反应。但与兔不同^[2],猪支气管树黏膜淋巴组织的结构没有类似于小肠的派伊尔氏斑和其它部位肠相关淋巴组织。肺内整个支气管树参与呼吸道免疫反应为猪的鼻腔免疫提供了良好的基础。此外,肺内细支气管上皮中除了假复层柱状纤毛上皮外,尚分布有微绒毛细胞和 Clara 细胞,这两种细胞是否与局部免疫反应有关还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 成令忠,钟翠平,蔡文琴. 现代组织学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社. 2003.
- [2] Bienenstock J, Jonston M R, Perey D Y. Bronchial lymphoid tissue I. Morphologic characteristics[J]. Laboratory Investigation, 1973, 28(6): 686~692.
- [3] Zuercher A W. Upper respiratory tract immunity[J]. Viral Immunol, 2003, 16(3): 279~289.
- [4] 舒翠莉,彭 虹,王 华,等. 滴鼻免疫有效的诱导黏膜及系统免疫反应[J]. 微生物免疫学进展, 2001, 29(4): 40~44.
- [5] Dyce K M, Sack W O. Textbook of veterinary anatomy [M]. W B Saunders Company, 1987.
- [6] Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils[J]. Immunology Today, 1998, 19: 414~421.
- [7] 易自翔,周爱东,王德钦. 从吞噬作用探讨腭扁桃体的功能[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1997, 32(1): 38~40.
- [8] Eriksson J C, Davidsson A, Garberg H. Lymphocyte distribution in the tonsils prior to and after influenza vaccination[J]. Vaccine, 2003, 22(1): 57~63.
- [9] Taguchi T, Aicher W K, Fujihashi K. Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes Murine CD₃⁺, $\gamma\delta$ TCR T cells produce IFN- γ and IL-5 [J]. The Journal of Immunology, 1991, 147(11): 3 736~3 741.
- [10] Lepage A C, Dominique B G, Daniel T B. Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against toxoplasma gondii[J]. The Journal of Immunology, 1998, 161: 4 902~4 908.
- [11] 杨 倩. 发现黏膜上皮中淋巴细胞的“腔排”现象[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(3): 121~123.
- [12] Wurbel M A, Philippe J M, Nguyen C. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9[J]. Eur J Immunol, 2000, 30: 262~269.
- [13] 金光明,刘胜兵,杨 倩,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗不同接种途径对母猪生殖道黏膜淋巴细胞分布的影响[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(1): 10~13.
- [14] Bradley P A, Bourne F J, Brown P J. The respiratory tract immune system in the pig. I. Distribution of immunoglobulin-containing cells in the respiratory tract mucosa[J]. Vet Pathol, 1976, 13: 81~89.